

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

Evaluación del efecto quimioprotector de hojas de moringa (*Moringa oleifera* L) en modelos *in vivo* e *in vitro* de cáncer colorrectal

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta

M. en C. Mardey Liceth Cuéllar Núñez

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Co-dirigido por:

Dra. Elvira González de Mejía

Querétaro, Qro, Noviembre de 2019



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

**Evaluación del efecto quimioprotector de hojas de moringa (*Moringa oleifera* L)
en modelos *in vivo* e *in vitro* de cáncer colorrectal**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presentado por:

M. en C. Mardey Liceth Cuellar Núñez

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Co-dirigido por:

Dra. Elvira González de Mejía

SINODALES

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Presidente

Dra. Elvira González de Mejía
Secretario

Dra. Rocio Campos Vega
Vocal

Dra. Minerva Ramos Gómez
Suplente

Dr. Ramón Guevara González
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro
Noviembre, 2019
México

DEDICATORIA

A mis padres, Pedro y Marleny, hermanos y hermana y a todos mis sobrinitos, en especial a un@ que viene en camino.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante todo este trayecto.

A la Dra. Ma. Guadalupe Loarca Piña, por brindarme sus conocimientos, su amistad y apoyo en todo momento, además de permitirme la oportunidad de pertenecer a su laboratorio.

A la Dra. Elvira González de Mejía, por sus conocimientos y apoyo para aceptarme en su laboratorio durante mi estancia doctoral en la Universidad de Illinois.

A cada uno de mis sinodales, por sus aportes y sus valiosas contribuciones para la realización del proyecto.

Al Dr. Mario Enrique Rodríguez, por ser la persona quien me condujo a seguir en el camino de la investigación.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de bioquímica toxicológica por su apoyo e inmensa amistad, en especial a Iván por ser mi equipo de trabajo.

A mis padres, Pedro Nel Cuellar y Marleny Nuñez, por su confianza y apoyo constante durante todo este tiempo.

A mis amigos mexicanos y colombianos en Querétaro, mil gracias por todos los momentos de tristeza y alegría compartidos, en especial a mi amiga Angie por estar siempre ahí para escucharme.

A mi novio José Fernando, porque a pesar de las dificultades, siempre ha estado apoyándome en todo.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1 Cáncer.....	3
II.1.1 Generalidades.....	3
II.1.2 Proceso de carcinogénesis.....	3
II.1.3 Bases moleculares del cáncer.....	5
II.2 Cáncer colorrectal.....	6
II.2.1 Incidencia y mortalidad	6
II.2.2 Etiología del cáncer colorrectal.....	8
II.2.3 Bases moleculares y proceso de carcinogénesis colorrectal	9
II.2.4 Inflamación y cáncer colorrectal.....	15
II.2.5 Modelos <i>in vivo</i> para el estudio de cáncer colorrectal	18
II.2.6 Estrategias moleculares para combatir el cáncer colorrectal.....	21
II.3 Moringa (<i>Moringa oleifera</i>).....	26
II.3.1 Generalidades.....	26
II.3.2 Composición química de hojas de moringa	26
II.3.3 Compuestos bioactivos en hojas de Moringa	27
II.3.4 Propiedades biológicas de hojas de moringa	28
III. JUSTIFICACIÓN	30
IV. HIPÓTESIS.....	31

V. OBJETIVOS	32
V.1 Objetivo general.....	32
V.2 Objetivos específicos.....	32
VI. METODOLOGÍA.....	33
VI.1 Materiales	33
VI.1.1 Reactivos	33
VI.1.2 Material biológico	34
VI.2 Métodos	35
VI.2.1 Preparación de la muestra.....	35
VI.2.2 Determinación de la composición nutrimental de hojas de moringa....	35
VI.2.3 Determinación de la composición nutracéutica de hojas de moringa ..	37
VI.2.4 Estudio <i>in vivo</i>	40
VI.2.5 Estudio <i>in vitro</i>	49
VI.2.6 Análisis estadístico.....	53
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
VII.1 Composición nutrimental y nutracéutica de hojas de moringa	54
VII.2 Implementación y/o caracterización del modelo de cáncer CCR inducido con AOM/DSS.....	61
VII.3 Efectos preliminares del consumo de moringa sobre el modelo de CCR	64
VII.4 Efecto del consumo de una curva dosis-respuesta de moringa en ratones macho CD-1	70
VII.4.1 Efecto del consumo de hojas de moringa sobre la inducción de enzimas de fase II.....	73
VII.4.2 Efecto del consumo de hojas de moringa sobre el nivel de peroxidación lipídica en hígado y colon.....	76
VII.4.3 Efecto del consumo de moringa sobre la actividad enzimática de mieloperoxidasa en colon.....	77

VII.4.4	Efecto del consumo de hojas de moringa sobre la producción de ácidos grasos de cadena corta y pH en contenido cecal y fecal.	78
VII.4.5	Efecto del consumo de hojas de moringa sobre la concentración de citocinas en suero.	81
VII.4.6	Análisis histopatológico de colon e hígado en ratones suplementados con moringa e inducidos con AOM/DSS.	83
VII.4.7	Efecto del consumo de hojas de moringa en la expresión de genes asociados al proceso inflamatorio.	85
VII.5	Efecto del extracto acuoso, metanólico y de glucosinolatos obtenidos a partir de hojas de moringa sobre células de adenocarcinoma humano HCT116 y HT-29.	91
VII.5.1	Concentración inhibitoria de los diferentes extractos sobre la proliferación celular de HCT116 y HT-29.	91
VII.5.2	Efecto de los diferentes extractos de hojas de moringa sobre la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH)	93
VII.5.3	Efecto de los diferentes extractos de hojas de moringa sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs)	94
VII.5.4	Efecto de los diferentes extractos de hojas de moringa sobre la producción de citocinas proinflamatorias.	96
VII.5.5	Efecto de los diferentes extractos de hojas de moringa sobre la inducción de apoptosis en HCT116 y HT-29	97
VII.5.6	Efecto de los extractos de hojas de moringa sobre la expresión proteica de marcadores de apoptosis.	101
VIII.	CONCLUSIONES	105
IX.	BIBLIOGRAFÍA	107
X.	ANEXOS	132

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Contenido de proteína, lípidos, cenizas, humedad y carbohidratos en hojas de moringa.	54
Cuadro 2. Contenido de fibra total, soluble e insoluble en hojas de moringa	55
Cuadro 3. Contenido de compuestos fenólicos libres en hojas de moringa	57
Cuadro 4. Capacidad antioxidante de hojas de moringa	58
Cuadro 5. Correlación de <i>Spearman</i> entre compuestos fenólicos libres y capacidad antioxidante.....	59
Cuadro 6. Contenido de glucosinolatos en hojas de moringa.....	60
Cuadro 7. Efecto de la inducción con AOM/DSS sobre el peso y longitud de colon y peso de hígado de ratones CD-1.....	62
Cuadro 8. Efecto del consumo de moringa sobre el peso y longitud de colon y peso de hígado de ratones CD-1.....	65
Cuadro 9. Concentración inhibitoria (CI ₅₀) sobre la proliferación celular de HCT116 y HT-29.	92
Cuadro 10. Listado de genes evaluados mediante el arreglo de PCR “Mouse Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT ² Profiler PCR” formato H	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Etapas de la carcinogénesis	4
Figura 2. Tasas estimadas de incidencia y mortalidad de cáncer a nivel mundial .	6
Figura 3. Tasas estimadas de incidencia y mortalidad de cáncer en México	7
Figura 4. Alteraciones genéticas en la carcinogénesis colorrectal.	10
Figura 5. Comparación estructural de una fosa críptica de (A) tejido normal (A) y una fosa críptica aberrante en (B) tejido dañado.....	21
Figura 6. Fases del ciclo celular.....	24
Figura 7. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis	25
Figura 8. Esquema experimental utilizado para la caracterización del modelo de cáncer de colon asociado a inflamación.....	41
Figura 9. Esquema experimental para la evaluación del efecto quimioprotector de la curva dosis-respuesta de hojas de moringa.	43
Figura 10. Efecto del tratamiento con AOM/DSS sobre (A) peso corporal e (B) Índice de Actividad de la Enfermedad en ratones macho CD-1.....	61
Figura 11. Fotos representativas del colon abierto en grupos tratados con AOM/DSS.	62
Figura 12. Imágenes representativas de lesiones microscópicas de colon (100X). Tinción con H & E.	63
Figura 13. Efecto del consumo de moringa sobre la (A) Ganancia de peso y (B) Índice de actividad de la enfermedad (IAE).....	64
Figura 14. Efecto del consumo de moringa sobre peso/longitud de colon	66
Figura 15. Imágenes representativas de lesiones colónicas inducidas por AOM/DSS..	67

Figura 16. Efecto del consumo de moringa sobre la actividad enzimática de (A) β -glucosidasa (B) β -glucoronidasa.	68
Figura 17. Efecto del consumo de moringa sobre la actividad enzimática de (A) Triptofanasa y (B) Ureasa.....	69
Figura 18. Efecto del consumo de diferentes dosis de hojas de moringa (5, 10, 20%) sobre (A) peso corporal e (B) ingesta de alimento en ratones CD-1.....	71
Figura 19. Efecto del consumo de una curva dosis-respuesta de moringa sobre (A) Peso relativo de hígado; (B) Peso/longitud de colon; (C) Peso relativo de bazo en ratones CD-1. *	72
Figura 20. Fotos representativas de colon y ciego (completo y abierto) de cada uno de los grupos tratados.	73
Figura 21. Efecto del consumo de diferentes dosis de moringa (5, 10, 20%) sobre la actividad enzimática de glutatión S-transferasa (GST) en (A) hígado y (B) colon de ratones macho CD-1. *Asteriscos sobre las diferentes barras expresan diferencias significativas respecto al control positivo por la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).....	74
Figura 22. Efecto del consumo de diferentes dosis de moringa (5, 10, 20%) sobre la actividad enzimática de quinona reductasa (NQO1) en (A) Hígado y (B) colon en ratones macho CD-1.....	75
Figura 23. Efecto del consumo de la curva dosis-respuesta de hojas de moringa (MO) sobre el nivel de peroxidación lipídica en hígado y colon de ratones CD-1 inducidos con AOM/DSS.	77
Figura 24. Actividad enzimática de mieloperoxidasa (MPO) en colon de ratones CD-1 suplementados con hojas de moringa (MO).....	78
Figura 25. Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y pH en contenido cecal de ratones CD-1 suplementados con hojas de moringa.	79
Figura 26. Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y pH en contenido fecal de ratones CD-1 suplementados con hojas de moringa.....	80
Figura 27. Perfil de citocinas proinflamatorias en suero de ratones inducidos con AOM/DSS y tratados con diferentes dosis de moringa.	82

Figura 28. Imágenes representativas del análisis histológico de hígado en ratones sanos e inducidos con AOM/DSS (300X). Tinción con H & E.	83
Figura 29. Imágenes representativas del análisis histológico de colon de ratones inducidos por AOM/DSS (300X). Tinción con H & E.	84
Figura 30. Visualización de gráficos de calor (<i>Heatmaps</i>) obtenidos tras el arreglo RT ² Profiler PCR Array en las muestras de colon.	87
Figura 31. Expresión diferencial de genes en los diferentes tratamientos vs control positivo (AOM/DSS) obtenidos tras el arreglo RT ² Profiler PCR Array en las muestras de colon.....	88
Figura 32. Grupos (<i>clusters</i>) obtenidos del análisis jerárquico de acuerdo a las funciones moleculares y procesos biológicos.....	89
Figura 33. Mecanismo de acción propuesto de acuerdo con los principales resultados obtenidos en el estudio <i>in vivo</i>	90
Figura 34. Porcentaje de inhibición celular de (A) HCT116 y (B) HT-29 tratadas con 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/ml del extracto acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH)	91
Figura 35. Actividad de LDH y porcentaje de citotoxicidad en células colorrectales humanas (A, C) HCT116 y (B, D) HT-29 tratadas con la CI ₅₀ del extracto acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH), bencil isotiocianato (BITC)	94
Figura 36. Producción de EROs en células colorrectales humanas (A) HCT116 y (B) HT-29 tratadas con valores de la CI ₅₀ del extracto acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH), Bencil isotiocianato (BITC) y oxaliplatino (OX) durante 24 h	95
Figura 37. Producción de citocinas proinflamatorias en células colorrectales humanas (A) HCT116 y (B) HT-29 tratadas con valores de la CI ₅₀ del extracto acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y	

extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH), Bencil isotiocianato (BITC) y oxaliplatino (OX)	97
Figura 38. Efecto de los diferentes extractos sobre la inducción de apoptosis en células HCT116. Las células fueron tratadas con valores de la CI_{50} del extracto acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH), Bencil isotiocianato (BITC) y oxaliplatino (OX).	99
Figura 39. Efecto de los diferentes extractos sobre la inducción de apoptosis en células HT-29. Las células fueron tratadas con valores de la CI_{50} del extracto acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH), Bencil isotiocianato (BITC) y oxaliplatino (OX).	100
Figura 40. Efecto de los diferentes extractos sobre la expresión de marcadores de apoptosis en células HT-29. Las células fueron tratadas con valores de la CI_{50} del extracto acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH), Bencil isotiocianato (BITC) y oxaliplatino (OX).	101
Figura 41. Integración del efecto del quimioprotector de hojas de moringa en los modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de cáncer de colon.	104

Dirección General de Bibliotecas UAG

ABREVIATURAS

AE: Extracto acuoso
AGCC: Ácidos grasos de cadena corta
AOM: Azoximetano
AOX: Actividad antioxidante
ARE: Elemento de respuesta antioxidante
BITC: Isotiocianato de bencilo
BSA: Albúmina de suero bovino
CI₅₀: Concentración inhibitoria máxima media
COX-2: Ciclooxygenasa 2
CYT C: Citocromo C
DE: Dieta estándar
DSS: Dextrán sulfato de sodio
Eq.: Equivalente
ERNs: Especies reactivas de nitrógeno
EROs: Especies reactivas de oxígeno
FBS: Suero bovino fetal
FCA: Fosa críptica aberrante
GAPDH: Deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato
GE: Extracto de glucosinolatos
GEH: Extracto de glucosinolatos hidrolizado
GST: Glutación-S-transferasa
h: Hora
H2DCFDA: diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína
HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia
H&E: Hematoxilina y eosina
IL: Interleucina
MDA: malondialdehído
LDH: Lactato deshidrogenasa

ME: Extracto metanólico
MEM: Medio esencial mínimos de Eagle
mg: Miligramo
mL: Mililitro
MO: Hojas de moringa
MPO: Mieloperoxidasa
N: Newton
Nm: Nanómetro
NQO1: NADH-quinona reductasa
OX: Oxaliplatino
PC: Peso corporal
RFU: Unidades Relativas de Fluorescencia
RIPA: Tampón de radioinmunoprecipitación
RPM: Revoluciones por minuto
RPMI: Medio de cultivo celular del Instituto Roswell Park Memorial
s: Segundo
SPME: Microextracción en fase sólida
TBST: solución salina tamponada con Tris-Tween 20
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
 μ L: Microlitros
 μ mol: Micromoles

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial. El consumo de vegetales o de sus componentes bioactivos se ha asociado con un efecto quimioprotector. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto quimioprotector de hojas de *Moringa oleifera* (MO) en modelos *in vivo* e *in vitro* de CCR. Según la caracterización nutracéutica, MO es fuente de compuestos fenólicos (ácidos clorogénico y gálico, principalmente), flavonoides (quercetina y kaempferol) y glucosinolatos (glucomoringin). Para el estudio *in vivo*, ratones macho CD-1 se indujeron con azoximetano (AOM 10 mg/kg pc) y dextrán sulfato de sodio (DSS, 1.5 % v/v en el agua de beber) y se evaluó el consumo de una curva dosis-respuesta de MO (5 %, 10 % y 20 %). Se encontró una disminución significativa ($p < 0.05$) en parámetros morfológicos, histopatológicos e indicadores del daño oxidativo entre los grupos administrados con MO y el control positivo (AOM/DSS). El grupo con 10% MO mostró un aumento significativo (~ 3 veces) de ácidos grasos de cadena corta en contenido fecal y cecal. Grupos con 10% y 20% MO exhibieron una reducción hasta del 55% en citocinas proinflamatorias (MCP-1, IL-6, TNF- α) y disminuyeron la expresión diferencial de 65 genes involucrados en la respuesta inflamatoria (IL-2, IL-6, TNF, IL-1 β e INF- γ). Para el estudio *in vitro*, células de adenocarcinoma de colon humano (HCT116 y HT-29) fueron suplementadas con extractos de hojas de moringa (acuoso, metanólico y glucosinolatos). El extracto de glucosinolatos hidrolizado (CI₅₀: 0.55 - 0.59 mg/mL) incrementó la producción de EROs e indujo la modulación de marcadores de apoptosis (Bcl-2, Bax y citocromo C). MO moduló *in vivo* e *in vitro* mecanismos antiinflamatorios a través de la regulación de genes y proteínas involucrados con la inhibición de la vía de inflamación de NF- κ B. Las hojas de *Moringa oleifera* podrían ser utilizadas como una alternativa viable en la prevención del cáncer colorrectal.

Palabras clave: Moringa (*Moringa oleifera*), cáncer colorrectal, inflamación, efecto quimioprotector.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of death worldwide. The consumption of vegetables or their bioactive components has been associated with a chemoprotective effect. The aim of this work was to evaluate the chemoprotective effect of *Moringa oleifera* (MO) leaves in an *in vivo* and *in vitro* model of CRC. According to the nutraceutical characterization, MO is a source of phenolic compounds (chlorogenic and gallic acids, mainly), flavonoids (quercetin and kaempferol), and glucosinolates (glucomoringin). For the *in vivo* study, male CD-1 mice were induced with azoxymethane (AOM 10 mg/kg BW) and sodium dextran sulfate (DSS, 1.5% v/v in drinking water) and the consumption of a dose-response curve of MO (5%, 10%, and 20%) was evaluated. A significant decrease ($p < 0.05$) was found in morphological, histopathological parameters, and oxidative damage indicators between the groups administered with MO and the positive control (AOM/DSS). The group with 10% MO showed a significant increase (~ 3 times) of short-chain fatty acids in fecal and cecal content. Groups with 10% and 20% MO exhibited a reduction of up to 55% in proinflammatory cytokines (MCP-1, IL-6, TNF- α), and 10% MO decreased the differential expression of 65 genes involved in the inflammatory response (IL-2, IL -6, TNF, IL-1 β and INF- γ). For *in vitro* study, human colon adenocarcinoma cells (HCT116 and HT-29) were supplemented with moringa leaf extracts (aqueous, methanolic, and glucosinolates). The glucosinolate extract hydrolyzed (IC₅₀: 0.55 - 0.59 mg / mL) increased the production of EROs and induced the modulation of apoptosis markers (Bcl-2, Bax, and cytochrome C). MO modulated *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory mechanisms through the regulation of genes and proteins involved with the inhibition of the NF- κ B inflammation pathway. *Moringa oleifera* leaves could be used as a viable alternative in the prevention of colorectal cancer.

Keywords: *Moringa oleifera*, colorectal cancer, inflammation, chemoprotective effect.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer constituye una de las primeras causas de muerte a nivel mundial. Es por ello que existe un gran número de trabajos relacionados con la búsqueda de compuestos que tengan la capacidad de disminuir el desarrollo esta enfermedad. El cáncer de colon, en particular, ha tomado gran importancia debido al cambio en el patrón de la dieta en muchos países a causa de la occidentalización y el desarrollo, lo que ha incrementado su incidencia (Bray *et al.*, 2018). El cáncer comúnmente resulta de mutaciones que ocurren durante el tiempo de vida. Estas mutaciones alteran protooncogenes y genes supresores de tumor, los cuales son importantes reguladores de los procesos biológicos y desempeñan diversas funciones en el control del crecimiento celular, como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis.

Diversas investigaciones científicas han reportado la capacidad de los vegetales y las plantas para alterar las rutas de la carcinogénesis a través de estudios de animales con cáncer inducido (Ortega y Campos, 2019; Samec *et al.*, 2019). Por su parte, se ha informado que algunos fitoquímicos como los metabolitos secundarios contenidos en las plantas interfieren con etapas específicas del proceso de la carcinogénesis e inhiben, retardan o revierten la tumorigénesis a través de la alteración de procesos como el arresto al ciclo celular e inducción de apoptosis (Zhao *et al.*, 2018b; Mazewski y De Mejia, 2019). Se ha reportado que extractos polifenólicos de plantas e isotocianatos pueden ejercer efectos protectores contra el cáncer a través de la inducción de enzimas de biotransformación (fase II) encargadas de la eliminación de carcinógenos del organismo (Chikara *et al.*, 2018; Gründemann y Huber, 2018). Además se ha informado el potencial de estos compuestos bioactivos en la modulación de múltiples vías de señalización relacionadas con cáncer e inflamación, tales como: NF- κ B, PI3K/AKT/PKB/mTOR, Wnt/ β -catenina y ERK / MAPK (Costea *et al.*, 2018).

En la búsqueda de alimentos con capacidad quimioprotectora, la *Moringa oleifera* podría ejercer efectos importantes. En el presente estudio se evidenció que las hojas de moringa son una importante fuente de compuestos bioactivos tales como: compuestos fenólicos, glucosinolatos y fibra dietaria; relacionados con la prevención en el desarrollo de enfermedades no transmisibles (Cuellar-Núñez *et al.*, 2018). Debido a que estos compuestos podrían promover mecanismos antioxidantes, reducir la incidencia de lesiones colónicas y modular la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria y carcinogénesis; el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto quimioprotector de hojas de moringa (*Moringa oleifera* L) en modelos *in vivo* e *in vitro* de cáncer colorrectal.

II. ANTECEDENTES

II.1 Cáncer

II.1.1 Generalidades

El cáncer se define como un trastorno en los mecanismos celulares que rigen la proliferación normal de las células y la homeostasis. Se han reportado más de 100 tipos de cáncer, de acuerdo con el tejido u órgano a partir del cual se originan las células tumorales (Siegel *et al.*, 2019). El cáncer se caracteriza por presentar múltiples mutaciones que provocan daños en los cuales una sola célula o grupo de células provenientes de un tejido particular pierden la habilidad para responder a los mecanismos de control. La multiplicación de células tumorales o dañadas puede conducir a la formación de un tumor o neoplasia, el cual se define como la aglomeración de células generadas a partir de una misma célula mutada (Chow, 2010; Boroughs y De Berardinis, 2015). Al crecer estos tumores, algunas células cancerosas pueden desprenderse, atravesar el epitelio, llegar a torrente circulatorio o sistema linfático e implantarse en otro órgano o tejido (Farnsworth *et al.*, 2018).

II.1.2 Proceso de carcinogénesis

La conversión de una célula corporal normal en maligna incorpora una cantidad de eventos o alteraciones que ocurren a nivel celular, molecular y morfológico. Estas mutaciones pueden darse en diferentes genes como: proto-oncogenes, supresores de tumores, o genes que participan en los mecanismos de reparación del ADN, otros que inducen apoptosis y los que participan en la proliferación del ciclo celular, dando origen a una célula cancerosa (Boroughs y De Berardinis, 2015). Uno de los modelos más estudiados del proceso de carcinogénesis es el inducido químicamente (Kemp, 2015; Kulesz-Martin *et al.*, 2017). Este proceso involucra etapas como la iniciación, promoción, transformación y progresión (Figura 1).

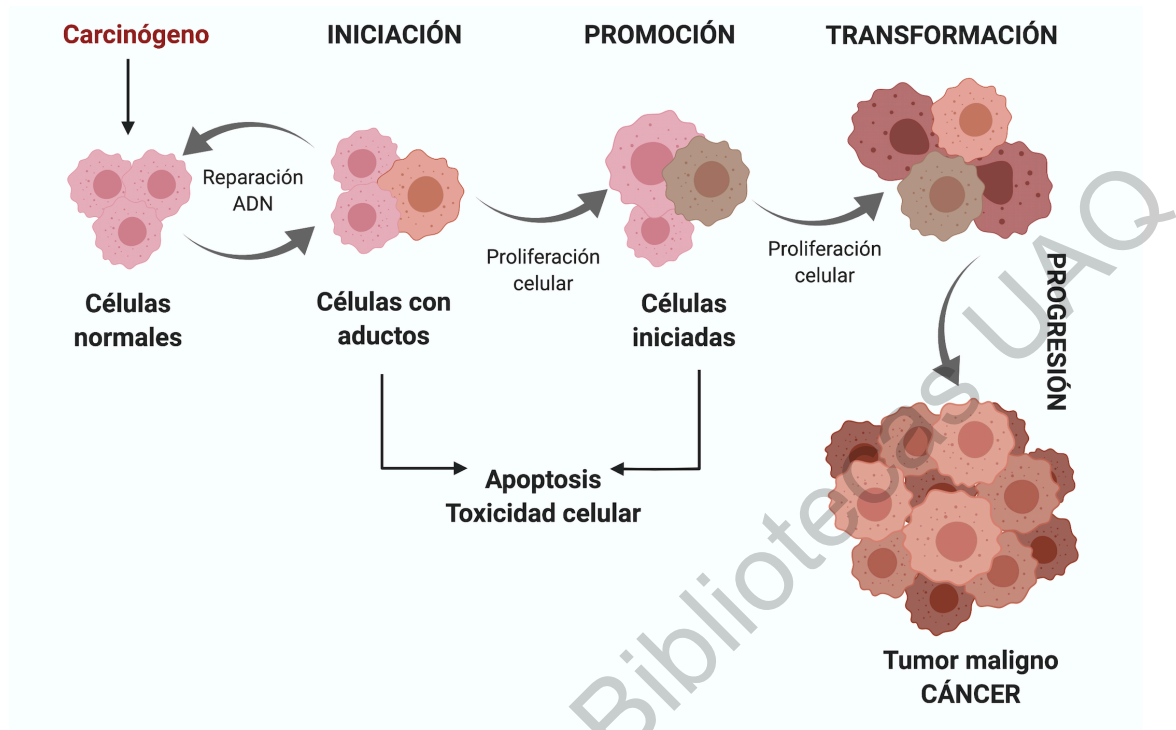


Figura 1. Etapas de la carcinogénesis
(Adaptado de Olivera *et al.*, 2007y Kinsella *et al.*, 2018)

La iniciación es una etapa relativamente rápida, que se produce cuando una célula ha sido expuesta a la acción de un agente carcinógeno. En esta etapa se da la inducción de una mutación en el ADN de la célula somática. La célula iniciada no es una célula neoplásica, pero ha dado el primer paso hacia este estado. La promoción representa la etapa de crecimiento tisular con la formación del tumor, en esta etapa participan: los factores de crecimiento y sus receptores (Barcellos- Hoff *et al.*, 2013; Kinsella *et al.*, 2018). El efecto de estos promotores es estimular la división celular en la región previamente expuesta donde un iniciador produjo un crecimiento pequeño a partir de una célula mutada. La célula iniciada responde ante la acción del promotor con un crecimiento distinto al de la normal (Kinsella *et al.*, 2018). La progresión o malignización del tumor implica la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia, por parte de la célula tumoral maligna. Esa capacidad está codificada también en los genes con modificaciones estructurales y funcionales. La progresión de clones iniciados puede ocurrir espontáneamente

debido a la inestabilidad genética propia de la célula o puede ser acelerado por la exposición de elementos genotóxicos que actúan sobre éstas (Klaunig y Wang, 2018; Gomes *et al.*, 2019a).

II.1.3 Bases moleculares del cáncer

El cáncer es producido por una serie de alteraciones heterogéneas en el cariotipo celular, las cuales incluyen la pérdida total o parcial de cromosomas, duplicación y translocaciones (Vargas-Rondón *et al.*, 2018). Las mutaciones que determinan una nueva función pueden activar a los oncogenes, que son efectores positivos de la transformación. Los productos de los genes de supresión tumoral son reguladores negativos del crecimiento y la pérdida de su función promueve la carcinogénesis (Jeggo *et al.*, 2016).

Los proto-oncogenes estimulan normalmente la división celular como hecho fundamental para mantener la vida, de ellos depende el desarrollo embrionario, la cicatrización de las heridas y la reposición de las células luego de cumplida su diferenciación (Pierotti *et al.*, 2016). Aún así, estos mismos proto-oncogenes pueden sufrir alteraciones en su estructura, por cambios en la secuencia de los ácidos nucleicos (mutaciones), por pérdida de algunos segmentos del cromosoma (deleciones) o por traslado de un sector cromosómico a otro cromosoma (translocaciones) (Jeggo *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2019). Cuando existen alteraciones moleculares en los protooncogenes, éstos se transforman en oncogenes activados. Algunos de los oncogenes que se encuentran mayormente sobreexpresados en varios tipos de neoplasias son *K-RAS*, *N-RAS*, *ERBB2*, *c-myc* y *c-fos* (Pierotti *et al.*, 2016). Los genes supresores son los encargados de contrarrestar a los oncogenes, pueden determinar la síntesis de elementos reguladores negativos del ciclo celular tal como: la proteína Rb (retinoblastoma) o los elementos de la ruta TGF β (factor de crecimiento transformante beta) de transducción de señales, así como inducir a la apoptosis o “muerte celular programada” considerando que la célula debe morir antes que reproducirse con las

fallas genómicas. El retinoblastoma (Rb) fue el primer gen supresor descrito, se encuentra en el cromosoma 13 y la proteína mutada de este gen se ha vinculado a cánceres de hueso, pulmón, seno y vejiga (Dyson, 2016).

II.2 Cáncer colorrectal

II.2.1 Incidencia y mortalidad

El cáncer colorrectal (CCR) es conocido como uno de los tipos de cáncer con mayor incidencia en países occidentales (Donovan *et al.*, 2016). Según GLOBOCAN 2018, la incidencia estimada fue del 10.2% (1.84 por 18.1 millones de casos nuevos de cáncer) y del 9.2% de mortalidad (0.88 por 9.6 millones de muertes relacionadas con el cáncer) en todo el mundo (Bray *et al.*, 2018).

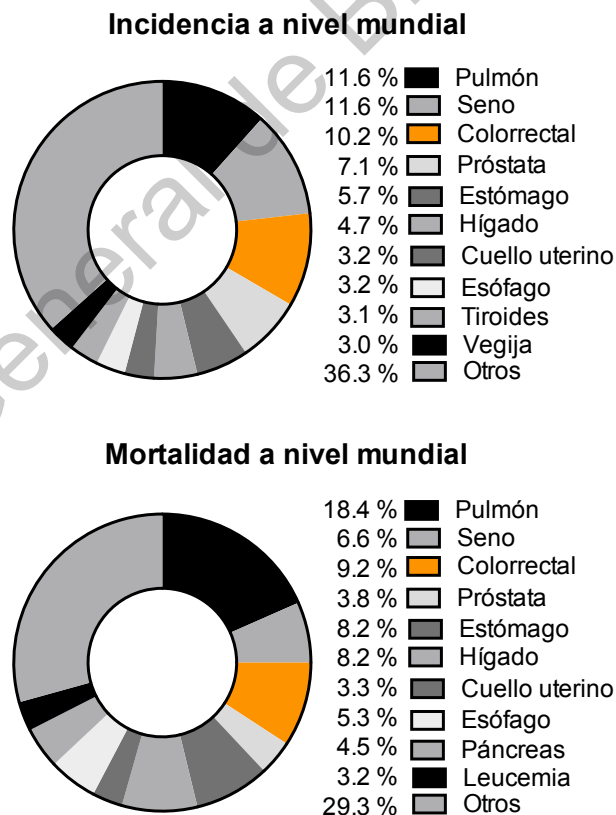


Figura 2. Tasas estimadas de incidencia y mortalidad de cáncer a nivel mundial (GLOBOCAN 2018; Bray *et al.*, 2018).

Para el caso de México, la tasa estimada de incidencia del CCR durante el 2018 fue del 7.8% y de mortalidad del 8.5% (Figura 3), ocupando la primera causa de muerte por cáncer en México (GLOBOCAN, 2018). Se ha estimado que para el año 2020 se presenten 2725 nuevos casos, de los cuales 1220 pertenecerían a personas menores de 65 años y 1505 a mayores de 65 años (Ferlay *et al.*, 2015). La tasa de mortalidad por CCR prácticamente se duplica después de los 60 años y continúa incrementándose progresivamente en decenios más avanzados; sin embargo, pacientes con algunas predisposiciones genéticas o familiares pueden desarrollar cáncer de colon a edades más tempranas con mayor frecuencia (Gabriel *et al.*, 2018).

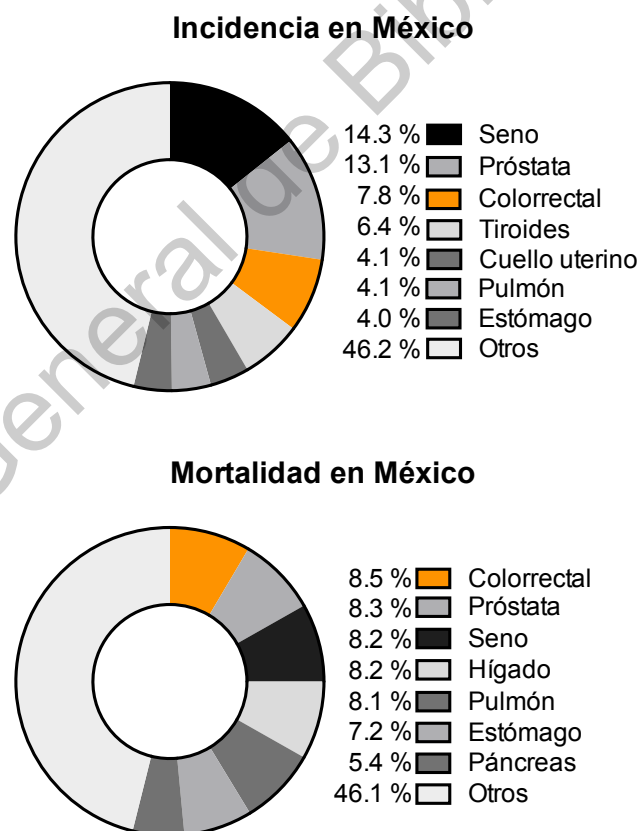


Figura 3. Tasas estimadas de incidencia y mortalidad de cáncer en México (GLOBOCAN 2018; Bray *et al.*, 2018)

II.2.2 Etiología del cáncer colorrectal

El riesgo de padecer esta enfermedad se ha relacionado con factores ambientales, incluyendo la dieta, el consumo de alcohol, tabaco y el sedentarismo (Padmanabhan, 2018; Davis y Ross, 2019). Así también, un alto consumo de grasas animales, carnes rojas y el contenido de fibra de la dieta se ha relacionado principalmente con el desarrollo de CCR (Kim, 2013; Reddy, 2018; Steinberg, 2019).

De igual forma, alteraciones en la microbiota intestinal causadas por la genética de un individuo o por factores ambientales, pueden alterar la relación homeostática y promover enfermedades como el CCR (Kordahi y DePaolo, 2018). La grasa dietaria estimula la secreción de ácidos biliares y aumentan la concentración colónica de los mismos. Microorganismos anaerobios como *clostridios* y *bacteroides* que están presentes en el colon pueden modificar químicamente los ácidos biliares para producir carcinógenos potenciales o cocarcinógenos. En particular, algunas cepas de *Clostridium* son capaces de deshidrogenar ácidos biliares proporcionando ácido desoxicólico y litocólico que son carcinógenos potenciales en poblaciones que consumen dietas ricas en grasas (Tilg *et al.*, 2018; Katsidzira *et al.*, 2019). Por otra parte, se ha informado que *Fusobacterium nucleatum*, una bacteria anaerobia gramnegativa presente en la cavidad oral, se encuentra significativamente elevada en adenomas y carcinomas colorrectales humanos en comparación con el tejido colonico normal (Kosumi *et al.*, 2018).

Por otro lado, un elevado peso al momento de nacer, la edad, el padecimiento de pólipos adenomatosos en el colon, colitis ulcerosa y en menor grado la enfermedad de Crohn, además de los factores genéticos, también están asociados positivamente con el riesgo de cáncer de colon (Smith *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2018).

II.2.3 Bases moleculares y proceso de carcinogénesis colorrectal

Se conocen dos formas fundamentales de CCR: esporádico y hereditario. La mayoría de los tumores colorrectales se consideran como tumores esporádicos, lo cual demuestra que existe un riesgo ambiental muy elevado que incide directamente sobre el desarrollo de este tipo de cáncer (Carr *et al.*, 2018; Agrawal *et al.*, 2019). La inestabilidad genómica del CCR se puede producir por diferentes vías, tales como: inestabilidad cromosómica (CIN), inestabilidad microsatelital (MSI) y la de metilación (Tariq y Ghias, 2016; Hong, 2018).

II.2.3.1 Vía de la inestabilidad cromosómica (CIN)

La vía de la inestabilidad cromosómica es la más común en la carcinogénesis del CCR esporádico: entre 70 y 85% de los casos se originan por la vía CIN o tradicional, también llamada vía supresora (Yamagishi *et al.*, 2016). Se caracteriza por cambios en el número de los cromosomas (aneuploidías) o anomalías estructurales, pérdida de heterocigocidad y mutaciones en genes supresores de tumores y protooncogenes (Müller *et al.*, 2016). Dichas alteraciones se originan por defectos en las proteínas responsables de los puntos de control en el ciclo celular y en la respuesta al daño del genoma y por modificaciones en diversas proteínas que controlan la segregación de cromosomas en la fase M del ciclo celular (Gomes *et al.*, 2019). El desarrollo del CCR por la vía CIN puede iniciarse por mutaciones en el gen APC, que producen una proteína defectuosa que impide la degradación de la β -catenina y conducen a la formación de un adenoma temprano en el epitelio intestinal (Zhang y Shay, 2017). Posteriormente ocurre una segunda mutación en el gen *K-RAS*, que aumenta la tasa de proliferación y causa la transformación celular hacia un adenoma avanzado; luego, ocurren mutaciones en otros genes, *DCC*, *SMAD* y *TP53*, hasta que se avanza al CCR (Figura 4); estas alteraciones le confieren una ventaja de crecimiento a la célula y le proporcionan un alto potencial de metástasis (Müller *et al.*, 2016; Javarsiani *et al.*, 2019).

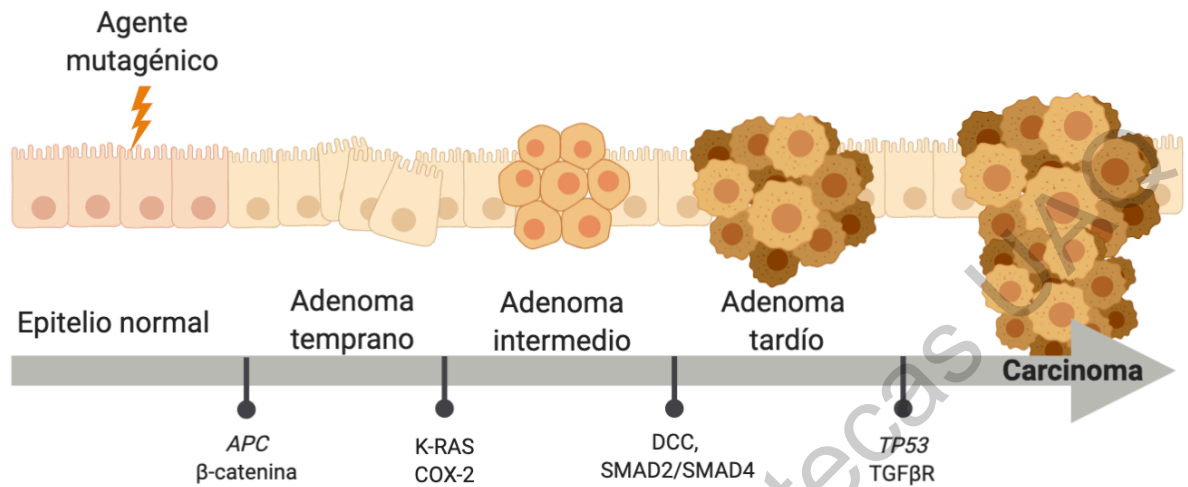


Figura 4. Alteraciones genéticas en la carcinogénesis colorrectal. (Adaptado de Agrawal *et al.*, 2019).

II.2.3.1.1 APC

APC (adenomatous poliposis coli) es un gen supresor de tumores, en el que se presenta el primer cambio genético dentro de la secuencia de la carcinogénesis colorrectal. Codifica para la proteína APC, que se une a β-catenina, promoviendo la degradación de esta última, regulando así su función. La ausencia de APC permite la entrada de β-catenina al núcleo, la cual activa la expresión de genes que estimulan la proliferación celular (Morin *et al.*, 2016).

El gen APC participa en funciones biológicas, como la migración y adherencia celulares, la segregación cromosómica, el ensamblaje del huso mitótico, el control del ciclo celular y la reparación del ADN (Hankey *et al.*, 2018). Además, cumple una función importante en la vía de señalización Wnt, que es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis del epitelio intestinal, la adherencia intercelular, la estabilización del citoesqueleto, la regulación del ciclo celular y la apoptosis (Javarsiani *et al.*, 2019). La principal función de APC es prevenir la acumulación de β-catenina cuando la vía Wnt se encuentra inactiva; también, la de limitar la

transcripción de diversos genes como c-Myc y ciclina D1 (Hankey *et al.*, 2018). Asimismo, mutaciones que alteran la función de la proteína APC permiten la estabilización de la β -catenina, su traslación al núcleo, en donde se acumula e induce una sobreexpresión de genes que confieren una ventaja de proliferación a la célula (Morin *et al.*, 2016; Javarsiani *et al.*, 2019).

II.2.3.1.2 K-RAS

K-RAS pertenece a la familia de genes RAS, que codifican para tres proteínas: H-RAS, N-RAS y *K-RAS* de 21 kD (p21RAS), las cuales tienen una actividad GTP-asa. Las mutaciones puntuales en el gen *K-RAS* ocurren en un 98% en los codones 12 y 13 (Knickelbein y Zhang, 2015). *K-RAS* es una proteína G que actúa como interruptor molecular y permite la transducción de señales del exterior hacia el interior de la célula. Esta proteína actúa de forma cíclica desde un estado de unión a GDP, en el que se encuentra inactiva, hacia un estado activo en el que se une a GTP, en respuesta a la estimulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual promueve el funcionamiento de los factores de intercambio de guanina (GEF) y posteriormente la activación de *K-RAS* (Bahrami *et al.*, 2018). La estimulación de las proteínas RAS inicia una cascada de señalización, que modifica la expresión de múltiples genes encargados de la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la migración, el crecimiento, la quimiotaxis y la diferenciación celular (Saeed *et al.*, 2019). La regulación de la actividad de RAS está determinada por su actividad GTP-asa intrínseca, mediada por las proteínas potenciadoras de la actividad GTP-asa (GAP). Las mutaciones en este gen se presentan en 32% a 42% de los casos de CCR (Knickelbein y Zhang, 2015; Bahrami *et al.*, 2018).

II.2.3.1.3 DCC

DCC (por la sigla en inglés, deleted in colorectal cancer) es un gen supresor de tumores que posee 29 exones y codifica para un receptor transmembranal de 1.447 aminoácidos. Este gen está involucrado en la apoptosis y en la adherencia,

diferenciación y crecimiento celulares mediados por las interacciones intercelulares (Tariq y Ghias, 2016). Se ha informado que un aumento en los niveles de DCC induce la apoptosis por activación de la vía de la caspasa 3 y suprime la metástasis de células tumorales (Forrest *et al.*, 2016). Las alteraciones de DCC se deben principalmente a la pérdida alélica en la región 18q21, que ocurre en 70% de los casos de CCR. Por otra parte, las mutaciones puntuales (6%) e inserciones en el gen DCC ocurren con una baja frecuencia en el CCR; las alteraciones más comunes son la pérdida de heterocigosidad (70%) y la reducción o pérdida de la expresión (Forrest *et al.*, 2016; Sefrioui *et al.*, 2018).

II.2.3.1.4 SMAD

La familia SMAD se compone de ocho genes diferentes, que codifican para proteínas de señalización celular que regulan el crecimiento y la diferenciación celulares. En los mamíferos las proteínas SMAD se dividen en tres grupos: el primero comprende las proteínas de unión a receptores SMAD (R-SMAD) compuestas por SMAD 2 y 3, que tienen como función traducir la señal de TGF- β y las SMAD 1, 5, 8 que traducen las señales de la proteína morfogenética ósea BMP (por la sigla en inglés de bone morphogenetic protein). En el segundo grupo está la proteína SMAD 4, un cofactor para ambos receptores que se une a las R-SMAD y permite la translocación al núcleo (Zhao *et al.*, 2018a). Por último, se encuentran las proteínas inhibidoras SMAD (I-SMAD) compuestas por SMAD 6 y 7 (Palacio-Rúa y Muñetón-Peña, 2012). Dichas proteínas hacen parte de la vía de señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), implicado en la enfermedad inflamatoria intestinal y tienen como función enviar al núcleo las señales inducidas por dicho factor y potenciar la transcripción de múltiples genes (Chandrasinghe *et al.*, 2018). La señalización se inicia cuando diferentes variantes de la familia de TGF- β , como TGF- β 1, - β 2, - β 3 o BMP, se unen al complejo de receptores tipos I y II de TGF- β con actividad serina/treonina-quinasas y permiten la propagación de la señal mediante la fosforilación del receptor de SMAD (R-SMAD), éstos receptores

interaccionan con el factor de transcripción SMAD-4 y al heterodimerizarse promueven su transporte al núcleo, donde reconocen y se asocian a secuencias SMAD de unión al ADN y marcan algunos genes, potenciando o reprimiendo su transcripción mediante el reclutamiento de coactivadores, correpresores y factores de remodelación de la cromatina (Zhao *et al.*, 2018a). Alteraciones en el gen SMAD-4 (DPC4) se presentan entre 16% y 25% de los casos de CCR, mientras que un 6% ocurre en SMAD-2 (Palacio-Rúa y Muñetón-Peña, 2012; Chandrasinghe *et al.*, 2018).

II.2.3.1.5 p53

El gen p53 es un regulador transcripcional, fue el primer gen supresor de tumores ligado a apoptosis; las mutaciones en p53 ocurren en la mayoría de los tumores humanos y son a menudo asociados con etapas avanzadas del tumor (Kasthuber y Lowe, 2017). Está localizado en el cromosoma 17 y codifica una fosfoproteína de 53 kD (p53), que actúa como factor de transcripción, regulador positivo o negativo de la expresión de diversos genes secundarios que participan en el control del ciclo celular. Cuando p53 se encuentra mutado las células dañadas no pueden morir y continúan proliferando, acumulando muchas más mutaciones genéticas que pueden transformarlas en tumorales (Javarsiani *et al.*, 2019). Su incremento se observa cuando las células se exponen a agentes que dañan al ADN, e induce a que se detengan al final de la fase G1 para que sean reparados los daños en el ADN, antes de continuar con su replicación en fase S. Las células con p53 mutado no interrumpen el ciclo celular aún después de que el ADN ha sufrido daño. p53 es requerido para apoptosis inducida por el mal funcionamiento del telómero; así, las células mutadas en p53 sobreviven esa respuesta y son genómicamente inestables. La pérdida combinada de telomerasa y p53 estimula el desarrollo del tumor. Las mutaciones en p53 son generalmente los últimos acontecimientos en el desarrollo del tumor porque una célula que adquiere una mutación en p53 no puede tener ventaja selectiva hasta que el tumor que es convertido encuentra condiciones

hipóxicas o alcanza suficiente erosión del telómero (Palacio-Rúa y Muñetón-Peña, 2012; Meek, 2015). En general, los genes regulados transcripcionalmente por p53 se agrupan dependiendo de las funciones que realizan como: inhibición del ciclo celular, reparación del daño en el ADN, inhibición de la angiogénesis e inducción de la apoptosis (Kruiswijk *et al.*, 2015). La incidencia de sobreexpresión de p53 en CCR reportado es similar a las mutaciones en p53. Tanto las mutaciones como la sobreexpresión ocurren más frecuentemente en tumores distales (zona izquierda del colon) comparados con los tumores proximales (zona derecha del colon) (Li *et al.*, 2015).

II.2.3.2 Vía de la inestabilidad microsatelital (MSI)

Es conocida como la vía mutadora y ocurre en el 20% de los casos de CCR, se caracteriza por fallas en los mecanismos de reparación de bases mal apareadas o MMR (por la sigla en inglés de mismatch repair). Los genes MMR actúan en la fase S reparando errores en el ADN generados por el mal apareamiento de bases o como consecuencia del deslizamiento de la ADN-polimerasa durante la replicación de secuencias repetitivas, manteniendo de esta forma la integridad del genoma (Tariq y Ghias, 2016). El sistema MMR está conformado por siete genes de reparación: hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 y hPMS2. Los defectos en estos genes tienen como resultado la aparición de mutaciones puntuales, así como inserciones-delecciones (IDL) que cambian el marco de lectura y producen un codón de parada prematuro, que codifica para una proteína no funcional (Ghanipour *et al.*, 2017). La MSI se detecta al comparar el número de copias de los microsatélites de las células tumorales con el de las células normales; por lo general, las células tumorales tienen un mayor número de copias de microsatélites. Los genes que contienen secuencias repetidas dentro de la región codificadora tales como APC, MLH1, TGF/BR11 y BAX tienen un mayor riesgo de MMR (Ghanipour *et al.*, 2017). Se ha reportado un avance reciente de la inmunoterapia (principalmente fármacos anti-PD1) sobre el CCR metastásico con

disfunción MMR, lo que ha llevado al inicio de múltiples ensayos basados en inhibidores del punto de control inmunológico (Le *et al.*, 2015; Gupta y Paul, 2018).

II.2.3.3 Vía de la metilación

Por otro lado, la aparición del CCR puede ocurrir por mecanismos epigenéticos que inactivan la expresión de diversos genes, principalmente por la metilación del ADN y por otros tipos de modificaciones en proteínas como las histonas. La metilación del ADN es una vía genética muy común en el CCR esporádico, se presenta aproximadamente en el 17% de los casos y consiste en la unión de un grupo metilo en el carbono 5 de la citosina por acción de las enzimas ADN-metiltransferasa, lo que genera la 5 metil-citosina (Las modificaciones por metilación ocurren en las citosinas de los dinucleótidos CpG conocidas como islas CpG que se localizan en los promotores de casi la mitad de todos los genes y se encuentran generalmente no metiladas en células normales (Greenberg y Bourc'his, 2019). En las células tumorales, la hipermetilación se conoce como fenotipo de metilación de las islas CpG. Por el contrario, la hipometilación de los promotores de algunos genes ocurre en estadios avanzados de cáncer y se caracteriza por el aumento en la transcripción génica (Feinberg, 2019).

II.2.4 Inflamación y cáncer colorrectal

Estudios epidemiológicos han demostrado que los estados inflamatorios crónicos aumentan el riesgo de numerosos tipos de cáncer. La inflamación crónica se caracteriza por una respuesta inflamatoria activa y la destrucción del tejido, promueve la carcinogénesis mediante la inducción de mutaciones genéticas, la inhibición de la apoptosis, o la estimulación de la angiogénesis y la proliferación celular (Gudkov y Komarova, 2016). Se ha reportado que individuos con inflamación crónica de la mucosa colónica o colitis ulcerativa, aumentan el riesgo a padecer CCR, el cual puede ser apreciable a partir de los 10 años de diagnóstico (Axelrad,

et al., 2016; Long *et al.*, 2017). También se ha evidenciado que la superficie del colon que presenta colitis es determinante, entre mayor sea la superficie, el riesgo también aumenta (Lennerz *et al.*, 2016). Por otra parte, el riesgo de padecer CCR es mayor en ciertas poblaciones de pacientes con colitis que además tienen esclerosis primaria de bilis, una condición idiopática característica de inflamación crónica de los ductos biliares, que predispone no solamente a cáncer de colon sino también a cáncer del tracto biliar (Palmela *et al.*, 2018).

II.2.4.1 Genes y proteínas involucrados en cáncer de colon e inflamación

Se han establecido algunas proteínas de suero y expresión de genes como biomarcadores eficaces para identificar el riesgo de cáncer de colon e inflamación que incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (*TNF- α*), factor de transcripción nuclear kappa B (*NF- κ B*), interleucina 6 (*Il-6*), ciclooxigenasa 2 (*COX-2*), entre otros. Muchos de estos marcadores se han visto alterados como resultado de la inducción de cáncer con carcinógenos químicos como el azoximetano (Alamro *et al.*, 2018; Marcuello *et al.*, 2019). De igual forma se ha reportado que el análisis de ADN tumoral circulante (ADNc), células derivadas de tumor (CTC, células tumorales circulantes) o microARN circulante (miARN) tienen un gran potencial como biomarcadores en la detección temprana del CCR (Marcuello *et al.*, 2019).

II.2.4.1.1 TNF- α

Se ha reportado que las citocinas liberadas por células del sistema inmunológico (macrófagos, monocitos y neutrófilos) juegan un papel primordial en la patogénesis del cáncer asociado a inflamación (West *et al.*, 2015). El factor de necrosis tumoral alfa es una potente citocina proinflamatoria implicada en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Zhao y Zhang, 2018). Se ha reportado que TNF- α promueve el desarrollo de tumores en modelos experimentales de colitis (Alamro *et al.*, 2018).

II.2.4.1.2 NF-kB

El factor de transcripción nuclear kappa B juega un papel central en el proceso inflamatorio en diversas enfermedades como: artritis reumatoide, esclerosis múltiple y asma, entre otras (Liu *et al.*, 2017a), a través de su habilidad para inducir la transcripción de genes proinflamatorios como: *TNF*, *IL-1*, *IL-6*, *IL-8* y *COX-2*, entre otros (Alamro *et al.*, 2018). La activación constitutiva de NF-kB es frecuentemente observada en cáncer de colon y juega un papel importante en la angiogénesis, promoviendo el crecimiento del tumor. Se ha demostrado que la inhibición de NF-kB es suficiente para inhibir la angiogénesis mediada por células tumorales, por lo que puede ser una potente terapia antiangiogénica en el cáncer colorrectal (Park *et al.*, 2016).

II.2.4.1.3 IL-6

La interleucina-6 es una citocina multifuncional que fue originalmente caracterizada como un regulador de la respuesta inmunitaria e inflamatoria; sin embargo, se ha detectado elevada expresión de IL-6 en múltiples tumores epiteliales (Mauer *et al.*, 2015). Dado que se ha reportado que IL-6 y sus blancos transcripcionales participan en la proliferación celular, sobrevivencia y metabolismo, la señalización de IL-6 ha sido implicada en la tumorigénesis (Vainer *et al.*, 2018). IL-6 puede activar varias vías de señalización, incluidas STAT, ERK/MAPK y PI3K/AKT. Se ha informado que IL-6 promueve la proliferación e invasión de células de cáncer colorrectal a través de la señalización de Ras/MAPK y PI3K/AKT31. (Zhang *et al.*, 2018).

II.2.4.1.4 COX-2

COX-2 es una proteína citoplasmática que cataliza la síntesis de mediadores inflamatorios lipídicos (prostaglandinas y prostaciclina) del ácido araquidónico. La expresión aumenta en los sitios de inflamación, así como en ~ 80% de los CCR y 40% de los adenomas colorrectales (Liu *et al.*, 2017b). COX-2 puede contribuir al

desarrollo del tumores mediante la modulación de la apoptosis, la angiogénesis y la invasión tumoral. También tiene un papel en la progresión del cáncer a través de la activación de metaloproteasas, aumentando así la invasividad de las células de cáncer de colon (Mandal, 2018).

II.2.5 Modelos *in vivo* para el estudio de cáncer colorrectal

Existen variedades de modelos *in vivo* para el estudio del cáncer de colon, generalmente se encuentran como modelos inducidos o no-espontáneos y modelos espontáneos. Los modelos espontáneos son producidos por manipulación genética, trasplante tumoral o celular en ratones inmunodeficientes (McIntyre *et al.*, 2015). Entre los modelos experimentales de cáncer colorrectal no espontáneo destacan los inducidos por derivados de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) como el azoximetano (AOM), la metil nitrosourea y el 2-amino-1-metil-6,6-fenilimidazol-(4,5-b)-piridina (De Robertis *et al.*, 2011; De-Souza y Costa-Casagrande, 2018).

La administración subcutánea de azoximetano (AOM) induce la formación de tumores predominantemente en el colon distal de ratas (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008; Onwasigwe *et al.*, 2019). Una vez que el AOM es inyectado subcutánea o intramuscularmente, viaja vía vena porta al hígado, en donde es metabólicamente activado por enzimas de fase I (CYP2E1) a metilazoximetanol (MAM) (Chen y Huang, 2009). El MAM es glucuronidado por enzimas de la fase II (glucuroniltransferasa, UGT; glutatión-S-transferasa, GST; quinona reductasa, NQO1) y excretado vía biliar hacia el intestino; en el colon puede ser desconjugado por la acción de la enzima de origen microbiano β -glucuronidasa, liberando formalina y el ion metildiazonio. El ión metildiazonio parece ser el compuesto carcinógeno final responsable de la metilación de ADN (principalmente las bases guanina y timina), promoviendo el desarrollo del cáncer de colon, primeramente, generando las lesiones denominadas fosas crípticas aberrantes (FCA), seguido de la formación de adenomas (Chen y Huang, 2009).

Se ha reportado un aumento progresivo en la formación de FCA, la aparición de mutaciones en *K-RAS* y β -catenina, e inestabilidad de microsátélites en el colon de animales inducidos con AOM (Persê y Cerar, 2011). Con respecto al gen *K-RAS*, el AOM induce una transición de G→A en el codón 12 y puede contribuir a la inducción de cambios hiperplásicos; mientras que β -catenina sufre una misma transición G→A en los codones 32, 33, 34 y 41 y parece que está involucrada en la generación de FCA con displasia. La mutación de *K-RAS* activa las rutas metabólicas MAPK y PI3K, la sobre expresión de ciclina D1 y COX-2 (ciclooxygenasa 2) y también incrementa la expresión de *iNOS* (óxido nítrico sintetiza inducible) con la presencia de estimulación inflamatoria (Knickelbein y Zhang, 2015). Por su parte, las mutaciones de β -catenina estabilizan la proteína en el citoplasma y activan la transcripción de los blancos de la señalización de β -catenina/Tcf, como ciclina D1 y c-myc. La alteración β -catenina también puede estar involucrada en el incremento de la expresión *iNOS*. El óxido nítrico (NO) producido por *iNOS* causa daño en el ADN y neovascularización, de igual forma puede influir en la sobre expresión de COX-2. La sobre expresión de COX-2 produce un exceso de prostaglandinas, causando un incremento en la proliferación celular y disminución de la apoptosis, en cierta medida modulada por EP1-4, subtipos de los receptores de la prostaglandina E2 (PGE2) (Mandal, 2018).

Entre los modelos de cáncer colorrectal inducido químicamente, la combinación de azoximetano con la exposición a un agente inflamatorio como el dextrán sulfato de sódico (DSS) en roedores ha demostrado acortar drásticamente el tiempo de inducción de CCR y de recapitular rápidamente la secuencia de adenoma-carcinoma de fosas cripticas aberrantes que se produce en el CCR humano (De Robertis *et al.*, 2011). Debido a su alta reproducibilidad y bajo costo de aplicación, el modelo AOM/DSS se ha convertido en un modelo excelente para el estudio de carcinogénesis de colon y una potente plataforma para estudios de intervención quimiopreventivo (Parang *et al.*, 2016).

El DSS es un polímero sulfatado con capacidad citotóxica sobre las células epiteliales intestinales y los macrófagos (Liu *et al.*, 2015). Se ha reportado que la administración de DSS en el agua de beber provoca en ratones, ratas y hámsters lesiones colónicas (Eichele y Kharbanda, 2017; Hoffmann *et al.*, 2018). Las lesiones afectan a la mucosa y submucosa intestinal con presencia de ulceraciones, más evidentes en el colon izquierdo y progresan distalmente. Cuando la administración oral de DSS se lleva de forma cíclica, los ratones llegan a desarrollar una colitis crónica que se puede prolongar varias semanas después del cese de la administración. Las lesiones crónicas suelen caracterizarse por la presencia de prominentes folículos linfoides y presencia de displasia epitelial. Consecuentemente, en las fases más avanzadas de este proceso inflamatorio intestinal, los animales tratados con DSS muestran una elevada incidencia de cáncer de colon (Hoffmann *et al.*, 2018).

II.2.5.1 Fosas crípticas aberrantes (FCA).

Las FCA son las primeras lesiones en el desarrollo del cáncer colorrectal que pueden ser identificadas microscópicamente sobre la superficie de la mucosa colónica después de la tinción con azul de metileno, DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) o hematoxilina y eosina (H&E) (McGinley *et al.*, 2010). Estudios en roedores y humanos, han demostrado que las FCA son lesiones que representan un valioso biomarcador intermedio en el desarrollo de la carcinogénesis colónica (Vergara-Castañeda *et al.*, 2010; Wargovich *et al.*, 2010; Fujii *et al.*, 2017). Las FCA poseen características histológicas como ser dos o tres veces más grandes que las fosas crípticas normales (Figura 5), además de ser elevadas cuando se observan al microscópico tienen una hendidura en la parte superior, así como una capa gruesa de células epiteliales que se tiñen con azul de metileno y colorean un tono más oscuro que las criptas normales (Bird, 1987; McGinley *et al.*, 2010). Las FCA son utilizadas como un punto final en la identificación y evaluación de la función preventiva o de promoción de compuestos naturales y farmacológicos, así como de

factores dietarios y ambientales en el proceso de carcinogénesis del colon (Fujii *et al.*, 2017).

Cuando las FCA son utilizadas como biomarcador, es importante resaltar que estas son un grupo heterogéneo de lesiones; el número total de FCA sólo puede ser considerado como un biomarcador viable en estadios muy tempranos de la carcinogénesis, por otra parte, es importante mencionar que las FCA no se distribuyen por igual entre el colon proximal, medio o distal (su principal desarrollo es en el colon medio y distal) (Perše y Cerar, 2011; Drew *et al.*, 2018).

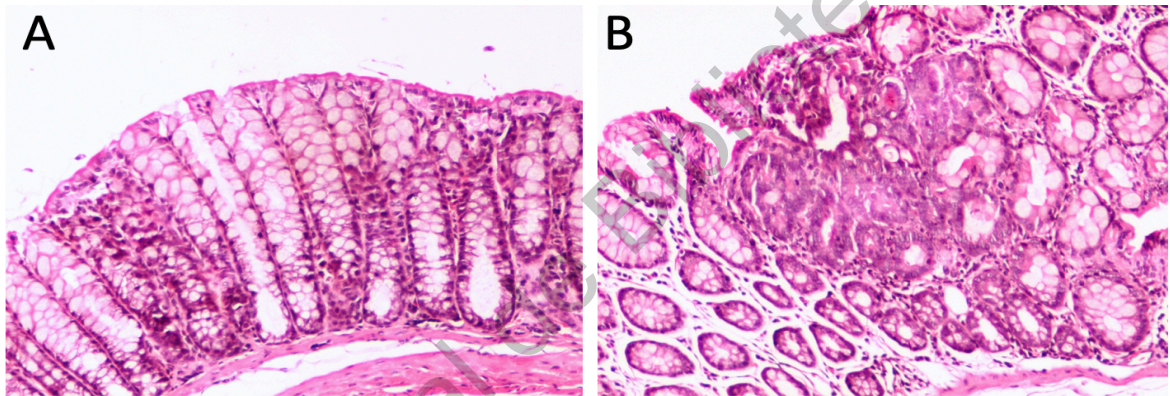


Figura 5. Comparación estructural de una fosa críptica de (A) tejido normal (A) y una fosa críptica aberrante en (B) tejido dañado.

II.2.6 Estrategias moleculares para combatir el cáncer colorrectal

Existen diversas estrategias para disminuir la progresión del cáncer colorrectal como la inducción de sistemas antioxidantes, la inhibición o activación de algunos procesos biológicos, tales como el arresto al ciclo celular e inducción de apoptosis.

II.2.6.1 Inducción de sistemas antioxidantes (fase II)

En contraste con la activación de carcinógenos químicos mediada por las reacciones de enzimas de fase 1, las reacciones de fase 2 catalizan la conjugación

con glutatión, sulfato y ácido glucorónico, entre otros cofactores, neutralizando así los intermediarios electrofílicos, facilitando la eliminación de estos metabolitos y previniendo así que reaccionen con los grupos nucleofílicos del DNA. Así como los compuestos electrofílicos pueden dañar al DNA, las especies reactivas de oxígeno (ROS) también formadas por la biotransformación de carcinógenos pueden dañar al DNA y, como consecuencia, desarrollar cáncer u otra enfermedad (Chikara *et al.*, 2018a; Barnes *et al.*, 2018).

Se han identificado un gran número de inductores de enzimas de fase 2 como potentes anticarcinógenos y se han clasificado en varios grupos según su estructura química: isotiocianatos, ditioliones, quinonas oxidables, carotenoides/polienos, entre otros (Kwak *et al.*, 2001; Rescigno *et al.*, 2018). El sulfurofano (SFN) y la 3H-1,2-ditioI-3-tiona (D3T) son compuestos representativos de cada uno de estos grupos, respectivamente y han sido estudiados como agentes quimioprotectores del cáncer (Erzinger *et al.*, 2015; Mokhtari *et al.*, 2018). Por su parte, diversos estudios moleculares muestran que el incremento en la expresión de enzimas de fase 2, de enzimas y proteínas antioxidantes como la ferritina, es el resultado de la actividad transcripcional de sus genes correspondientes. Este incremento en la expresión de enzimas de fase 2 es mediado a través de la unión del factor de transcripción NRF2 a los elementos de respuesta a antioxidantes (AREs) presentes en la región promotora de estos genes (Rungratanawanich *et al.*, 2018). Así mismo, diversos estudios proporcionan amplia evidencia que un período de 48 horas después del tratamiento con diferentes agentes inductores es suficiente para elevar la expresión de un gran número de enzimas de fase 2 y antioxidantes (Ramos-Gómez *et al.*, 2001; Chikara *et al.*, 2018a; Rungratanawanich *et al.*, 2018).

II.2.6.2 Ciclo celular

El ciclo celular es un conjunto de eventos organizados y monitoreados responsables de la división celular en dos células hijas (Otto y Sicinski, 2017). Es

un proceso muy demandante de energía que requiere una serie de eventos ordenados y sincronizados para garantizar la correcta duplicación y segregación del genoma. Este proceso involucra cuatro fases secuenciales que van de la quiescencia (Fase G0) a proliferación (fases G1, S, G2 y M) y de regreso a la quiescencia. Las células pueden entrar en la primera fase (G1) desde el estado de quiescencia (G0) o, si se encuentran en proliferación, después de completar la citocinesis. La progresión a través de G1 es dependiente de mitógenos hasta el punto de restricción (R) después del cual las células pueden proliferar independientemente del estímulo mitogénico y entran entonces en la fase de síntesis (S), cuando ocurre la replicación del ADN. Entre los incontables elementos que forman parte de este evento celular, se ha descrito como elementos clave en la regulación del ciclo celular la activación secuencial de los complejos heterodiméricos ciclina- cinasas dependientes de las ciclinas (CDK). La actividad cinasa de las CDK es estrechamente regulada por la unión a las ciclinas, las subunidades activadoras, la unión a reguladores negativos (inhibidores de CDK, CKI) y eventos de fosforilación/defosforilación. En la Figura 6 se muestran los diversos pares de complejos de ciclina-CDK y sus respectivas posiciones en el ciclo celular (Yang, 2018).

La progresión a través de cada fase del ciclo celular y su transición entre las mismas está monitoreada por mecanismos sensores, llamados puntos de restricción, los cuales mantienen la exactitud de la secuencia de los eventos. Los puntos de restricción del ciclo celular previenen la transición a la siguiente fase hasta que la previa haya sido satisfactoriamente completada. El último objetivo es asegurar la detección y reparación del daño genético, prevenir la división celular descontrolada y garantizada que las dos células hijas hereden una copia completa y fiel del genoma. Los puntos de restricción se activan cuando se detectan problemas induciendo arresto al ciclo celular hasta que el problema se resuelva, si es posible, o si la reparación no es satisfactoria, dirigir la célula hacia la senescencia o apoptosis (Yang, 2018). Una vez que los cromosomas son duplicados

correctamente, las células pueden entrar a la fase G₂, otra fase que prepara a la célula para entrar a la mitosis, donde la célula genera dos células hijas genómicamente estables. El mal funcionamiento de los puntos de restricción del ciclo celular puede resultar en enfermedades como cáncer (Otto y Sicinski, 2017; Yang, 2018).

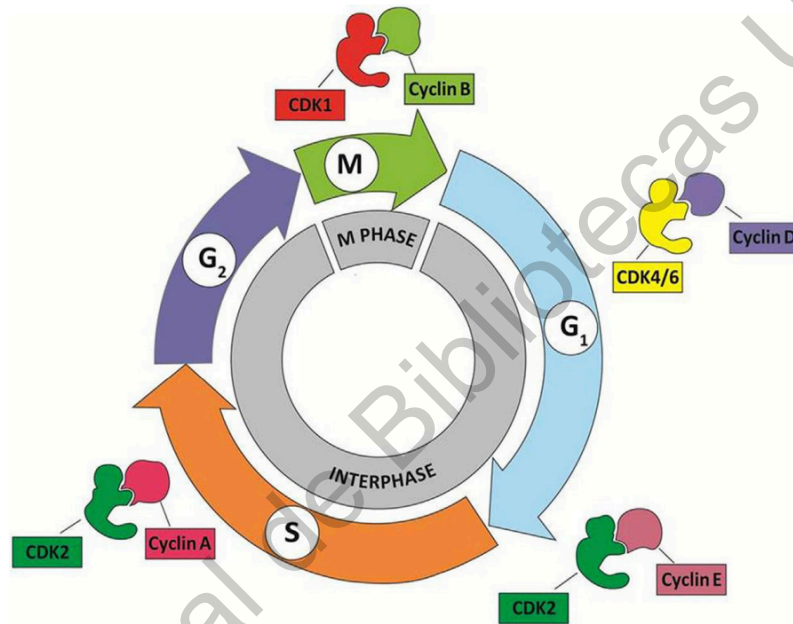


Figura 6. Fases del ciclo celular (Yang, 2018)

II.2.6.3 Apoptosis

El término apoptosis se usa para describir al proceso de muerte celular programada. La apoptosis es la forma predominante de muerte celular fisiológica, en contraste a la necrosis celular. El primer signo visible de la apoptosis es la condensación del núcleo y la fragmentación del ADN; también disminuye el tamaño del cuerpo celular, aunque los organelos permanecen intactos; más adelante se fragmentan el núcleo y el citoplasma y se forman cuerpos apoptóticos, que son fagocitados por células circundantes (macrófagos) sin dejar rastro ni inducir una respuesta inflamatoria (Pfeffer y Singh, 2018). Un funcionamiento inapropiado de la apoptosis es un factor importante en muchas condiciones humanas incluyendo enfermedades neurodegenerativas, daño por isquemia, desórdenes autoinmunes y

cáncer (Letai, 2017; Singh *et al.*, 2019). Los mecanismos de apoptosis son altamente complejos y sofisticados, involucrando cascadas de señalización dependientes de energía. Típicamente existen dos tipos de vías de apoptosis: la intrínseca, o vía de receptor de muerte y la extrínseca o por vía mitocondrial (Figura 7).

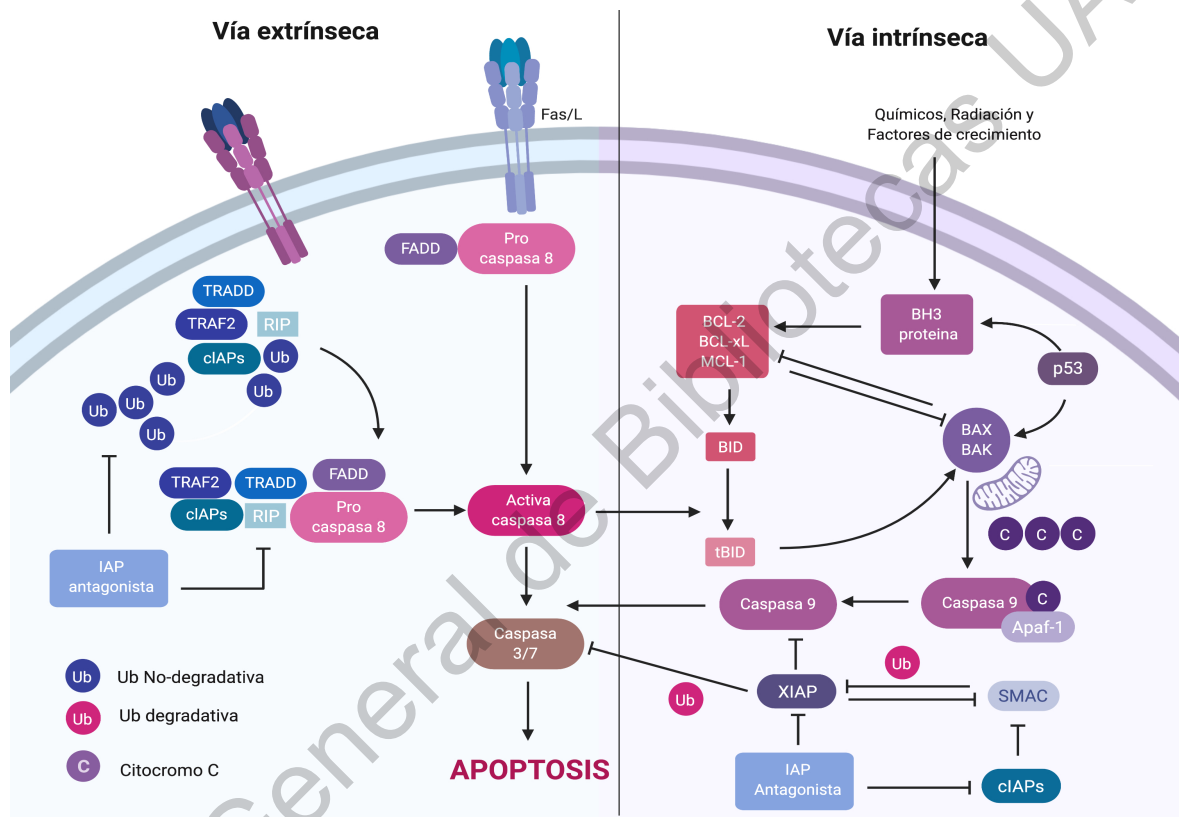


Figura 7. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis (BioRender)

La muerte celular vía extrínseca es activada a través de receptores de señales extracelulares de muerte en la membrana celular tales como Fas/L y el receptor 1 del factor de necrosis tumoral (*TNFR1*) por ligandos específicos. Esta vía participa principalmente en condiciones patológicas en las que la inflamación es predominante (Singh *et al.*, 2019). En la vía intrínseca mitocondrial, la cual es iniciada por múltiples formas de estrés celular, los miembros de la familia Bcl-2, Bax y Bak se traslocan a la mitocondria. La proteína BH3 activa a Bax y Bak para regular el lanzamiento de citocromo C al citosol y éstos bloquean la sobreexpresión de Bcl-

2. Esto acciona el complejo del apoptosoma (Apaf-1 y caspasa 9) y la activación de caspasa 3, resultando en la subsecuente degradación de sustratos de muerte celular (Pfeffer y Singh, 2018; Singh *et al.*, 2019).

II.3 Moringa (*Moringa oleifera*)

II.3.1 Generalidades

La moringa (*Moringa oleifera*) es la especie más cultivada de la familia Moringaceae, es nativa de la India, Pakistán, Bangladesh y Afganistán. En México, *M. oleifera* se cultiva ampliamente en diferentes zonas del país y se encuentra en más de diez estados desde Sonora hasta Oaxaca (Valdez-Solana *et al.*, 2015; Carranco *et al.*, 2016). Esta planta de rápido crecimiento también es conocida como el árbol de rábano picante, “*drumstick tree*”, marango, moonga, mulangay, nébéday, saijhan, ó sajna. El cultivo puede ser propagado por medio de semillas o por reproducción asexual, soporta largos períodos de sequía y crece bien en condiciones áridas y semiáridas (Olson y Fahey, 2011; Gopalakrishnan *et al.*, 2016). Todas las partes de la planta son comestibles, pero en general las hojas son las más utilizadas gracias a sus propiedades medicinales (Abdullah *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2019). Dentro de los usos derivados de esta planta están: producción de biogás (de hojas), productos de limpieza doméstica (hojas trituradas), fertilizantes (semilla), nutriente foliar (extracto a partir de las hojas), abono verde (de las hojas), goma (tallo), clarificador de miel y caña de azúcar (semillas en polvo). Así mismo, uno de los usos más conocidos es el empleo de semillas en polvo para flocular contaminantes y purificar el agua potable (Okuda y Ali, 2019).

II.3.2 Composición química de hojas de moringa

Moyo *et al.* (2011) y Teixeira *et al.* (2014), reportaron la composición química proximal de hojas deshidratadas y liofilizadas de moringa (*Moringa oleifera*), encontrando contenidos entre: 28.65 y 30.29 % para proteína total; 9.01 y 9.53 %

de humedad; 6.50 y 7.09 % de lípidos; 7.64 y 10.9 % para cenizas y 44.36 % en carbohidratos (obtenidos por diferencia). Por su alto contenido de proteínas, las hojas se han utilizado como una fuente de alimento alternativa para combatir la desnutrición, especialmente entre los niños y los bebés (Ma *et al.*, 2019).

II.3.3 Compuestos bioactivos en hojas de Moringa

Varios componentes bioactivos, tales como compuestos fenólicos, glucosinolatos y fibra dietaria han sido asociados con propiedades benéficas a la salud y a la prevención de enfermedades (Saucedo-Pompa *et al.*, 2018).

II.3.3.1 Compuestos fenólicos

Dentro de los fitoquímicos con una alta actividad biológica están presentes los compuestos fenólicos. Las hojas de moringa, son ricas en compuestos fenólicos, entre los que sobresalen los flavonoides (Saini *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2018). A partir del extracto acuoso y/o metanólico de las hojas de moringa se han detectado: ácido clorogénico, quercetina y kaempferol como compuestos mayoritarios (Verma *et al.*, 2009; Vongsak *et al.*, 2013). Estudios *in vitro* han revelado que estos compuestos son destacados por presentar efectos antioxidantes, antihipertensivos, antiproliferativos y antiinflamatorios (Coppin *et al.* 2013; Bhattacharya *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2019).

II.3.3.2 Glucosinolatos

La moringa es fuente natural de glucosinolatos e isotiocianatos. Se ha reportado que estos fitoquímicos poseen efectos antioxidantes, antiinflamatorios y anticancerígenos, lo que ha generado un gran interés desde el punto de vista tanto toxicológico como farmacológico ya que son capaces de inducir enzimas de la fase II de desintoxicación e inhibir las enzimas de fase I de activación (Galuppo *et al.*, 2014; Maldini *et al.*, 2014; Fahey *et al.*, 2019). El glucosinolato predominante en las

hojas de moringa es el 4 α -L-ramnosiloxi benzil isotiocianato, conocido como glucomoringina (GMG). Brunelli *et al.* (2010) evaluaron la actividad antiproliferativa *in vitro* e *in vivo* de la glucomoringina encontrando que el isotiocianato producido inhibe el factor nuclear NF-kB y reduce el crecimiento de mielomas en ratones atímicos desnudos. Rajan *et al.* (2016) demostraron el efecto antitumoral producido por GMG en células humanas de astrocitoma maligno. De igual forma, Jaafaru *et al.* (2018) reportaron que el extracto soluble no tóxico de glucomoringin-isotiocianato (GMG-ITC) indujo apoptosis de células de adenocarcinoma de próstata humano (PC-3).

II.3.3.3 Fibra dietaria

Se ha reportado que la moringa es una excelente fuente de fibra dietaria (24-39%) (Mallillin, *et al.*, 2014; El-Sohaimy *et al.*, 2015). La fibra dietaria tiene la capacidad de promover efectos fisiológicos definidos como: laxación, reducción en los niveles de colesterol y glucosa sanguíneos. De acuerdo con Saura-Calixto (2010), la fibra dietaria se define como una combinación de sustancias químicamente heterogéneas, las cuales no son digeridas ni absorbidas en el intestino delgado, incluyendo polisacáridos de pared celular, almidón resistente, oligosacáridos, proteínas y/o péptidos, entre otros. Dichos compuestos pueden llegar intactos al colon donde algunos pueden ser hidrolizados y fermentados por la microbiota colónica, produciendo ácidos grasos de cadena corta como ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, los cuales se han relacionado con un efecto quimioprotector contra células de cáncer de colon (Gomes *et al.*, 2019b).

II.3.4 Propiedades biológicas de hojas de moringa

Varios estudios *in vitro* han demostrado el potencial antiproliferativo de las hojas de moringa en diferentes tipos de células cancerígenas. Al-Asmari *et al.* (2015), evaluaron el extracto acuoso a partir de hojas de moringa (*Moringa oleifera*) en líneas celulares MDA-MB-231 y HCT-8 de cáncer de colon; el extracto produjo

una importante inducción antiproliferativa y apoptótica en dichas líneas celulares. De igual forma, Tiloke *et al.* (2013) y Jung, (2014) informaron que el extracto acuoso de hojas de moringa ejerció efectos antiproliferativos en células cancerígenas pulmonares A549. Berkovich *et al.* (2013) estudiaron el efecto del extracto acuoso sobre células cancerígenas de páncreas humano Panc-1, p34 y COLO 357, encontrando una inhibición significativa en el crecimiento tras la exposición a 0.75 mg/mL del extracto en todas las líneas celulares pancreáticas. Algunos mecanismos que se han reportado por los cuales el extracto de moringa ejerce su efecto antiproliferativo es la inducción de apoptosis, el cambio de morfología, la fragmentación del ADN internucleosomal y la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) (Ju *et al.*, 2018; Jinghua *et al.*, 2018).

Las hojas de moringa también presentan otras propiedades biológicas como: antioxidante, antihipertensiva y antiinflamatorias (Vongsak *et al.*, 2013; Coz-Bolaños *et al.*, 2018; Adedapo *et al.*, 2018). Se ha reportado que las hojas de moringa se utilizan como agentes hipoglucemiantes e hipocolesterolémicos (Jaiswal *et al.*, 2013; Yassa *et al.*, 2014; Aekthammarat *et al.*, 2019). Además, ejercen efecto radio-protector (Mansour *et al.*, 2014) y poseen propiedades diuréticas (Cheenpracha *et al.*, 2010; Coppin *et al.*, 2013). Debido a los abundantes efectos benéficos que presenta la moringa, hoy en día se han producido diversos productos farmacéuticos, así como suplementos alimenticios que se venden en mercados locales e internacionales (Abdullah *et al.*, 2019). Sin embargo, es necesario realizar más estudios en modelos *in vivo* para corroborar el efecto del consumo de esta planta sobre enfermedades no transmisibles como el cáncer.

III. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, la tasa de mortalidad a causa de las enfermedades no transmisibles como la obesidad, cardiovasculares, diabetes y cáncer, ha presentado un incremento significativo. Diversos estudios demuestran que la alimentación tiene un fuerte impacto en la prevención y/o desarrollo de dichas enfermedades. En lo que respecta al cáncer, principalmente en el cáncer colorrectal, existe una relación directa entre el riesgo a padecer esta patología y la falta de hábitos alimenticios adecuados.

El cáncer colorrectal es considerado como una de las principales causas de muerte en países latinoamericanos. Por ello, algunas investigaciones se han centrado en la búsqueda de alternativas para el tratamiento de este padecimiento. Se ha reportado que componentes de la dieta como algunos compuestos fitoquímicos presentes en los vegetales interfieren con etapas específicas del proceso de la carcinogénesis e inhiben, retardan o revierten la tumorigénesis en estudios *in vivo*. En esta búsqueda de alimentos con capacidad quimioprotectora se ha reportado que la moringa (*Moringa oleifera*) es una importante fuente de compuestos biológicos tales como fibra dietaria, compuestos fenólicos y glucosinolatos, todos ellos relacionados con la prevención en el desarrollo de enfermedades no transmisibles. No obstante, aún no existe suficiente evidencia científica que describa el efecto quimioprotector de la moringa cultivada en México en modelos *in vivo* e *in vitro* de cáncer colorrectal. Por lo tanto, este estudio estuvo enfocado en evaluar las hojas de moringa como potencial agente quimioprotector contra el desarrollo del cáncer colorrectal en modelos *in vivo* e *in vitro*.

IV. HIPÓTESIS

Los compuestos bioactivos (polifenoles, glucosinolatos, péptidos y fibra dietaria) presentes en las hojas de moringa inducirán enzimas antioxidantes mediadas por el complejo Keap1-Nrf2-ARE y atenuarán la respuesta inflamatoria en modelos *in vivo* e *in vitro* de carcinogénesis colorrectal a través de la modulación de la expresión de genes y proteínas (IL-1 β , IL-2, IL-6 y TNF- α) involucrados en la vía canónica de NF- κ B.

Dirección General de Bibliotecas UNO

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

Evaluar el efecto quimioprotector de hojas de moringa (*Moringa oleifera* L) en modelos *in vivo* e *in vitro* de cáncer colorrectal.

V.2 Objetivos específicos

V.2.1. Determinar la composición nutrimental y nutracéutica de hojas de moringa deshidratadas.

V.2.2. Caracterizar el modelo de cáncer colorrectal inducido con AOM/DSS en ratones macho CD-1 y evaluar el efecto preliminar del consumo de hojas de moringa.

V.2.2.2 Evaluar el efecto del consumo de dos dosis preliminares de moringa en un modelo de cáncer colorrectal sobre la ganancia de peso, índice de actividad de la enfermedad, actividad de enzimas fecales, así como en la formación de lesiones colónicas.

V.2.3. Evaluar el efecto de una curva dosis-respuesta de hojas moringa en un modelo *in vivo* de cáncer colorrectal sobre la inducción de enzimas de fase II, marcadores de inflamación e indicadores del daño oxidativo, así como en la modulación de genes relacionados con la respuesta inflamatoria y la carcinogénesis.

V.2.4. Evaluar el efecto antiproliferativo de diferentes extractos (acuoso, metanólico, glucosinolatos) de hojas de moringa en células de cáncer de colon.

V.2.5 Establecer el mecanismo de acción de las hojas de moringa sobre los modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de colon asociado a inflamación.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Materiales

VI.1.1 Reactivos

Éter etílico, metanol, etanol, sulfato de sodio, ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido bórico y verde de bromocresol, se adquirieron de la marca J.T. Baker. Reactivo de Folin, (+)-catequina, rutina, quercetina, vainillina, ácido elágico, cafeico, p-cumárico, kaempferol, ferúlico, gálico, clorogénico, ácido sinápico, α -amilasa, amilogucosidasa, proteasa, pepsina, pancreatina, clorodinitrobencono (CDNB), glutatión reducido (GSH), glucosa-6-fosfato (G6P), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), β -nicotidamida adenina dinucleotido sal fosfato tetrasodium (NADP), albúmina bovina, azoximetano (AOM), dextrán sulfato de sodio (DSS), isotiocianato de bezilo (BITC), oxaliplatino (OX) se obtuvieron de la marca Sigma-Aldrich Chemical. (St. Louis, MO).

Medio esencial mínimo de Eagle (MEM) y piruvato de sodio (100 mM) se obtuvieron de la marca Corning® Cellgro® (Manassas, VA, USA). Antibiótico (penicilina-estreptomicina, 100x) y suero fetal bovino (FBS) se adquirieron de Gibco (Thermo Fisher Scientific). Tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA) y anticuerpos primarios: Bax (sc-20067), Bcl-2 (sc-56018), citocromo C (sc-13156) y GAPDH (sc-25778) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Los anticuerpos secundarios, la IgG anti-ratón y la peroxidasa de rábano picante IgG anti-conejo conjugados, se obtuvieron de GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido). El ensayo de proliferación celular CellTiter 96® AQueous One Solution se adquirió de Promega Corporation (Madison, WI). El kit de ensayo de citotoxicidad LDH Pierce™ se obtuvo de Thermo Scientific (Pittsburgh, PA).

VI.1.2 Material biológico

VI.1.2.1 Material vegetal

Las hojas de Moringa (*Moringa oleifera*) se cosecharon manualmente en 2015-2016 en San Bartolo Tutotepec (Hidalgo, México) a una altitud de 1080 m sobre el nivel del mar (MASL). Se recolectaron tres lotes (L1, L2 y L3) de árboles de una edad de 14 a 19 meses, 2–3 m de altura y una densidad de plantación de 7500 árboles/ha. Las muestras comerciales (C1 y C2) se adquirieron en supermercados locales de la Ciudad de Querétaro (México). Para el estudio *in vitro*, las hojas de moringa utilizadas se cosecharon en Querétaro (Querétaro, México) a una latitud geográfica de 20° 59 '17' 'N y una longitud de 100° 36' 22 " W. Después de la recolección las hojas se liofilizaron inmediatamente (Labconco Freeze Dryer, Lab. Co., Kansas City, MO, USA) y el polvo resultante se almacenó a 4 °C en contenedores sellados hasta su posterior análisis.

VI.1.2.2 Animales de experimentación

Se emplearon en total 80 ratones macho de la cepa CD-1 de 5-6 semanas de edad con un peso aproximado de 22 – 25 g para la primera etapa del estudio y en la segunda etapa con un peso aproximado de 30-32 g. Los animales se adquirieron del bioterio de la Universidad Autónoma de México, campus Juriquilla, Querétaro con Registro SAGARPA-SENASICA No. AUT-B-C-0815-024.

VI.1.2.3 Líneas celulares

Células de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29 (ATCC® HTB-38TM) y HCT116 (ATCC® CCL-247TM) y células normales de colon humano CCD-33Co (ATCC® CRL-1539TM) se adquirieron de la ATCC®.

VI.2 Métodos

VI.2.1 Preparación de la muestra

Las hojas deshidratadas de moringa se molieron y tamizaron en malla del No. 60 para la determinación nutrimental y nutracéutica.

VI.2.2 Determinación de la composición nutrimental de las hojas de moringa

El análisis proximal se realizó siguiendo la metodología descrita por la técnica de la AOAC (2002).

VI.2.2.1 Determinación de humedad (Método 925.09B)

Se pesaron 2 g de la muestra en una cápsula o charola previamente tarada. Luego, se colocó en una estufa a 130 °C por 2 h. Posteriormente se llevó la cápsula con la muestra a un desecador y se registro el peso. El porcentaje de humedad se obtuvo mediante la ecuación siguiente:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso inicial de la muestra} - \text{peso final de la muestra}}{\text{peso inicial de la muestra}} \times 100$$

VI.2.2.2 Determinación de proteínas (Método 954.01)

Se pesó 1 g de la muestra previamente desgrasada, este se colocó en un matraz Kjeldahl, donde se adicionó 1g de sulfato de cobre, 10 g de sulfato de potasio anhidro y 15 mL de ácido sulfúrico. El matraz se colocó en el digestor y se calentó gradualmente. Una vez observado un cambio en el color de la mezcla a verde claro, se detuvo el calentamiento y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó 15 mL de agua destilada para disolver completamente el residuo dentro del matraz y 50 mL de solución de hidróxido de sodio al 40%. Por otra parte, en un matraz Erlenmeyer se añadió 50 mL de ácido bórico al 4%,

previamente preparado. Se destiló hasta recolectar 150 mL y se observó un cambio en la coloración del ácido bórico de morado a verde oscuro. Consecutivamente se retiró del destilador y se valoró con ácido clorhídrico 0.1N. Se utilizó 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína.

$$\% N = \frac{mL \times 0.1 N HCl \times 0,014}{g \text{ muestra}} \times 100$$

$$\% P = \%N \times 6.25$$

VI.2.2.3 Determinación del extracto etéreo (Método 920.39)

Se pesaron 2 g de muestra en base seca en cartuchos de celulosa y se colocaron dentro del aparato de extracción Soxhlet. Se adicionó 100 mL de éter de petróleo a los matraces. Se dejó extraer durante un periodo de 4 h. Transcurrido el tiempo, los cartuchos se colocaron en la estufa a 50 °C hasta peso constante. El porcentaje de extracto etéreo se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%EE = \frac{\text{Peso del extracto} - \text{peso del blanco}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

VI.2.2.4 Determinación de cenizas (Método 923.03)

Se pesaron 2 g de la muestra en una cápsula de porcelana previamente tarada. Se carbonizó sobre la flama de un mechero y se llevó a la mufla a 550 °C. Una vez las cenizas se tornaron blancas (2 h aproximadamente), se llevaron a un desecador y finalmente se registró el peso. El contenido de cenizas se determinó por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Cenizas} = \frac{\text{Peso de las cenizas}}{\text{Peso de la muestra}} * 100$$

VI.2.3 Determinación de la composición nutracéutica de las hojas de moringa

VI.2.3.1 Obtención del extracto metanólico

Para la extracción de los compuestos fenólicos, se utilizó la metodología descrita por Cardador-Martínez *et al.* (2002) con modificaciones, 100 mg de la muestra (tamaño de partícula aproximado de 60 micras), fue colocada en un matraz de 50 mL y se le adicionó 10 mL de metanol. El matraz se protegió de la luz y se mantuvo en agitación por 24 h a 25 °C. Las muestras se centrifugaron a 5000 g por 10 min, el sobrenadante fue utilizado para la determinación de la composición nutracéutica.

VI.2.3.2 Determinación de compuestos fenólicos

Para la cuantificación de los compuestos se siguió la metodología descrita por Ramírez-Jiménez *et al.* (2014). Se utilizó cromatografía líquida acoplada a un detector con arreglo de diodos (HPLC-DAD) en un equipo HPLC Agilent Serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), utilizando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, 4,6 x 250 mm 5. µm). La columna fue controlada mediante termostato a 35 °C ± 0.6 y la tasa de flujo se ajustó a 1 mL/min. La fase móvil consistió en dos disolventes. El disolvente A: agua acidificada con ácido acético al 1% y el disolvente B: acetonitrilo. El gradiente lineal se utilizó fue: 80-83% de disolvente A durante 7 min, 83-60% durante 5 min, 60-50% durante 1 min y 50-85% durante 2 min. La detección se realizó a 280 nm. Se inyectó un volumen de 50 µl y las muestras se analizaron por duplicado. La cuantificación fue llevada a cabo utilizando el método estándar externo con estándares comerciales de (+)-catequina, rutina, 3,7-aempferol, quercetina, vainillin y elágico, cafeico, p-cumárico, ferúlico, gálico, clorogénico y ácido sinápico.

VI.2.3.3 Determinación de glucosinolatos

Para la determinación de glucosinolatos se siguió la metodología descrita por Förster *et al.* (2015). Se utilizó cromatografía líquida acoplada a un detector con arreglo de diodos (HPLC-DAD) en un equipo HPLC Agilent Serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), utilizando una columna Phenomenex Luna C18 (250 mm×4.6 mm, 5 µm). La columna fue controlada mediante termostato a 25 °C ± 0.6 y la tasa de flujo se ajustó a 0.8 mL/min. La fase móvil consistió en dos disolventes. El disolvente A: agua acidificada B: metanol, utilizando el siguiente gradiente lineal: 0-5% de B durante 0-10 min; 5 – 15% de B durante 10 – 25 min; 15-35% B durante 25-34 min; 35-95% B durante 34-40 min. La detección se realizó a 242-252 nm.

VI.2.3.4 Determinación de fibra dietaria total

VI.2.3.4.1 Fibra insoluble

Para la determinación de fibra insoluble, se utilizó la metodología descrita por Shiga *et al.* (2003). En un frasco color ámbar, se agregó 1 g de la muestra pulverizada y previamente desgrasada, 50 mL de solución amortiguadora de fosfato 0.08 mM a pH 6 y 100 µL de α-amilasa. Consecutivamente se incubó a 95 °C por 30 min en baño María, con agitación continua. Seguidamente, se ajustó el pH a 7.5 con la muestra atemperada. Se adicionó 100 µL de proteasa (5 mg/mL) y se incubó a 60 °C por 30 min con agitación continua. Se ajustó el pH a 4 una vez la muestra estaba atemperada. Posteriormente se adicionaron 300 µL de amilogucosidasa y se incubó 30 min a 60 °C con agitación continua. Después de efectuada la incubación se filtró con papel Whatman No. 4, se realizó dos lavados con 15 mL de agua destilada a 60 °C y con 15 mL de etanol al 80%. El papel filtro se dejó secar a 60 °C por 24 h, finalmente se registró el peso obtenido. La diferencia entre el peso del papel filtro se le determinó como la fracción de fibra insoluble.

VI.2.3.4.2 Fibra soluble

De acuerdo con el método para la determinación de fibra insoluble (Shiga *et al.*, 2003), el residuo obtenido en el inciso anterior fue conservado y filtrado nuevamente, se adicionó un volumen igual de etanol al 80 % y se dejó reposar por 12 h. Se filtró en papel Whatman No. 42 previamente pesado y se realizó dos lavados con 15 mL de etanol al 80 % y 2 con 15 mL de acetona. Posteriormente, se dejó secar el papel filtro durante 24 h a 60 °C y finalmente se registró su peso. La diferencia de pesos se interpretó como la fracción de fibra soluble.

VI.2.3.5 Determinación de la capacidad antioxidante

VI.2.3.5.1 Capacidad antioxidante mediante el radical ABTS

La estimación de los valores de la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC) se realizó utilizando el ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico, con la metodología propuesta por Nenadis *et al.* (2004). 20 µL del extracto metanólico obtenido en el inciso VI.2.31 se mezclaron con 230 µL de radical ABTS. Se midió la absorbancia a 570 nm a temperatura ambiente. Los valores TEAC se calcularon con una curva estándar utilizando Trolox y los resultados se reportaron como µmoles equivalentes de trolox por miligramo de muestra (µmol Trolox/mg).

VI.2.3.5.2 Capacidad antioxidante mediante el radical DPPH

La estimación de los valores de la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC) se determinó usando el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), de acuerdo con el método reportado por Fukumoto y Mazza, (2000) adaptado a microplaca. Un total de 20 µL del extracto metanólico se mezcló con 200 µL de DPPH 150 µM en metanol al 80%. Se midió la absorbancia a 520 nm después de 0, 4, 10, 30, 60 y 90 min. Los valores TEAC se calcularon con una curva estándar utilizando trolox y se reportaron los resultados como µmoles equivalentes de trolox por miligramo de muestra (µmol Trolox/mg).

VI.2.4 Estudio *in vivo*

Este estudio fue aprobado por el comité de bioética animal de la Universidad Autónoma de Querétaro (Querétaro, México) con No. CBQ16 / 0921-1. Para el desarrollo del estudio *in vivo* se utilizó el modelo de cáncer de colon asociado a inflamación a través de la inducción con azoximetano (AOM) y dextrán sulfato de sodio (DSS). La evaluación de compuestos con capacidad quimioprotectora en modelos de cáncer de colon inducido con carcinógenos como el azoximetano y promovido con dextrán sulfato de sodio (AOM/DSS) ha sido previamente reportado (De Robertis *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2015). Es importante señalar que el uso de animales con cáncer inducido ha permitido evidenciar la capacidad de algunos componentes de los alimentos para alterar rutas de carcinogénesis, por lo que este modelo fue de gran relevancia para el presente estudio. El modelo *in vivo* constó principalmente de dos etapas consideradas a continuación:

VI.2.4.1 Etapa 1: Implementación o caracterización del modelo de cáncer de colon asociado a inflamación.

Para la implementación del modelo de cáncer de colon con AOM y DSS, se utilizaron 30 ratones macho de la cepa CD-1 divididos aleatoriamente en 5 grupos con n=6 (Grupo 1: control; Grupo 2: 1% DSS; Grupo 3: 1.5% DSS; Grupo 4: 2.5% DSS). Todos los ratones se alimentaron *ad libitum* con dieta estándar (Rodent Lab Chow 5001, Nupec®), la cual tiene una composición de 28% de proteína, 58% de carbohidratos y 13% de grasa. Después de una semana de aclimatación, en el día cero de experimentación se les administró como dosis de iniciación del cáncer, AOM a una concentración de 10 mg/kg de peso corporal, en una sola dosis vía intraperitoneal (*i.p.*), esta dosis fue elegida con base a estudios previos donde se ha reportado una incidencia del 100% de fosas crípticas aberrantes en ratones ICR (Parang *et al.*, 2016). Se realizó la limpieza de la materia fecal a las 12 y 24 h

después de la inducción del cáncer para evitar el riesgo de contaminación con los metabolitos secundarios del AOM excretados por los animales. Al día 7, 21 y 35 de experimentación se les administró DSS en el agua de beber como promotor de inflamación en concentraciones de 1%, 1.5%, 2% y 2.5%, se consideró realizar esta curva dosis-respuesta de DSS debido a la variabilidad en la respuesta a la inflamación reportada en estudios previos con ratones (Figura 8).

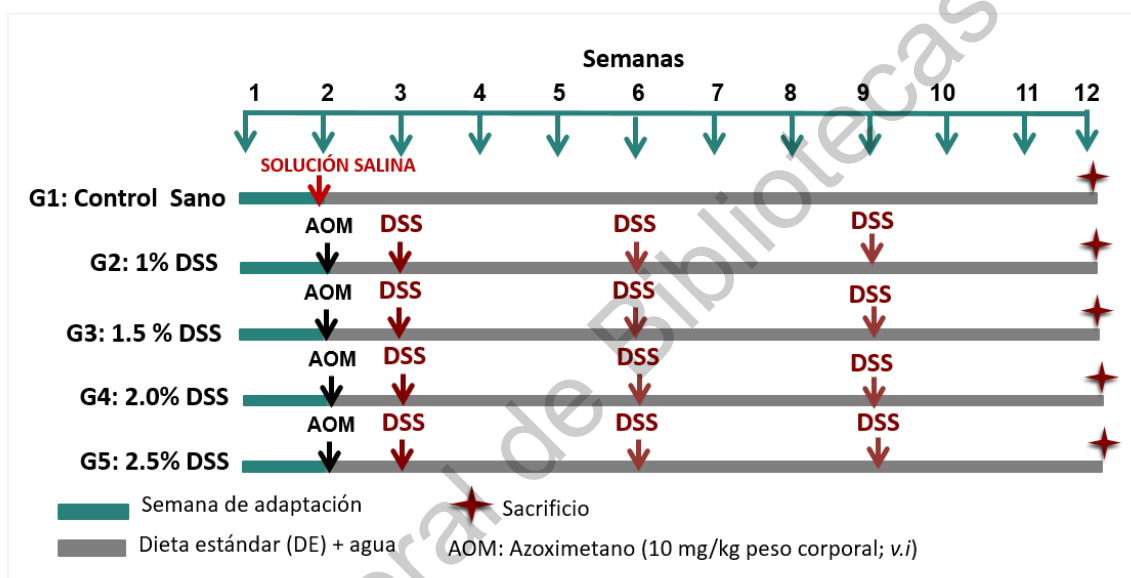


Figura 8. Esquema experimental utilizado para la caracterización del modelo de cáncer de colon asociado a inflamación en ratones macho CD-1

Los parámetros monitoreados durante el estudio fueron peso corporal, consumo de alimento y se analizaron las heces (peso, consistencia, presencia y/o ausencia de sangre), así como índice de actividad de la enfermedad de acuerdo con la escala sugerida por Shi *et al.* (2015). De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis histopatológico se procedió a utilizar la dosis de 1.5% DSS para la segunda etapa de evaluación del efecto quimioprotector de las hojas de moringa.

VI.2.4.2 Etapa 2: Evaluación del efecto del quimioprotector de una curva dosis-respuesta de moringa

Para realizar la evaluación del efecto quimioprotector de las hojas de moringa deshidratadas (HM), se emplearon 48 ratones de la cepa CD-1, los cuales se dividieron aleatoriamente en 6 grupos con n=8. Grupo 1: Control negativo (C-); Grupo 2: Control negativo suplementado con 20% de MO; Grupo 3: Control positivo (C+ (AOM/DSS); Grupo 4: 5% de MO + AOM/DSS; Grupo 5: 10% de MO + AOM/DSS; Grupo 6: 20% de MO + AOM/DSS. Se alojaron 4 ratones por jaula (32cm x 23cm x 22 cm) y se aclimataron por una semana a 22-24 °C con ciclos de luz-oscuridad 12/12 horas, humedad de 50 ± 10%. La duración del experimento fue de 12 semanas. Los animales se alimentaron con dieta basal (Rodent Lab Chow 5001, Nupec®). Los grupos 3, 4, 5 y 6 se trataron con AOM (10 mg/kg peso corporal, 1 sola dosis vía *i.p.*) y 1.5% de DSS en el agua de beber. Después de la semana de adaptación, los grupos 4, 5 y 6 consumieron hojas de moringa durante una semana previo inyección con AOM (Ver Figura 9).

Administración de las hojas de moringa (MO): Las hojas de moringa deshidratadas se molieron y tamizaron en malla No. 60 hasta lograr un tamaño de partícula de 250 µm. Se realizaron cubos de gelatina sin sabor siguiendo el protocolo de Zhang, (2011) para la administración vía oral en ratones. Todo esto se llevó a cabo siguiendo las buenas prácticas de manufactura.

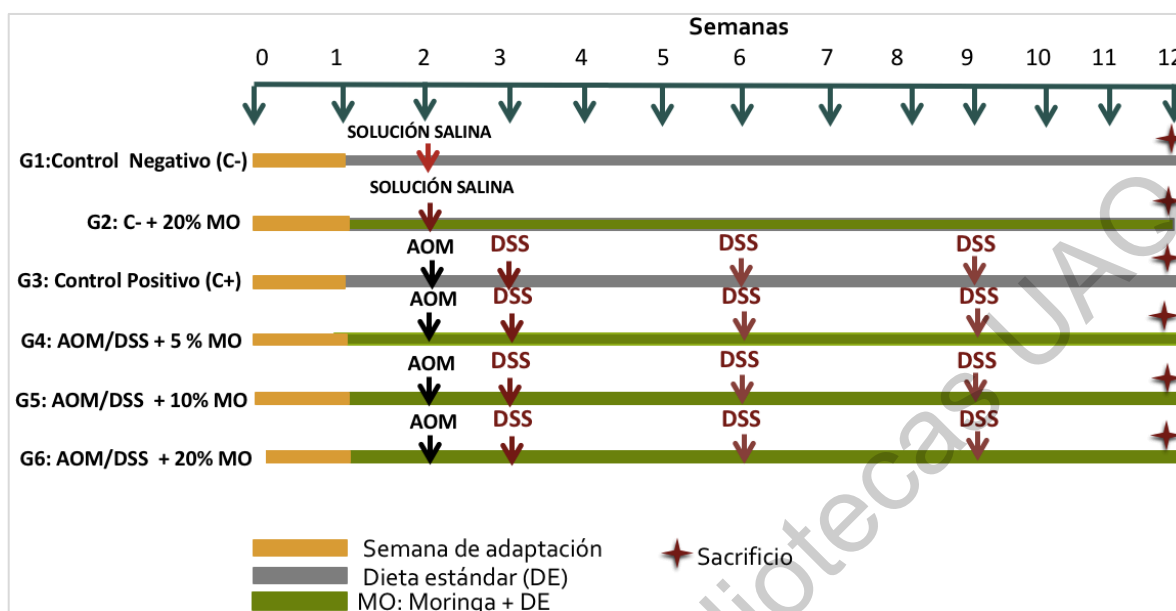


Figura 9. Esquema experimental para la evaluación del efecto quimioprotector de la curva dosis-respuesta de hojas de moringa.

Se monitoreó cada semana el peso corporal, consumo de alimento y se analizaron las heces (peso, consistencia, presencia y/o ausencia de sangre). Las heces recolectadas se congelaron con nitrógeno líquido y almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la determinación de pH, ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y la actividad de la enzima β -glucoronidasa, glucosidasa, triptofanasa y ureasa.

VI.2.4.2.1 Sacrificio de animales y obtención de muestras

El sacrificio de los animales se llevó a cabo utilizando una cámara de sacrificio con dióxido de carbono como método anestésico de los animales. Posteriormente, se realizó una incisión con bisturí esterilizado desde el tórax hasta el ano separando la piel y el músculo para tener acceso a las vísceras abdominales; se realizó un corte de la vena porta para asegurar la muerte clínica con tijeras quirúrgicas esterilizadas. Se determinó el peso corporal, el peso del hígado y peso del bazo durante la necropsia. Se realizó conteo de pólipos presentes a lo largo del colon. Se tomaron muestras de tejido tumoral para ser fijado en formalina 10% por 24 h antes de procesar el tejido y embeberlo en parafina para análisis

inmunohistoquímicos. El material quirúrgico utilizado se dejó remojar con cloro 12 h, posteriormente se lavó y se esterilizó para su posterior almacenamiento (Ver Anexo 1).

VI.2.4.2.2 Medición del pH

El pH del contenido cecal y fecal fue medido empleando el procedimiento descrito por Nakanishi *et al.* (2003). Brevemente, un gramo del contenido cecal, colónico o heces fue suspendido en agua (5 veces su volumen); posteriormente la muestra fue homogenizada y se realizó la medición de pH.

VI.2.4.2.3 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta en contenido cecal y fecal

Los extractos fecales y cecales se prepararon siguiendo la metodología informada por Zhao *et al.* (2006) con modificaciones. Brevemente, 0.5 gramos de contenido cecal o y/o fecal fue suspendido en agua (1:5) y homogenizado. La suspensión fue centrifugada a 8 000 g por 10 min a 4 °C y el pH fue ajustado (2-3) con HCl 0.1 M. Posteriormente, la solución fue filtrada con una membrana (0.45 µm) e inyectada en un cromatógrafo de gases (Agilent 7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) junto a un detector de espectrómetro de masas (Agilent 5975C VL, Agilent Tech.). El volumen de muestra inyectado fue de 1.5 µL. Se empleó una columna Hp 30 M, CARBOWAX 30 M; 25.0 M X 320 µM X 0.30 µm nominal. Como gas acarreador fue utilizado helio a un flujo de 0.5 mL/min. La temperatura inicial del horno fue de 95 °C, posteriormente se mantuvo por 2 min y se elevó a 140 °C a 20 °C/min. Los ácidos acético, propiónico y butírico se emplearon como estándares externos (0-100 mM/mL) para la cuantificación de los AGCC de las muestras.

VI.2.4.3 Determinaciones enzimáticas en contenido fecal.

VI.2.4.3.1 Determinación de la actividad de β-glucoronidasa

La actividad total de la enzima β -glucoronidasa fue determinada empleando el conjugado p-nitrofenil- β -D-glucurónido como sustrato. Brevemente, a 0.5 g de contenido fecal se le adicionó 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.02 M a pH de 7.0. La solución fue homogenizada por medio de un politrón y posteriormente sonicada durante 6 min a 4 °C. La mezcla de reacción consistió en 0.8 mL de p-nitrofenil- β -D-glucurónido 2 mM y 0.2 mL de la solución fecal. La reacción se incubó durante 30 min a 37 °C, para detener la reacción se adicionó 1 mL de NaOH 0.5 N, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. La actividad de la enzima fue medida a 405 nm (An *et al.*, 2011).

VI.2.4.3.2 Determinación de la actividad de β -glucosidasa

La actividad de la glucosidasa fue determinada empleando el conjugado p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido como sustrato. La mezcla de reacción consistió en 0.8 mL de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido 2 mM y 0.2 mL de solución de enzima (muestra fecal suspendida). La reacción se incubó durante 30 min a 37 °C, para detener la reacción se adicionó 1 mL de NaOH 0.5 N, posteriormente se centrifugo a 3000 rpm durante 10 min. La actividad de la enzima se midió a 405 nm (An *et al.*, 2011).

VI.2.4.3.3 Determinación de la actividad de triptofanasa

La actividad de triptofanasa fue determinada mediante una mezcla de reacción que consiste en: 0.2 mL de la solución 1 (2.75 mg de fosfato de piridoxal, 19.6 mg de EDTA disódico dihidratado y 10 mg de albúmina de suero bovino en 100 mL de tampón de fosfato potásico 0.05 M, pH 7.5), 0,2 mL de triptófano 20 mM y 0,1 mL de la solución que contiene la enzima (muestra fecal suspendida). La reacción se incubó durante 1 h a 37°C. Para detener la reacción se añadió 2 mL de la solución 2 (14.7 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 52 mL de H₂SO₄ y 948 mL de etanol al 95%). La mezcla de reacción se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. La actividad de la enzima se midió a 550 nm (An *et al.*, 2011).

VI.2.4.3.4 Determinación de la actividad de la ureasa.

La actividad de triptofanasa se determinó mediante una mezcla de reacción de 0.5 mL que consiste en: 0.3 mL de solución de sustrato de urea (urea 4 mM en tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0) y 0,1 mL de la solución que contiene la enzima. La reacción se incubó durante 30 min a 37 °C. Para detener la reacción se adicionó 0.1 mL de 1 N (NH₄)₂SO₄. Posteriormente, se añadió fenolnitroprusiato (1 mL) e hipoclorito alcalino (NaClO, 1 mL) a la mezcla de reacción detenida y se incubó durante 20 min a 65 °C. La mezcla de reacción se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. La actividad de la enzima fue medida a 603 nm (An *et al.*, 2011).

VI.2.4.4 Determinaciones enzimáticas en colon e hígado

VI.2.4.4.1 Actividad enzimática de la glutatión-S-transferasa (GST) y quinona reductasa (NQO1)

Se determinó la actividad enzimática de la GST y NQO1 siguiendo la metodología propuesta por Habig *et al.* (1974). Las muestras se lisaron directamente con una solución amortiguadora de homogenización que contiene 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 min a 4 °C. Posteriormente, el sobrenadante se ultracentrifugó a 100,000 x g durante 1 h a 4 °C. El contenido de proteína se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), cuantificado con el kit de BCA (Pierce, Inc.), empleando albúmina bovina como estándar (1 mg/mL). 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 min de reacción. Los resultados se expresaron como μ mol de conjugado de 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB)-GSH formado por minuto por mg de proteína. 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 *et al.*, 1992). La actividad de quinona reductasa se midió en presencia de dicoumarol y los resultados se expresaron como nmol/min por mg de proteína.

VI.2.4.4.2 Determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa

La actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) se midió en el colon homogenizado en solución PBS 1X. Se usó el kit de ensayo de actividad colorimétrica MPO (Sigma Aldrich, MAK068-1KT) y se siguieron las indicaciones del fabricante. En este ensayo, MPO cataliza la formación de ácido hipocloroso, que reacciona con la taurina para formar la taurina cloroamina; ésta reacciona con el cromóforo TNB, dando como resultado la formación del producto incoloro DTNB. Una unidad de actividad de MPO se define como la cantidad de enzima que hidroliza el sustrato y genera cloramina de taurina para consumir 1.0 μ moles de TNB por minuto a 25 °C. MPO está contenida en los neutrófilos, por lo tanto, una mayor actividad enzimática indicará una mayor acumulación de neutrófilos en el tejido, comprobando de esta manera la presencia de inflamación en el colon.

VI.2.4.4.3 Nivel de peroxidación de lípidos

El nivel de peroxidación de lípidos (PL) fue medido en colon e hígado homogenizado con PBS al 1X y determinado mediante las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) las cuales representan los niveles de malondialdehído (MDA) un producto final de la lipoperoxidación. El método se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el grupo aldehído del compuesto malonaldehído, formando un aducto (TBA-MDA) cromóforo rosado que puede ser leído en un máximo de absorción de 515 a 553 nm. Se utilizó el kit de ensayo de peroxidación lipídica (MDA) (Sigma Aldrich, MAK085-1KT).

VI.2.4.5 Determinaciones en sangre

VI.2.4.5.1 Análisis de expresión de proteínas en suero

IL-6, IL-10, TNF- α y MCP-1/CCL2 se analizaron en suero utilizando kits comerciales de ensayo de inmunosorción enzimática (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Todas las citocinas se cuantificaron en pg. equivalentes por mililitro de suero.

VI.2.4.6 Análisis histopatológico.

VI.2.4.6.1 Conteo de FCA o lesiones colónicas

El análisis y cuantificación del sistema de FCA o lesiones colónicas se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Bird (1987) con algunas modificaciones, mediante tinción con azul de metileno. Brevemente, a los animales sacrificados se les extrajo el colon, el cual fue abierto longitudinalmente y lavado con una solución de fosfatos de potasio (20 mM) estéril y fría. El colón se dividió en zona proximal y zona distal. La parte entre la zona proximal y distal se considera como la zona media del colon. Una vez obtenidas las zonas colónicas de interés (proximal y distal), se fijaron en paraformaldehído 10% por 24 h. Después de la fijación, el colon fue teñido con azul de metileno 0.2% por 10 min y posteriormente lavado con solución amortiguadora de fosfatos de potasio (20 mM) y agua destilada para quitar el excedente de azul de metileno. La zona distal fue analizada con un microscopio óptico con objetivo 20X.

VI.2.4.7 Análisis de expresión de genes

La extracción total de ARN se realizó a partir del tejido colónico (n = 8). Se utilizó el kit de extracción de ARN "*RNeasy Mini Kit*" y se siguieron las instrucciones del proveedor (Qiagen, MD, USA). La concentración y calidad de ARN se determinó usando un sistema NanoDrop 2000/2000c (NanoDrop Technologies; Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE, USA). El ADNc fue sintetizado a partir del ARN total

del colon de los ratones utilizando el kit de síntesis de ADNc de cadena RevertAid (Thermo Scientific). El qPCR en tiempo real se realizó utilizando el arreglo de PCR “Mouse Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT² Profiler PCR” formato H (Cat. PAMM-181Z, Qiagen, USA), en combinación con un circuito de fluidos integrado Dynamic Array™ 96.96 (Fluidigm), que permite la reacción de 96 Muestras de ADNc con 96 ensayos de genes en una sola corrida (Ver Listado Anexo II). La mezcla maestra de microfluidos qPCR (contiene EvaGreen®) se realizó utilizando el protocolo GE Fast 96x96 PCR + Melt del sistema BioMark™ HD (Fluidigm).

Los valores de Ct se obtuvieron usando el software Biomark & EP1 v4.5.2 (Fluidigm). Se utilizó el software online de Qiagen “GeneGlobe” para analizar la matriz de datos obtenida del PCR. La expresión de los genes en cada tratamiento fue normalizada a la media geométrica de las expresiones de los tres genes de limpieza (Gapdh, Gusb, Hsp90ab1). Los genes se agruparon por análisis de agrupamiento jerárquico utilizando el software BioVinci (BioTuring, San Diego, CA, USA). Finalmente y con el fin de identificar procesos y funciones biológicas, se llevó a cabo un análisis de efecto descendente utilizando el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) v 9.0 (Ingenuity Systems, Inc., Redwood City, CA, USA). Los genes expresados diferencialmente se enviaron a IPA para interpretar las vías de señalización canónica y las funciones de red entre los tratamientos en comparación con el grupo de control.

VI.2.5 Estudio *in vitro*

VI.2.5.1 Cultivo celular

Las líneas celulares HT-29, HCT116 y CCD-33Co se cultivaron en medio mínimo esencial Eagle (MEM) con 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de piruvato de sodio a 37 °C en 5% de CO₂ y 95% aire.

VI.2.5.2 Determinación de la proliferación celular mediante el ensayo MTS

HT-29, HCT116 y CCD-33Co se sembraron a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en placa de 96 pozos. Posteriormente, el medio de cultivo fue suplementado con diferentes concentraciones (0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/mL) del extracto acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH) de hojas de moringa durante 24 h. Se utilizó el ensayo de proliferación de solución acuosa CellTiter 96® que contiene 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal inerte (MTS)) siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega Corporation, Madison, WI). También se evaluó un estándar representativo de glucosinolatos (isotiocianato de bencilo, BITC) y se utilizó oxaliplatino (OX) como fármaco citotóxico eficaz en el tratamiento del cáncer de colon (Alcindor y Beauger, 2011).

VI.2.5.3 Determinación de lactato deshidrogenasa (LDH)

HT-29 y HCT116 se cultivaron en placas de 96 pozos (1×10^4 células/pocillo) y suplementadas con la CI_{50} de cada extracto (AE, ME, GE, GEH), BITC y oxaliplatino (OX) durante 24 h. Después del tratamiento, el medio fue retirado, centrifugado para eliminar los restos celulares (5000 g, 5 min, 25 °C) y agregado a una nueva placa donde se combinó con la mezcla de reacción LDH (Kit de ensayo de Citotoxicidad LDH de Pierce, Thermo Scientific, USA). Células sin tratamiento con PBS y células suplementadas con tampón de lisis (proporcionadas con el kit) se consideraron como el control espontáneo y máximo, respectivamente. La actividad de LDH se expresó en términos de absorbancia y la citotoxicidad celular (%) para cada tratamiento se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{\text{Act. LDH tratamiento} - \text{Act. LDH control espontáneo}}{\text{Act. LDH control máximo} - \text{Act. LDH control espontáneo}} \times 100$$

VI.2.5.4 Medición del nivel de ROS intracelular

Los niveles intracelulares de ROS en las células tumorales se determinaron utilizando el reactivo de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA, Invitrogen, USA). Se sembraron células HT-29 y HCT116 (1×10^4 células/pocillo, 200 μ L) en placas de 96 pocillos y se suplementaron con la CI_{50} de los extractos (AE, ME, GEH), BITC y OX durante 24 h. Después del tratamiento, se añadió H2DCFDA (5 μ M) y las células se incubaron durante 45 min en la oscuridad. La intensidad de fluorescencia se midió con una longitud de onda de emisión/ excitación de 480 y 530 nm, respectivamente.

VI.2.5.5 Ensayo de Citometría de Flujo - Anexina V-FITC

Las células HT-29 y HCT116 se sembraron en placas de 6 pozos (3×10^5 células/pocillo) e incubadas durante 24 h con la CI_{50} de cada extracto diluido en 1% de FBS (v/v). Las células adheridas y no a la placa se lavaron con PBS y se suspendieron en 500 μ l de tampón de unión. Posteriormente se incubaron durante 10 min con anexina V-FITC y yoduro de propidio (PI) siguiendo los pasos del Kit de Detección de Apoptosis de Anexina V-FITC (APOAF-20TST, Millipore-Sigma, USA). Se utilizó un citómetro de flujo (BD LSR II, BD Biosciences, San José, CA) para evaluar el estado de las células (10000 células/evento). El software de análisis Cell Quest Pro™ se usó para detectar células apoptóticas tempranas (anexina-V + /PI), apoptóticas tardías/necróticas (anexina-V+/PI+) y células totales (anexina-V+/PI).

VI.2.5.6 Análisis de Western Blot

VI.2.5.6.1 Preparación del lisado celular y determinación de proteína.

HT-29 y HCT116 se sembraron a una densidad de 3×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos, se trataron con la CI_{50} de los tratamientos durante 24 h. El medio fue retirado y las células se lavaron dos veces con PBS frío. Posteriormente, las células se lisaron usando un sistema de tampón de lisis (RIPA) (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) suplementado con un coctel inhibidor de proteasas

(“*Halt Protease Inhibitor Cocktail*”, 78430, Thermo Fisher, USA) durante 30 min interrumpido (cada 5 min) por un disruptor celular (Microson Ultrasonic Cell Disruptor , Bioz Inc., Los Altos, CA, USA) y centrifugadas a 20000 x g durante 15 min a 4 °C. La concentración de proteína en el lisado celular se cuantificó utilizando el Kit de ensayo de proteína DC™ (BioRad, Richmond, CA, USA) utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

VI.2.5.6.2 Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot

Las muestras de proteínas ajustadas se desnaturalizaron con solución amortiguadora 2x Laemmli que contiene β -mercaptoetanol en baño maría a 95 °C por 5 min. Cantidades iguales de proteína se cargaron en geles con un gradiente de 4-20% de poliacrilamida (BioRad Lab. Inc.) y se corrieron electroforéticamente a 200 V por 30 min. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno) a 100 V por 60 min y posteriormente las membranas se bloquearon con leche en polvo descremada al 0.1% en solución amortiguadora tris salina con Tween 20 (TBST) por 1 h a 4 °C. Después del bloqueo, las membranas se lavaron 5 veces, 5 min cada una con TBST y el anticuerpo primario (BCL2, BAX, CYTC) se añadió a las membranas en la dilución recomendada por el fabricante e incubó a 4 °C durante toda la noche. Posterior a la incubación del anticuerpo primario, las membranas se lavaron con TBST y el anticuerpo secundario se agregó en la dilución recomendada por el fabricante e incubó por 1 h a temperatura ambiente. Al final de la incubación las membranas se lavaron 5 veces, 5 min cada una con TBST y la expresión de proteínas fue detectada utilizando los reactivos quimioluminiscentes A y B (1:1) del Prime Western Blotting kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) y se visualizó utilizando un fotodocumentador GelLogic 4000 Pro Imaging System (Carestream Health Inc., Nueva York, EUA). La expresión de cada proteína fue normalizada contra un control de anticuerpos (GADPH).

VI.2.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar (DE). Las diferencias entre medias para las pruebas de caracterización química y nutracéutica se analizaron mediante la prueba de Tukey-Kramer con el software JMP 8.0. Para el estudio *in vivo*, los grupos se compararon con el control positivo mediante la prueba de Dunnett y entre ellas mediante la prueba de Tukey-Kramer. En el estudio *in vitro*, las comparaciones entre el control negativo (células sin tratamiento), el control positivo (oxaliplatino) y los extractos de moringa se realizaron mediante la prueba de Dunnett. Las diferencias con un valor de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas. Cada experimento se realizó con al menos tres réplicas para la caracterización proximal y nutracéutica y el estudio *in vitro* y al menos 6 réplicas para el experimento *in vivo*. Los coeficientes de correlación entre los compuestos fenólicos libres y la capacidad antioxidante (ABTS / DPPH) se calcularon mediante la prueba de Spearman. Los datos se graficaron usando el programa GraphPad Prism v. 6.0.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1 Composición nutrimental y nutracéutica de hojas de moringa

En el cuadro 1, se presenta los resultados obtenidos para la caracterización nutrimental de los diferentes lotes de hojas de moringa:

Cuadro 1. Contenido de proteína, lípidos, cenizas, humedad y carbohidratos en hojas de moringa.

	Proteína	Lípidos	Cenizas	Humedad	¹ Carbohidratos
L1	35.50 ± 0.07 ^a	7.77 ± 0.18 ^a	14.27 ± 1.15 ^a	11.46 ± 0.06 ^a	30.99 ± 1.04 ^c
L2	31.20 ± 0.67 ^{bc}	6.00 ± 0.24 ^c	13.15 ± 0.52 ^{ab}	11.38 ± 0.13 ^a	38.28 ± 0.50 ^b
L3	33.69 ± 1.81 ^{ab}	7.48 ± 0.13 ^{ab}	13.87 ± 0.56 ^{ab}	11.90 ± 0.22 ^a	33.07 ± 1.82 ^c
C1	30.59 ± 0.71 ^c	5.76 ± 0.36 ^c	10.16 ± 0.24 ^c	10.08 ± 0.47 ^b	43.40 ± 1.03 ^a
C2	30.73 ± 0.85 ^c	6.93 ± 0.27 ^b	12.28 ± 0.14 ^b	11.30 ± 0.11 ^a	38.76 ± 1.09 ^b

Los resultados representan la media de tres réplicas ± DE. Resultados expresados en base seca, excepto humedad. L= Lote (1,2,3); C = Lote comercial (1,2). ¹Calculados por diferencia. Diferentes letras en la misma columna difieren significativamente en la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Las hojas deshidratadas de moringa evaluadas en este trabajo presentaron un mayor contenido de proteína (30.7 - 35.5%) que los reportados por Teixeira *et al.* (2014) y Moyo & Masika (2011) para hojas de moringa cultivadas en la India (28.7-30.3%). El contenido de lípidos en todas las muestras fue similar a los valores reportados por Moyo & Masika (2011) (5-7%), Guzmán Maldonado *et al.* (2015) (3.5 - 7.4%) y Makkar y Becker (1997) (5.4%). El contenido de cenizas (10.16 - 14.27%) concuerda con las características reportadas de esta planta como una fuente importante de minerales como hierro, calcio y potasio (Moyo & Masika, 2011). Algunas de las variaciones nutrimentales presentadas podrían atribuirse a las condiciones climáticas o antecedentes genéticos de la planta, en términos de ecotipo y cultivar (Mallillin *et al.*, 2014), así como a la edad o etapa de madurez de

las hojas (Guzmán Maldonado *et al.*, 2015). El contenido de fibra dietaria total obtenido fue mayor para las muestras L2 y C2 (Cuadro 2). La fibra insoluble fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que la soluble para todos los lotes de moringa evaluados. Se ha informado que las diferencias en el contenido de fibra dietaria de las hojas de moringa están relacionadas con condiciones climáticas y variaciones del suelo (Sánchez-Machado *et al.*, 2010). Diversos autores han reportado que las hojas de Moringa son una excelente fuente de fibra dietaria (El-Sohaimy *et al.*, 2015; Mallillin *et al.*, 2014) y que al ser fermentada por la microbiota colónica puede producir ácidos grasos de cadena corta, tales como: ácido propiónico, acético y butírico (Mallillin *et al.*, 2014) los cuales se les ha visto involucrados con efectos benéficos a la salud (Campos-Vega *et al.*, 2017).

Cuadro 2. Contenido de fibra total dietaria, soluble e insoluble en hojas de moringa

LOTE	Fibra total	Fibra insoluble	Fibra soluble
L1	18.06± 0.89 ^c	16.12± 0.85 ^c	1.94 ± 0.3 ^a
L2	21.05 ± 0.61 ^a	18.75 ± 0.52 ^a	2.29 ± 0.33 ^a
L3	18.22 ± 0.39 ^c	16.48 ± 0.38 ^c	1.74 ± 0.18 ^a
C1	19.01 ± 0.44 ^{bc}	17.13 ± 0.3 ^{bc}	1.88 ± 0.18 ^a
C2	20.01 ± 0.64 ^{ab}	18.15 ± 0.60 ^{ab}	1.86 ± 0.25 ^a

Los resultados representan la media de tres réplicas± DE. L= Lote, C = Lote comercial. Resultados expresados como porcentaje (%). Diferentes letras en la misma columna difieren significativamente en la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

El perfil de compuestos fenólicos libres para las diferentes muestras de hojas de moringa se presenta en el Cuadro 3. El lote 2 (L2) presentó el mayor contenido de ácido gálico, clorogénico, elágico y p-cumárico, así como vainillina, mientras que L1 presentó mayor contenido de ácido cafeico, quercetina y kaempferol. De acuerdo

con la literatura uno de los principales ácidos fenólicos que se ha reportado en hojas de moringa es el ácido clorogénico (Verma *et al.*, 2009).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Cuadro 3. Contenido de compuestos fenólicos libres en hojas de moringa

Compuesto	RT (min)	L1	L2	L3	C1	C2
<i>Ácidos</i>						
<i>Hidroxicinámicos</i>						
Ácido gálico	1.8	63.34 ^b ± 0.23	76.71 ^a ± 0.09	74.97 ^a ± 2.66	44.23 ^c ± 0.99	63.73 ^b ± 4.84
Ácido clorogénico	2.0	180.45 ^e ± 0.87	707.42 ^a ± 1.21	257.61 ^d ± 4.52	495.19 ^b ± 3.15	447.29 ^c ± 1.48
Ácido cafeico	2.8	8.94 ^a ± 0.04	6.90 ^b ± 0.18	3.08 ^c ± 0.11	7.46 ^b ± 0.27	2.74 ± 0.11
Ácido elágico	3.8	LDL	217.5 ^a ± 11.08	LDL	LDL	119.03 ^b ± 9.7
Ácido <i>p</i> -Cumárico	4.4	120.37 ^a ± 1.21	123.75 ^a ± 0.38	71.48 ^b ± 1.66	70.15 ^c ± 0.29	94.07 ^b ± 0.14
Ácido sinápico	5.1	LDL	LDL	LDL	LDL	LDL
<i>Hidroxibenzaldehidos</i>						
Vainillina	4.9	79.88 ^d ± 0.86	291.95 ^a ± 0.78	76.74 ^d ± 2.04	117.83 ^c ± 0.43	195.52 ^b ± 0.45
<i>Flavonoides</i>						
Rutina	3.3	21.91 ^d ± 0.23	54.24 ^b ± 0.03	17.74 ^e ± 0.73	33.12 ^c ± 0.09	138.11 ^a ± 0.56
Catequina	2.2	1.21 ^b ± 0.01	LDL	2.64 ^a ± 0.02	LDL	LDL
Morin	12.2	5.61 ^b ± 0.14	2.60 ^{bc} ± 0.21	2.55 ^{bc} ± 0.28	1.78 ^c ± 0.04	13.96 ^a ± 1.92
Quercetina	13.3	27.58 ^a ± 0.23	14.07 ^b ± 0.01	3.91 ^c ± 0.07	3.64 ^c ± 0.04	1.94 ^d ± 0.01
Kaempferol	14.7	14.71 ^a ± 0.69	5.90 ^b ± 0.39	2.88 ^c ± 0.03	3.23 ^c ± 0.16	2.82 ^c ± 0.13

Resultados expresados como la media de tres réplicas ± DE. µg eq. compuesto fenólico /g muestra seca. RT: tiempo de retención. L= Lote (1,2,3); C =Lote comercial (1,2). Diferentes letras en la misma fila difieren significativamente en la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Otros estudios han reportado hasta doce flavonoides en hojas de moringa, incluyendo glucósidos de quercetina y kaempferol como componentes principales (Coppin *et al.*, 2013). Los valores de ácido gálico (44.23 - 76.71 µg/g) obtenidos son similares a los reportados por El-Sohaimy *et al.* (2015) (hasta 77.45 µg/g) en extractos metanólicos de hojas deshidratadas de moringa. De igual forma el contenido de ácido clorogénico (180.45 - 707.42 g / g) y ácido elágico (119.03 - 217.5 µg/g) concuerdan con los reportados por Verma *et al.* (2009) para hojas de moringa deshidratadas (485.5 µg/g y 189.1 µg/g, respectivamente).

La actividad antioxidante obtenida por los métodos DPPH y ABTS para las diferentes muestras se presenta en el cuadro 4. L1, L2 y C1 presentan un comportamiento similar, mientras que L2 y C2 exhibieron una mayor capacidad antioxidante. Los resultados obtenidos para ABTS concuerdan con lo reportado por Pari *et al.* (2007) para un extracto metanólico al 60% (v/v) de hojas de moringa (636 ± 2,4 mol eq. Trolox / g). De igual forma, la actividad antiradical (% ARA) encontrada por los ensayos de DPPH y ABTS se encuentra dentro de lo reportado por Fitriana *et al.* (2016) (90.59 % - 94.99%) y Moyo *et al.* (2012) (83.56%).

Cuadro 4. Capacidad antioxidante de hojas de moringa

LOTE	ABTS		DPPH	
	% ARA	¹ TEAC	% ARA	¹ TEAC
L1	91.07 ± 0.27	714.73 ^b ± 2.29	82.42 ± 0.51	646.67 ^d ± 4.43
L2	95.25 ± 0.66	749.83 ^a ± 5.52	87.28 ± 0.44	688.67 ^a ± 3.81
L3	91.87 ± 0.65	721.47 ^b ± 5.48	81.51 ± 0.21	638.74 ^d ± 1.79
C1	92.99 ± 0.72	730.82 ^b ± 6.01	84.11 ± 0.21	661.22 ^c ± 1.85
C2	94.23 ± 0.37	741.25 ^a ± 3.14	85.97 ± 0.68	677.33 ^b ± 5.87

Los resultados representan la media de tres réplicas ± DE. Lote (1,2,3) = Lote, C = Lote comercial (1,2). Diferentes letras en la misma columna difieren significativamente en la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Capacidad antioxidante expresada como TEAC: µmol eq trolox/ g muestra. % ARA: porcentaje de actividad antirradical.

Los antioxidantes desempeñan un papel importante en la inhibición y eliminación de radicales libres, proporcionando una protección significativa contra el daño oxidativo (Sreelatha y Padma, 2009). Los compuestos antioxidantes en la interacción con radicales como DPPH o ABTS, transfieren un electrón o un átomo de hidrógeno al radical, para poder neutralizarlo. El grado de decoloración indica el potencial antioxidante del extracto evaluado y su capacidad para eliminar radicales libres (Re *et al.*, 1999; Verma *et al.*, 2009). De acuerdo con lo anterior, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que los extractos de hojas de moringa tienen una potente actividad antioxidante contra los radicales libres. Con base en los coeficiente de correlación de Spearman ($p < 0.05$) el ácido clorogénico, la vainillina y la rutina fueron los principales contribuyentes a la actividad antioxidante de las hojas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Correlación de Spearman entre compuestos fenólicos libres y capacidad antioxidante

Compuesto fenólico	ABTS	DPPH
Ácido gálico	0.29	0.12
Ácido clorogénico	0.87*	0.87*
Ácido cafeico	-0.18	0.19
Ácido elágico	0.17	0.48
Vainillina	0.91*	0.95*
Rutina	0.69*	0.67*
Morin	0.31	0.34
Quercetina	-0.47	-0.12
Kaempferol	-0.58	-0.21

Los coeficientes de correlación entre los compuestos fenólicos libres y la capacidad antioxidante (ABTS / DPPH) se calcularon mediante Spearman's Test. Los números en negrita indican coeficientes de correlación estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

El contenido de glucosinolatos en las diferentes muestras de hojas de moringa se presenta en el Cuadro 6. El lote 2 (L2) presentó el mayor contenido de glucomoringin (GMG, 4-(α -L-Rhamnosyloxy)-benzyl glucosinolato) y sus formas (A, B, C) seguido de los lotes L3 y L1. Contenidos mayores de glucosinolatos intactos fueron reportados por Förster *et al.* (2015) con un intervalo entre 105 -115 μ mol/g muestra seca. Estas variaciones podrían ser atribuidas a la hidrólisis enzimática del glucosinolato durante el proceso de extracción. De acuerdo con Fahey *et al.* (2018), es probable que muchas de las propiedades medicinales, como el tratamiento del cáncer, la regulación de los niveles de glucosa en sangre y la antibiosis que durante mucho tiempo se han atribuido a *M. oleifera* en la medicina tradicional, sean atribuibles a su contenido de glucosinolatos o al producto de su hidrólisis (isotiocianatos). Por ejemplo, se ha reportado que el 4- α -L-ramnopiranosiloxi bencilo isotiocianato (4RBITC), originado por la hidrólisis de "glucomoringin" es un potente antibiótico selectivo contra *Helicobacter pylori* (Haristoy *et al.*, 2005). De esta forma, un número creciente de estudios epidemiológicos, animales y clínicos han vinculado los glucosinolatos de la dieta y sus isotiocianatos con la protección contra enfermedades crónicas principalmente a través de la inducción de enzimas antioxidantes mediada por Keap1-Nrf2-ARE (Fahey *et al.*, 2018).

Cuadro 6. Contenido de glucosinolatos en hojas de moringa

Glucosinolato	RT (min)	L1	L2	L3
Glucomoringin (GMG)	21.3	19.04 \pm 0.68 ^c	24.51 \pm 2.09 ^a	22.51 \pm 1.59 ^b
Glucomoringin acetate A	28.5	0.95 \pm 0.17 ^a	1.01 \pm 0.06 ^a	1.00 \pm 0.06 ^a
Glucomoringin acetate B	29.4	1.58 \pm 0.15 ^c	3.81 \pm 0.67 ^a	2.91 \pm 0.77 ^b
Glucomoringin acetate C	37.8	15.69 \pm 2.14 ^c	22.06 \pm 4.08 ^a	20.06 \pm 2.88 ^b

Los resultados representan la media de tres réplicas \pm DE. Lote (1,2,3) = Lote. Diferentes letras en la misma fila difieren significativamente en la prueba de Tukey ($p < 0.05$). RT: tiempo de retención. Resultados expresados como μ mol/g muestra seca.

VII.2 Implementación y/o caracterización del modelo de cáncer CCR inducido con AOM/DSS.

La variación de peso y el índice de actividad de la enfermedad durante las 12 semanas de experimentación en los grupos tratados con AOM y diferentes dosis de DSS (1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%) se presenta en la Figura 10. El control sano alcanzó un peso aproximado de 45 ± 4 g el cual corresponde con lo reportado para ratones macho de la cepa CD-1 de acuerdo con la ficha técnica del proveedor (ENVIGO). Durante las primeras 9 semanas no se reportaron diferencias significativas entre los diferentes grupos, sin embargo, después de dicha semana los grupos tratados con las dosis de 2.0 y 2.5% presentan una disminución significativa del peso. Se evidenció un índice de actividad de enfermedad mayor en los grupos inducidos durante las semanas 4, 7 y 10, las cuales fueron posteriores a los ciclos de DSS. Así mismo, la puntuación del IAE se vio afectado por el incremento en la dosis de DSS. Durante la semana 10, los ratones que se trataron con la dosis de 2.5% de DSS no resistieron el tratamiento. Tanaka *et al.* (2003) reportan que el DSS provoca la pérdida de peso en ratones CD-1 debido a los efectos que produce como presencia de sangre en heces hasta diarrea severa.

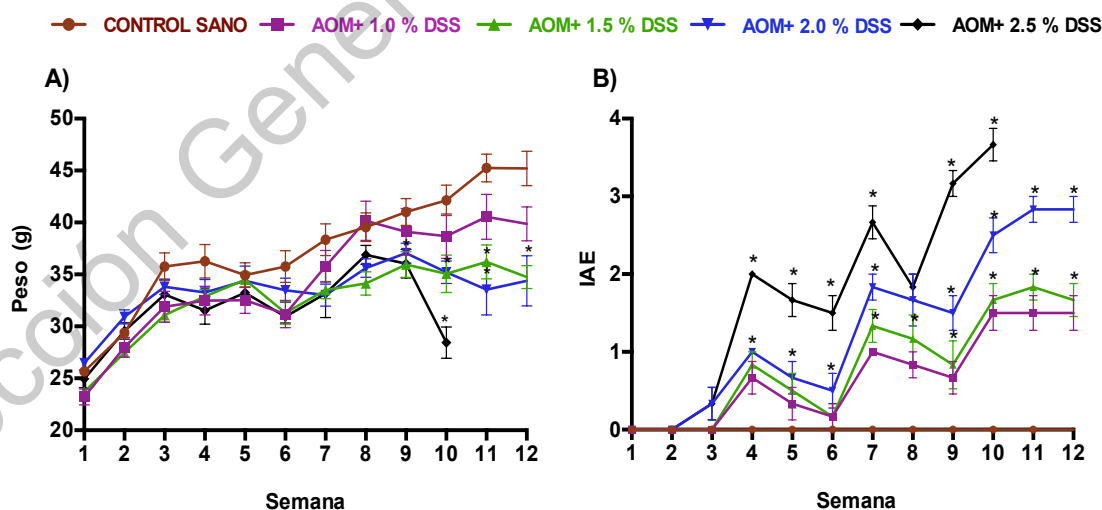


Figura 10. Efecto del tratamiento con AOM/DSS sobre (A) peso corporal e (B) Índice de Actividad de la Enfermedad en ratones macho CD-1.

El efecto de la inducción con AOM/DSS sobre el peso de hígado y colon y longitud de colon se muestra en el cuadro 8. No hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en el peso del hígado para ningún grupo. Estos resultados, podrían indicar que el tratamiento con AOM/DSS no afecta de manera significativa el hígado en ratones de la cepa CD-1 en el tiempo y condiciones establecidas. Por su parte, Miyamoto *et al.* (2007) informaron que no hubo cambios significativos en el peso del hígado para la cepa de ratones CD-1 en un modelo de CCR inducido con AOM y 1.0% de DSS. Respecto al peso y longitud de colon, los grupos tratados con dosis de 1.5% y 2.0% de DSS no presentaron diferencia significativa entre sí, sin embargo, respecto al control sano y al grupo tratado con 1.0% de DSS si presentaron diferencia estadística ($p < 0.05$). En la Figura 11, se muestran fotos representativas del colon de cada grupo evaluado.

Cuadro 7. Efecto de la inducción con AOM/DSS sobre el peso y longitud de colon y peso de hígado de ratones CD-1.

Grupo	Hígado	Colon	Longitud de colon ¹
CONTROL SANO	2.70 ± 0.34 ^a	0.48 ± 0.11 ^b	12.58 ± 0.49 ^a
AOM + 1.0 %DSS	2.65 ± 0.21 ^a	0.45 ± 0.13 ^b	11.12 ± 0.12 ^b
AOM + 1.5 %DSS	2.41 ± 0.16 ^a	0.71 ± 0.24 ^a	8.98 ± 0.63 ^c
AOM + 2.0 %DSS	2.36 ± 0.25 ^a	0.85 ± 0.05 ^a	8.15 ± 0.54 ^c

Resultados expresados como la media ± SE. n=6. ¹Longitud de colon expresada en centímetros (cm).

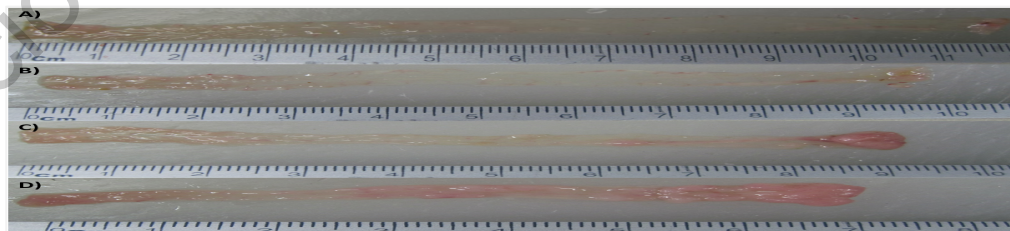


Figura 11. Fotos representativas del colon abierto en grupos tratados con AOM/DSS. A) Control sano; B) AOM + 1.0 %DSS; C) AOM + 1.5 %DSS; D) AOM + 2.0 %DSS

La Figura 12 muestra las imágenes representativas del estudio histopatológico para cada uno de los grupos evaluados. Como era de esperar, el control sano presentó una arquitectura colónica preservada. Los grupos inducidos con AOM y diferentes dosis de DSS presentaron un incremento en la actividad mitótica y una mayor estratificación de los núcleos. Se evidenció que los grupos tratados con 1.5% y 2.0% de DSS, presentaron una deformación de la arquitectura colónica y actividad mitótica similar. Se ha reportado que el modelo de cáncer colorrectal inducido con AOM/DSS muestra típicamente crecimiento adenomatoso antes de mostrar alguna degeneración maligna e invadir la pared intestinal, así mismo se ha evidenciado que su evolución depende del tiempo de administración y la dosis de DSS (Okayasu *et al.*, 2002; De Robertis *et al.*, 2011).

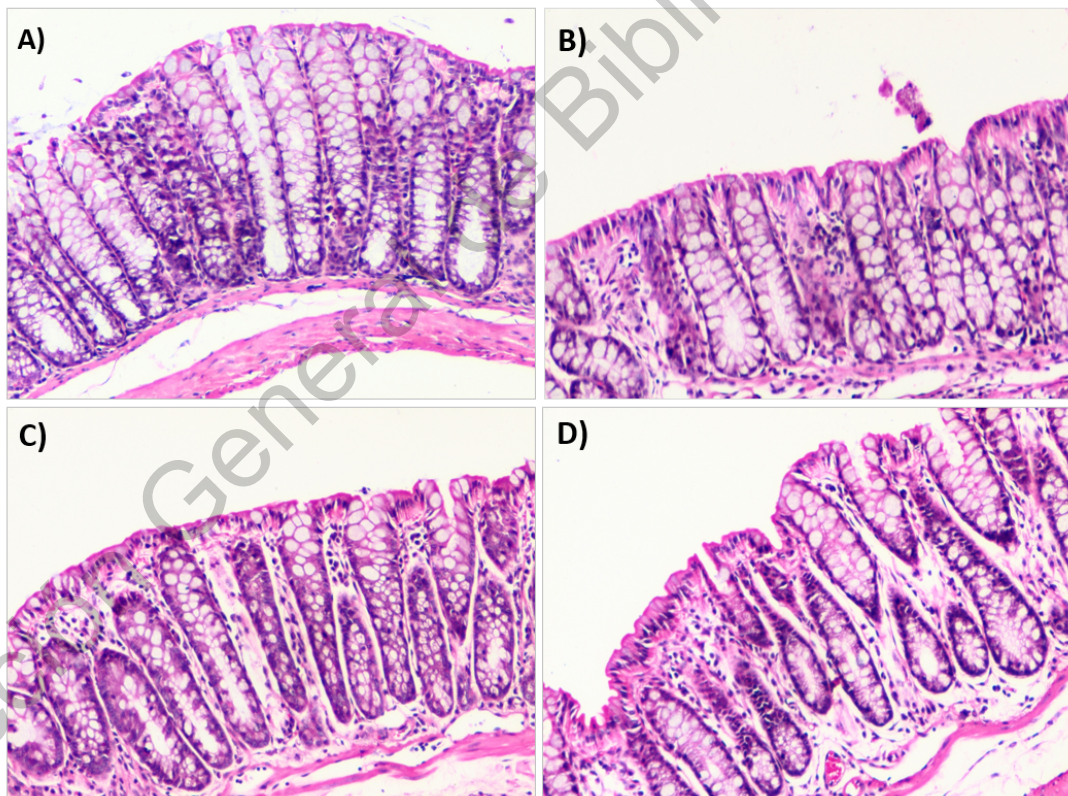


Figura 12. Imágenes representativas de lesiones microscópicas de colon (100X). Tinción con H & E. A) Control Sano; B) AOM + 1.0 % DSS; C) AOM/DSS + 1.5 % DSS; D) AOM/DSS + 2.0 % DSS.

VII.3 Efectos preliminares del consumo de moringa sobre el modelo de CCR

Se evaluó el efecto preliminar del consumo de dos dosis de moringa (2.5 % y 5.0% v/v). La selección de las dosis preliminares de *Moringa oleifera* se basó en el contenido calórico similar de las dietas administradas (3.37 kcal/g; Rodent Lab Chow 5001, Nupec®). Este estudio fue realizado durante el mismo tiempo de la caracterización del modelo de CCR. Por lo tanto, se empleó el grupo control sano y el control inducido (AOM + 2.0% DSS). El efecto del consumo de moringa sobre ganancia de peso y el IAE se muestra en la Figura 13. Después de la semana 10, el peso corporal del control inducido (G2) fue significativamente menor ($p < 0.05$) que el grupo control sano (G1). Esta tendencia en la pérdida de peso en grupos inducidos con AOM y DSS ha sido reportada por autores como Tanaka *et al.* (2003) en ratones de la cepa CD-1. La Figura 13B muestra la puntuación del IAE para todos los tratamientos. Los grupos suplementados con moringa (G3, G4) presentaron una disminución significativa ($p < 0.05$) en los valores de IAE en comparación con el control positivo (G2) durante todo el experimento, siendo particularmente notable el tratamiento con moringa al 5%. Shi *et al.* (2015) reportaron valores de IAE similares en un modelo de cáncer colorrectal inducido con AOM/DSS.

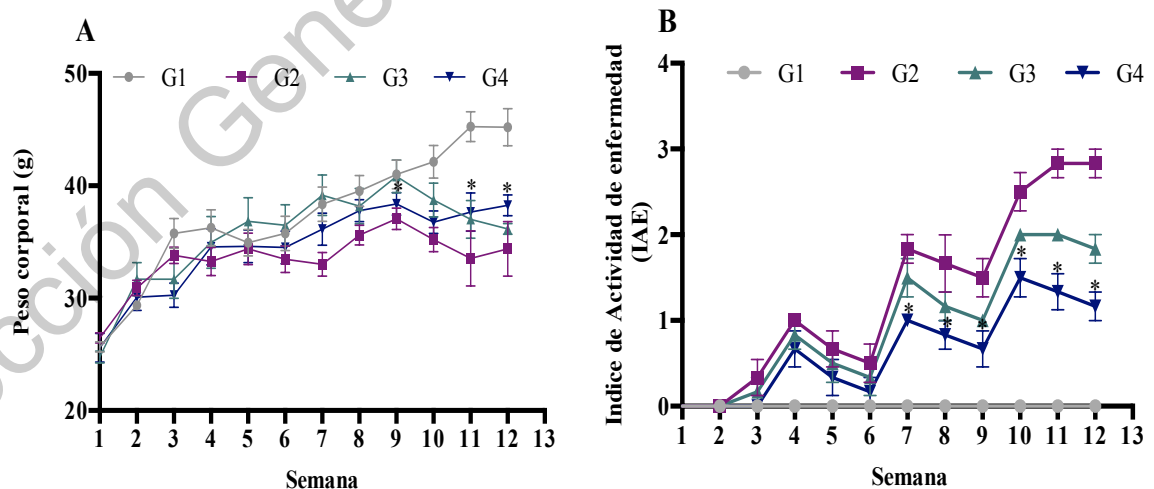


Figura 13. Efecto del consumo de moringa sobre la (A) Ganancia de peso y (B) Índice de actividad de la enfermedad (IAE). G1: Control sano; G2: Control positivo (AOM + 2.0% DSS); G3: AOM/DSS+ 2.5 % moringa y G4: AOM/DSS + 5.0 % moringa.

El efecto del consumo de moringa sobre el peso de hígado y colon y longitud de colon se muestra en el cuadro 9. No se presentó diferencias significativa ($p < 0.05$) respecto al peso del hígado en ninguno de los grupos evaluados. Con respecto al peso del colon, el grupo suplementado con 5.0% de moringa mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación con el control positivo (G2). La longitud media de colon para el control positivo fue significativamente más corta que la longitud media del colon del control sano y los grupos suplementados con moringa. Aunque una longitud del colon más corta podría inferir el "síndrome del intestino corto", la relación entre la longitud y el peso del colon se ha utilizado como parámetro de referencia en pacientes con CCR (Sadahiro *et al.*, 1991). Por su parte, el acortamiento del colon se ha empleado como un índice visual que refleja la severidad de la inflamación colorrectal (Chen *et al.*, 2016; Oficjalska *et al.*, 2015).

Cuadro 8. Efecto del consumo de moringa sobre el peso y longitud de colon y peso de hígado de ratones CD-1.

	Tratamiento	Hígado	Colon	Longitud de colon ¹
G1	Control Sano	2.70 ± 0.34 ^a	0.48 ± 0.11 ^c	12.58 ± 0.49 ^a
G2	Control Positivo (AOM/DSS)	2.36 ± 0.25 ^a	0.85 ± 0.05 ^a	8.15 ± 0.54 ^c
G3	AOM/DSS + 2.5 % MO	2.38 ± 0.27 ^a	0.79 ± 0.04 ^a	10.33 ± 1.02 ^b
G4	AOM/DSS + 5.0 % MO	2.52 ± 0.07 ^a	0.65 ± 0.07 ^b	11.13 ± 1.10 ^b

Resultados expresados como la media ± SE. n=6. **G1**: Control sano; **G2**: Control positivo (AOM/DSS); **G3**: AOM/DSS+ 2.5 % moringa; **G4**: AOM/DSS + 5.0 % de moringa.

La longitud de colon fue mayor en los grupos suplementados con moringa (G3 y G4) mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al control positivo (G2), lo que podría suponer que los tratamientos con moringa reducen la inflamación colorrectal. De igual forma, se pudo evidenciar en la relación peso/longitud de colon que los grupos suplementados con moringa reportaron

diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control positivo (Figura 14).

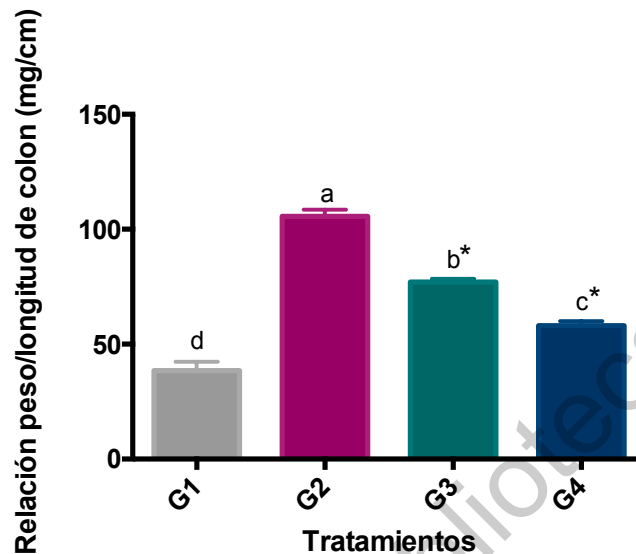


Figura 14. Efecto del consumo de moringa sobre la relación peso/longitud de colon. G1: Control sano; G2: Control positivo (AOM/DSS); G3: AOM/DSS+ 2.5 % moringa; G4: AOM/DSS + 5.0 % de moringa. Asteriscos sobre las barras expresan diferencias significativas por la prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos para el análisis histopatológico se presentan en la Figura 15. El control sano (Figura 15A) presentó una arquitectura del colon intacta y su epitelio preservado. El control positivo presentó en su mayoría una ulceración de la mucosa colónica con displasia focal, el cual se caracterizó por una alteración elevada de la arquitectura de las criptas con estructuras tubulares similares a vesículas, así como una importante estratificación de los núcleos y una elevada actividad mitótica. Autores como Shi *et al.* (2015), han reportado que la displasia de la mucosa colónica se puede definir por núcleos atestados, alargados y pseudoestratificados. Todos los grupos tratados con AOM (Figura 15B, C y D) mostraron un aumento en la actividad mitótica de las criptas en comparación con el grupo de control (Figura 15 A), lo que puede sugerir una regeneración en respuesta a la lesión inducida por AOM (Waly *et al.*, 2014). Los grupos suplementados con 2.5 y 5.0% de moringa presentaron una menor estratificación de núcleos y criptas mayormente preservadas respecto al control positivo. Esto podría estar evidenciando un posible efecto quimioprotector de las hojas moringa, sin embargo,

es necesario confirmar estos resultados con la evaluación del consumo de una curva dosis-respuesta de hojas de moringa.

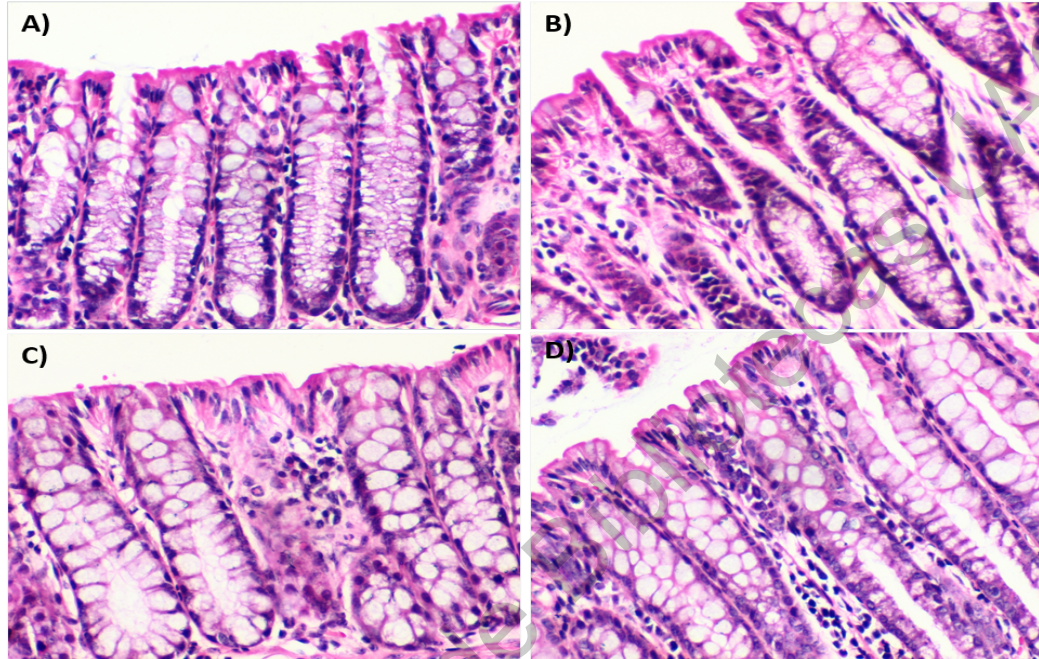


Figura 15. Imágenes representativas de lesiones colónicas inducidas por AOM/DSS (300X). Tinción con H & E. A) Control Negativo; B) Control Positivo (AOM/DSS); C: AOM/DSS + 2.5 % MO; D: AOM/DSS + 5.0 % MO.

El efecto del tratamiento con hojas de moringa sobre la actividad enzimática de β -glucosidasa y β -glucuronidasa se presenta en la Figura 17. La suplementación con moringa al 5% disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la actividad de las enzimas evaluadas. La actividad incrementada de β -glucosidasa y β -glucuronidasa en el control positivo podría sugerir el proceso de degradación metabólica de los carcinógenos. Las actividades β -glucuronidasa y β -glucosidasa en el intestino juegan un papel importante en la generación de metabolitos tóxicos, activos y cancerígenos a partir de compuestos inactivos que pueden implicar efectos adversos tales como la promoción de la formación de tumores en diferentes sitios, incluyendo el intestino grueso; por lo tanto, estas dos enzimas se han convertido en biomarcadores ampliamente investigados en CCR (Zhu *et al.*, 2013). Se ha informado sobre la relación entre la disminución de la actividad enzimática fecal de

la β -glucosidasa y la β -glucuronidasa con la atenuación de la carcinogénesis del colon (Verma y Shukla, 2013). Por otra parte, se ha reportado que la moringa es una fuente de fibra dietaria fermentable por la microbiota intestinal, mejorando su composición y otros factores *in vivo* como el pH y la disponibilidad del sustrato. Como se ha reportado las hojas de moringa son fuente de fibra dietaria insoluble, la cual se ha reportado que mejora las poblaciones de *Bifidobacterium*, conduciendo a una baja actividad de β -glucosidasa y β -glucuronidasa y estimulando la reducción de *E. coli* y *Clostridium sp.* cepas, comúnmente conocidas por su mayor actividad β -glucosidasa y β -glucuronidasa (Rowland *et al.*, 2018).

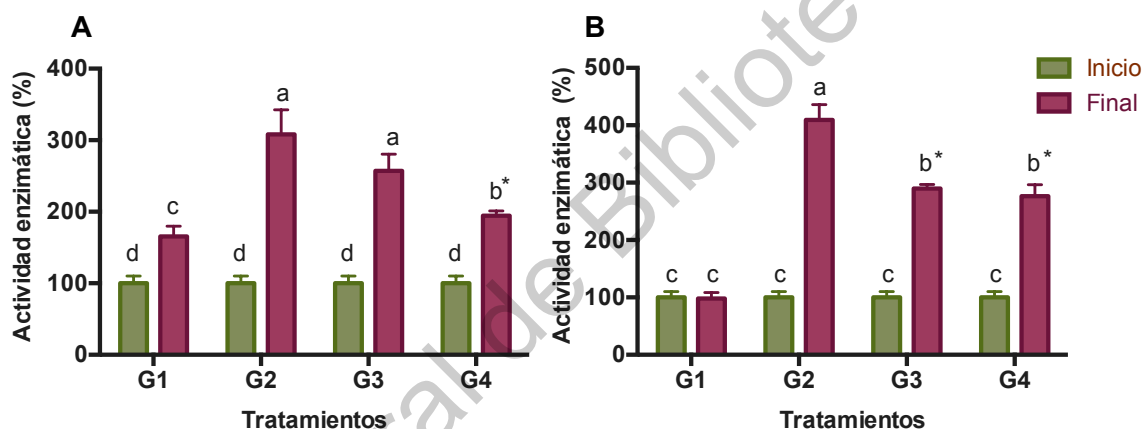


Figura 16. Efecto del consumo de moringa sobre la actividad enzimática de (A) β -glucosidasa (B) β -glucuronidasa. Asteriscos sobre barras del mismo color expresan diferencias significativas por la prueba de Dunnett ($p < 0.05$). G1: Control Negativo; G2: Control Positivo (AOM/DSS); G3: AOM/DSS + 2.5 % MO; G4: AOM/DSS + 5.0 % MO.

La actividad enzimática de triptofanasa y ureasa antes y después del tratamiento con hojas de moringa se presenta en la Figura 17. Se evidencia una disminución de la actividad enzimática de la triptofanasa (Figura 17A) en el grupo suplementado con 5.0 % de moringa respecto al control positivo. Se ha informado que la triptofanasa convierte el triptófano en indol, amoníaco y ácido pirúvico, los cuales han sido relacionados con diferentes tipos de cáncer como el de vejiga e intestino (Roager y Licht, 2018). La actividad enzimática de la ureasa se redujo significativamente ($p < 0.05$) con 2.5 y 5% de tratamiento con MO (Figura 17B). Se ha reportado que una disminución en la actividad de la ureasa es importante debido

a que esta enzima favorece la producción de amoníaco y dióxido de carbono, unos de los principales promotores de la conversión de procarcinógenos en carcinógenos en el colon. La presencia de amoníaco en el colon provoca una elevación interna del pH (Azcárate-Peril *et al.*, 2011). Este incremento de pH afecta negativamente a la microbiota intestinal y aumenta el número de bacterias putrefactas en gran medida productoras de enzimas como la β -glucosidasa y β -glucuronidasa (Zhu *et al.*, 2013). Challa *et al.* (1997) informaron una correlación débil pero positiva entre el aumento del pH del colon y el incremento en el número de fosas cripticas aberrantes (FCA).

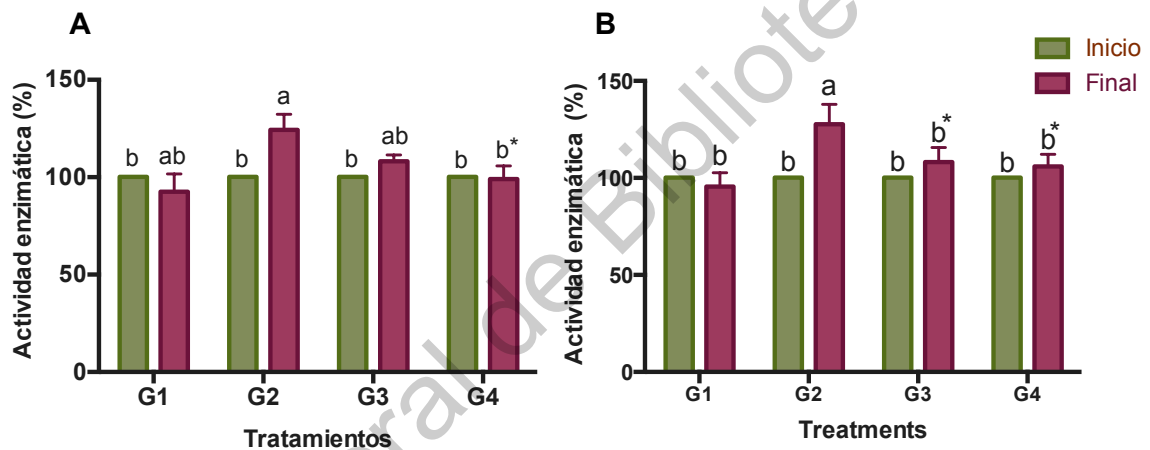


Figura 17. Efecto del consumo de moringa sobre la actividad enzimática de (A) Triptofanasa y (B) Ureasa. Asteriscos sobre barras del mismo color expresan diferencias significativas por la prueba de Dunnett ($p < 0.05$). G1: Control Negativo; G2: Control Positivo (AOM/DSS); G3: AOM/DSS + 2.5 % MO; G4: AOM/DSS + 5.0 % MO.

Una vez implementado el modelo de CCR asociado a inflamación y la evaluación del efecto preliminar de las hojas moringa sobre dicho modelo, se llevo a cabo la etapa de evaluación de la curva dosis-respuesta de moringa (5%, 10% y 20%). Para este experimento se utilizó AOM (10 mg/kg pc) y seleccionó la dosis de 1.5% de DSS con el fin de evaluar el efecto quimioprotector de las dosis de moringa sobre estadios tempranos del modelo de cáncer CCR asociado a inflamación.

VII.4 Efecto del consumo de una curva dosis-respuesta de moringa en ratones macho CD-1 inducidos con azoximetano y dextrán sulfato de sodio.

En la Figura 18 se presenta el efecto del consumo de las diferentes dosis de moringa (5%, 10% y 20%) sobre el peso corporal y la ingesta de alimento en ratones macho CD-1 durante las 12 semanas de tratamiento. Se empleó un control negativo adicional (C- + 20% MO) suplementado con la dosis más alta de moringa (20%) a fin de descartar efectos negativos como pérdida de peso o efectos adversos que pudiese ocasionar las hojas de moringa en dicha concentración. No se reportaron diferencias significativas ($p < 0.05$) durante las primeras 6 semanas de tratamiento, sin embargo, durante la semana 9, el control positivo (C+ AOM/DSS) presenta una disminución significativa del peso corporal respecto al control negativo y los grupos suplementados con moringa. Respecto a la ingesta de alimento no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los grupos, sin embargo, se puede observar una ligera disminución durante la semana 9 en los grupos tratados con AOM/DSS. Como se ha mencionado anteriormente, la disminución en el peso corporal podría ser atribuida al consumo del DSS, el cual se ha asociado con síntomas clínicos como pérdida de peso y apetito, diarrea, heces con sangre, encorvado y muerte (Chassaing *et al.*, 2014). Asimismo, la similitud entre los diferentes pesos de los grupos administrados con *Moringa oleifera* sugiere que el consumo de las hojas favoreció la estabilización del peso, especialmente frente a los efectos negativos del DSS en las semanas 3, 6 y 9.

En la Figura 19 se presenta la relación peso/longitud de colon, el peso relativo de hígado y peso relativo de bazo en ratones CD-1. Respecto al peso relativo de hígado (Figura 19A) no se reportaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos, sin embargo, en la relación peso/longitud de colon (Figura 19B) el control positivo (C+ AOM/DSS) fue significativamente mayor, infiriendo una menor longitud (Ver Figura 20) y mayor peso de colon en comparación con el control negativo y los grupos suplementados con moringa.

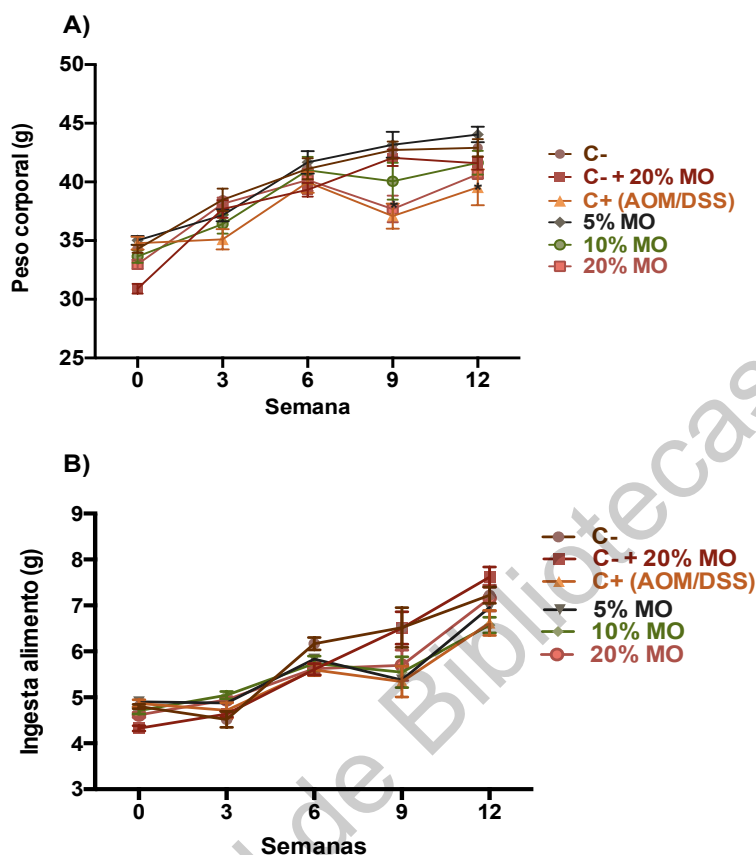


Figura 18. Efecto del consumo de diferentes dosis de hojas de moringa (5, 10, 20%) sobre (A) peso corporal e (B) ingesta de alimento en ratones CD-1. *Asteriscos sobre las diferentes barras expresan diferencias significativas respecto al control positivo por la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

La disminución en la longitud del colon y el aumento del peso relativo de bazo han sido previamente caracterizados como las consecuencias proinflamatorias del consumo de DSS (Chassaing *et al.*, 2014), lo cual concuerda con lo encontrado en el presente estudio, donde el peso relativo del bazo fue mayor en los grupos inducidos con AOM y DSS (Figura 19C). Esto pudo confirmarse en las imágenes representativas de cada grupo mostradas en la Figura 20, donde evidentemente los grupos con inducción de la enfermedad por medio del DSS muestran longitudes más pequeñas de colon, aunque se muestra un efecto protector del consumo de *Moringa oleifera* al presentar longitudes similares al del control sano. Estudios han sugerido que el DSS es un compuesto cargado negativamente que induce a daño en las membranas celulares por medio de una interacción repulsiva con fosfolípidos

aniónicos de membranas (Eichele *et al.*, 2017). En este sentido, un daño continuo de los tejidos provoca una respuesta proinflamatoria excesiva que se manifiesta en síntomas como un incremento de la tasa metabólica del bazo y la acumulación de células inmunes en este tejido, ocasionando incremento del bazo (Perše *et al.*, 2012).

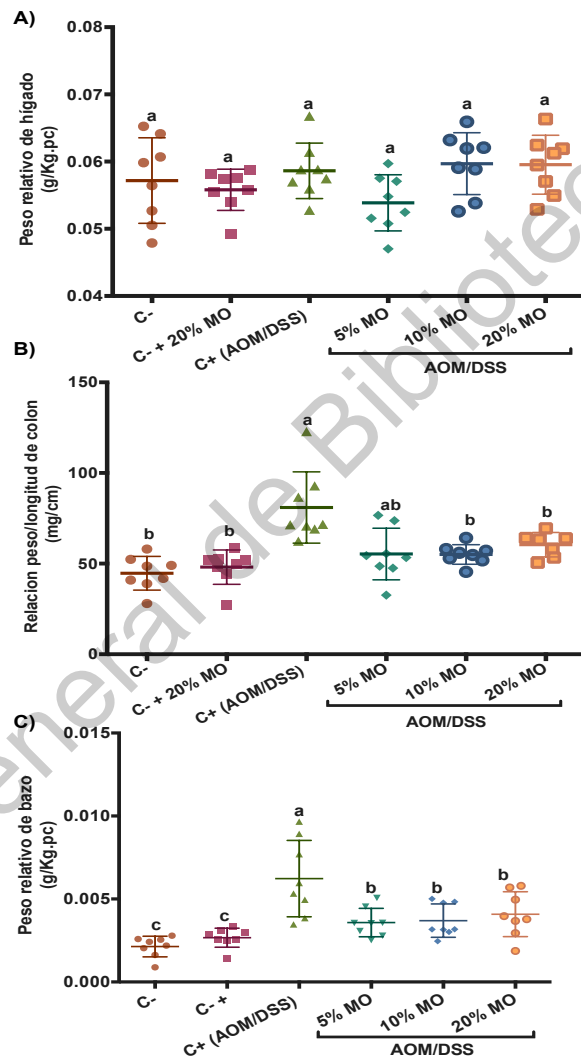


Figura 19. Efecto del consumo de una curva dosis-respuesta de moringa sobre (A) Peso relativo de hígado; (B) Peso/longitud de colon; (C) Peso relativo de bazo en ratones CD-1. *Asteriscos sobre las diferentes barras expresan diferencias significativas respecto al control positivo por la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

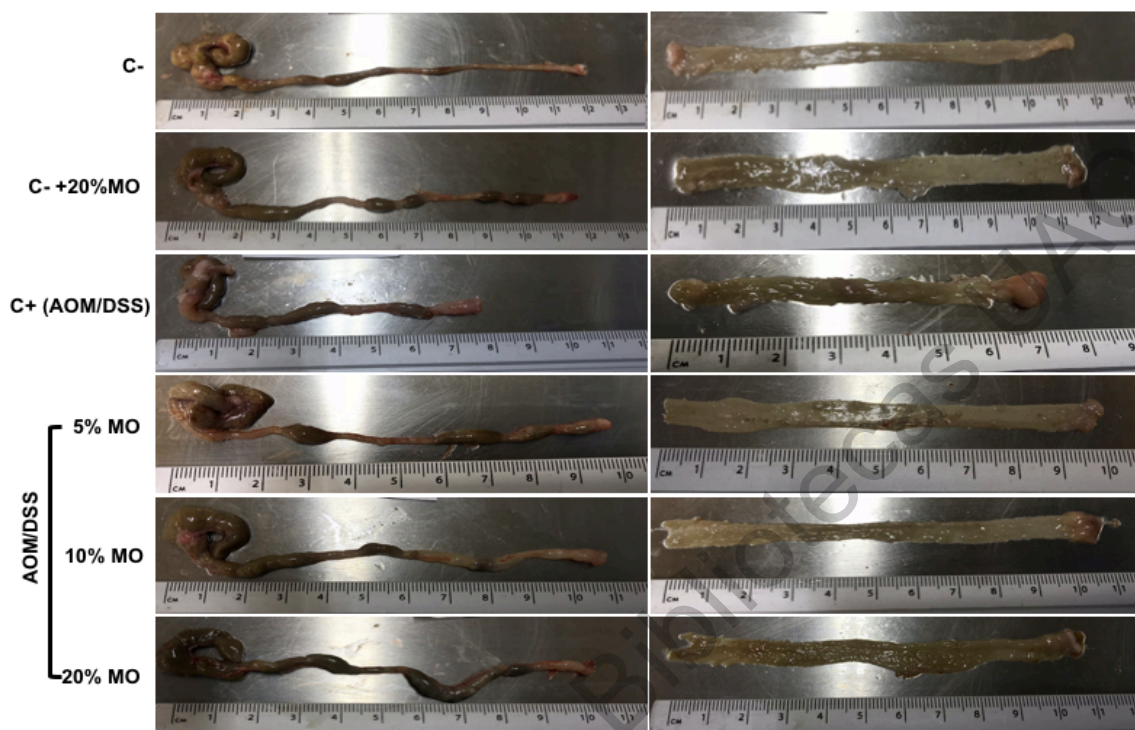


Figura 20. Fotos representativas de colon y ciego (completo y abierto) de cada uno de los grupos tratados.

VII.4.1 Efecto del consumo de hojas de moringa sobre la inducción de enzimas de fase II.

El sistema de defensa antioxidante se considera como el principal mecanismo que protege a la célula contra el daño y la peroxidación lipídica (Yang *et al.*, 2001). Dentro de este sistema, NQO1 es una enzima catalítica esencial que protege a las células del estrés oxidativo por medio de la inhibición de quinonas originadas a partir de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (EROs), por lo que es una potencial estrategia para la prevención del cáncer (Oh y Park, 2015). Junto a NQO1, GST ha ganado relevancia puesto que participa de forma activa en el transporte y detoxificación de un amplio rango de sustratos en el hígado, un paso crítico que influye en la efectividad de los tratamientos en contra del cáncer (Rushworth *et al.*, 2011).

La actividad enzimática de GST en la fracción citosólica de hígado y colon se presenta en la Figura 21. La actividad de GST en hígado (Figura 21A) fue inducida hasta 3.89 veces en el grupo suplementado con 20% de moringa respecto al control positivo. En colon (Figura 21B), todas las concentraciones de moringa evaluadas indujeron la actividad de GST hasta 1.5 veces. Algunas investigaciones han evidenciado que componentes de la dieta podrían ser capaces de prevenir o reducir los efectos perjudiciales de xenóbioticos o carcinógenos mediante la alteración de la actividad de GST, por ejemplo, se ha estudiado el efecto modulador de curcuminoides, cinamatos, isotiocianatos y flavonoides obtenidos de extractos de plantas como inductores de enzimas antioxidantes (Das *et al.*, 2013; Galal *et al.*, 2014). En este sentido, el incremento de la actividad enzimática de GST podría ser atribuido a compuestos como los flavonoides o glucosinolatos presentes en las hojas de moringa (Bhattacharya *et al.*, 2018; Khor *et al.*, 2018; Fahey *et al.*, 2018).

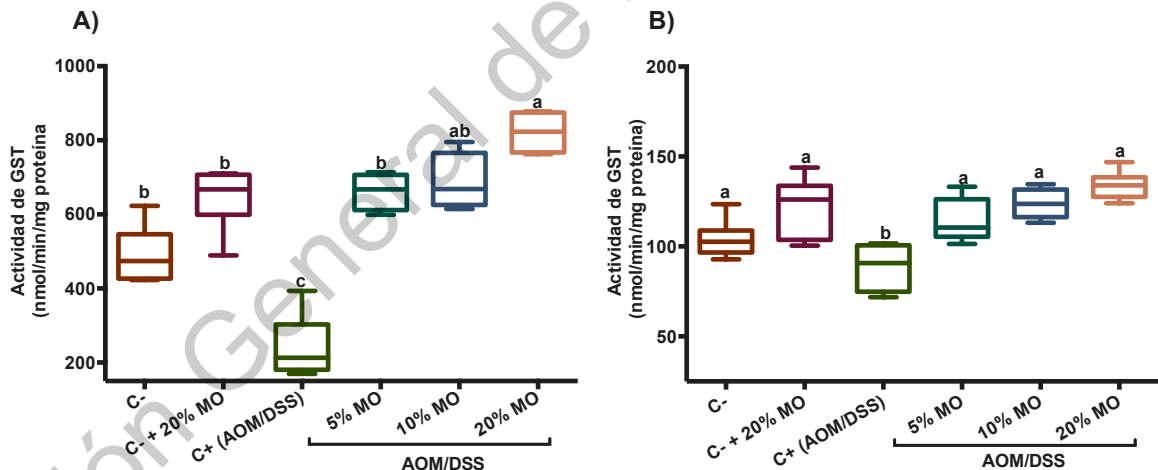


Figura 21. Efecto del consumo de diferentes dosis de moringa (5, 10, 20%) sobre la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en (A) hígado y (B) colon de ratones macho CD-1. *Asteriscos sobre las diferentes barras expresan diferencias significativas respecto al control positivo por la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

La actividad enzimática de NQO1 en la fracción citosólica de hígado y colon se presenta en la Figura 22. Todos los grupos suplementados con moringa presentaron una inducción de la actividad enzimática de quinona reductasa, sin embargo, una mayor inducción fue encontrada en el grupo inducido con AOM/DSS y suplementado con 20% de moringa con un incremento de hasta 2.5 veces en hígado y 2.1 veces en colon.

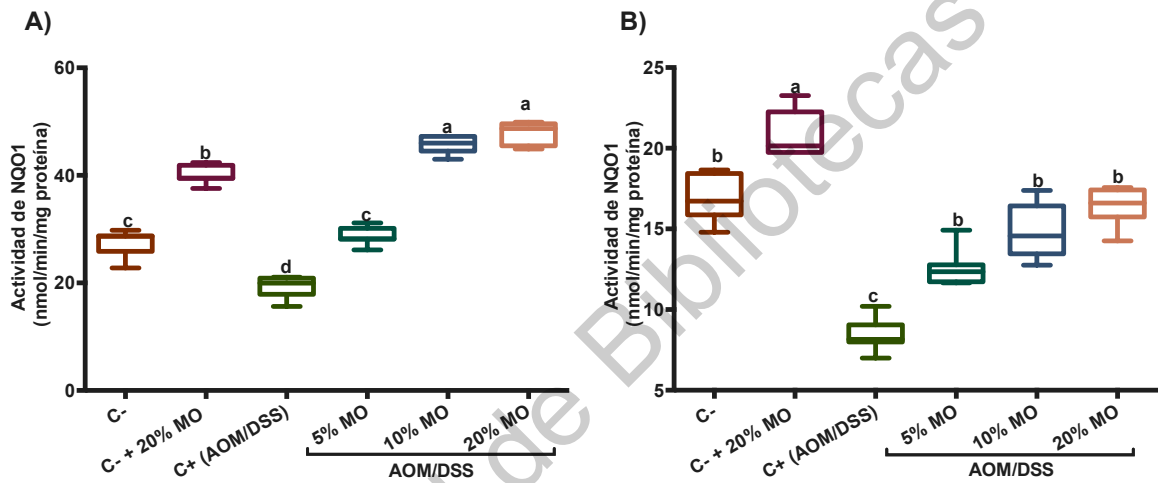


Figura 22. Efecto del consumo de diferentes dosis de moringa (5, 10, 20%) sobre la actividad enzimática de quinona reductasa (NQO1) en (A) Hígado y (B) colon en ratones macho CD-1. *Asteriscos sobre las diferentes barras expresan diferencias significativas respecto al control positivo por la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

La tendencia en el incremento de la inducción de enzimas como la GST y NQO1 ha sido reportada en otros estudios, donde a mayor actividad de GST existe una mayor probabilidad de la elevación de la actividad de NQO1. En conjunto, la inducción de estas enzimas permite la activación del sistema de defensa antioxidante para proteger contra el daño celular (Galal *et al.*, 2014). Así mismo, se ha descrito que uno de los principales mecanismos de protección contra la carcinogénesis, la mutagénesis y otras formas de toxicidad mediada por carcinógenos es la inducción de enzimas involucradas en su metabolismo, particularmente enzimas de fase 2 como las glutatión-S-transferasas (GST), UDP-glucuronosyl transferasas y quinona reductasa (NQO1) (Galal *et al.*, 2014).

Finalmente, se ha reportado que este tipo de enzimas desempeña un papel importante en la protección contra la peroxidación lipídica (Yang *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos sugieren que la moringa posee compuestos bioactivos que ayudan en la prevención del daño por activación de enzimas de fase II, importante en la quimioprotección de xenobióticos.

VII.4.2 Efecto del consumo de hojas de moringa sobre el nivel de peroxidación lipídica en hígado y colon.

El efecto del consumo de la curva dosis-respuesta de hojas de moringa sobre el nivel de peroxidación lipídica en hígado y colon es presentando en la Figura 23. El tratamiento con 20% de hojas de moringa disminuyó el nivel de peroxidación lipídica en hígado (1.5 veces) y colon (2.3 veces). De igual forma, los tratamientos con 5% y 10% de moringa redujeron el nivel de peroxidación (1.7 y 2 veces, respectivamente) en colon en comparación con el control positivo (grupo tratado con AOM/DSS). Madrigal-Bujaidar *et al.* (2013) reportaron reducciones de hasta 3 y 4 veces en niveles de MDA en colon de ratones hembra CF-1 inducidos con AOM y suplementados con jugo de uva. Tendencia similar fue reportada por Waly *et al.* (2014) quienes evaluaron el consumo de extractos de cáscara de granada y papaya en ratas macho Sprague–Dawley inducidas con AOM encontrando una disminución en el nivel de MDA en colon de hasta 2 veces. Algunos estudios sugieren que los compuestos fenólicos podrían ser los encargados de inhibir la peroxidación lipídica, ésta clase de antioxidantes tiene una entalpía de disociación del enlace O-H (BDE) débil, de manera que puede transferir su átomo de hidrógeno al radical peroxilo lipídico para perturbar la reacción en cadena del radical (Nam, 2011).

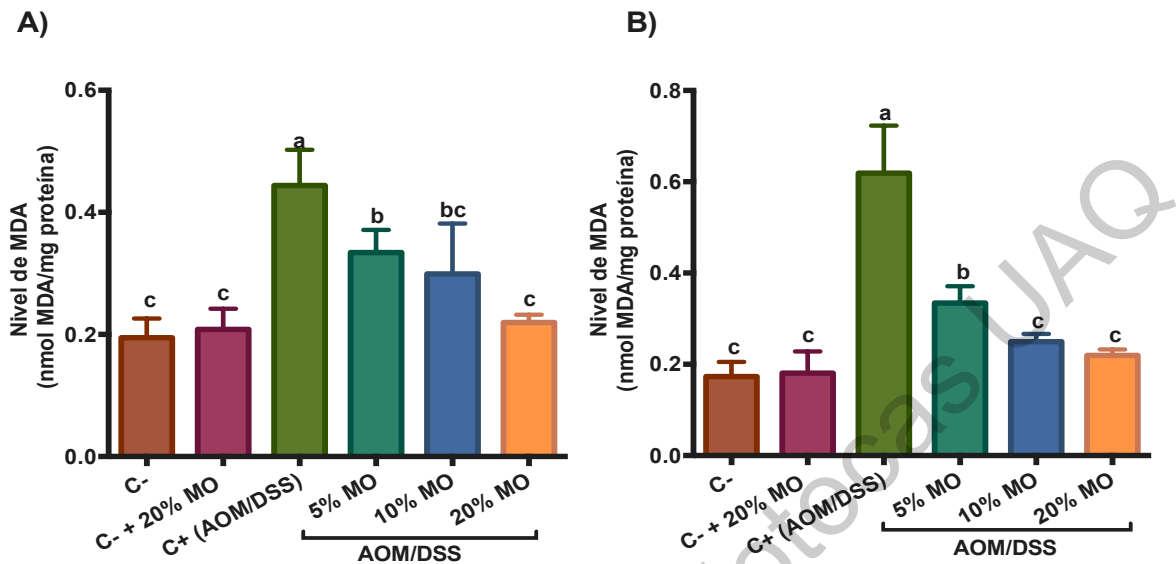


Figura 23. Efecto del consumo de la curva dosis-respuesta de hojas de moringa (MO) sobre el nivel de peroxidación lipídica en hígado y colon de ratones CD-1 inducidos con AOM/DSS. *Asteriscos sobre las diferentes barras expresan diferencias significativas respecto al control positivo por la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

VII.4.3 Efecto del consumo de moringa sobre la actividad enzimática de mieloperoxidasa en colon.

La Figura 24 muestra el efecto de las diferentes dosis de moringa sobre la actividad enzimática de la mieloperoxidasa (MPO) en tejido colónico. Todos los grupos tratados con AOM/DSS mostraron cambios significativos en el marcador de respuesta inflamatoria (es decir, aumento de la actividad de MPO) en comparación el control negativo. Sin embargo, cabe destacar que los grupos tratados con AOM/DSS y suplementados con 5, 10 y 20% de moringa presentaron una reducción de la actividad enzimática respecto al control inducido de hasta 2.5 veces. Al-Salihi *et al.* (2015) estudiaron la influencia de la mieloperoxidasa en la aparición de tumores de colon en ratones *ApcMin/*, encontrando que a mayor nivel de MPO existe una mayor infiltración celular y mayor probabilidad de aparición de tumores. Se ha reportado que en modelos experimentales de colitis asociada a cáncer de colon, la gravedad de la enfermedad a menudo se correlaciona con un aumento de la actividad de MPO y niveles más altos de citocinas proinflamatorias (Kim *et al.*,

2012). Tomando en cuenta estos reportes, el consumo de hojas de moringa en el modelo animal inducido con AOM/DSS protege contra el daño oxidativo.

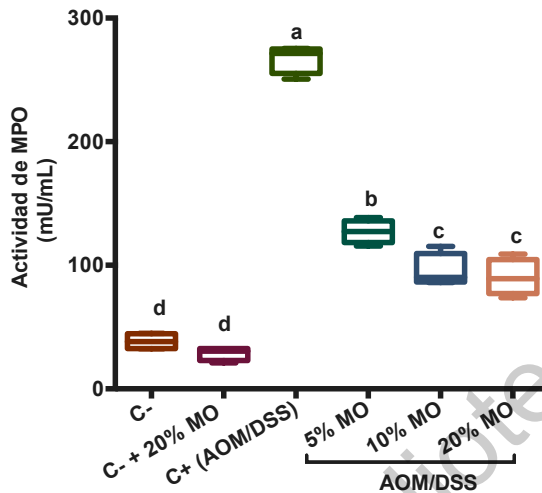


Figura 24. Actividad enzimática de mieloperoxidasa (MPO) en colon de ratones CD-1 suplementados con hojas de moringa (MO). *Asteriscos sobre las diferentes barras expresan diferencias significativas respecto al control positivo por la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

VII.4.4 Efecto del consumo de hojas de moringa sobre la producción de ácidos grasos de cadena corta y pH en contenido cecal y fecal.

El efecto del consumo de la curva dosis-respuesta de hojas de moringa sobre la producción de AGCC y pH en contenido cecal (ciego) es presentado en la Figura 25. Ácido acético (Fig 25A), propiónico (Fig 25B) y butírico (Fig 25B) se detectaron en todos los grupos evaluados. Grupos suplementados con 10% y 20% de moringa presentaron un ligero incremento (0.5 y 0.7 veces) en la producción de ácido acético y solo el grupo con 20% de moringa un incremento significativo en butírico y propiónico respecto al control positivo. Se ha reportado que las bacterias intestinales en el ciego y el intestino grueso producen AGCC, principalmente a partir de carbohidratos no digeribles que pasan por el intestino delgado sin verse afectados. Los diferentes tipos y cantidades de carbohidratos no digeribles que llegan al ciego y al intestino grueso dependen generalmente de la ingesta diaria y del tipo de

alimento. De esta forma, se ha informado que los principales componentes de la fibra involucrados con la producción de AGCC en ciego y colon son los polisacáridos, oligosacáridos y almidones resistentes de la pared celular de las plantas (Besten *et al.*, 2013). También se ha evidenciado que los AGCC ejercen un efecto protector contra el desarrollo de neoplasias de colon en modelos animales, así como la modulación de genes importantes para detener la proliferación celular en diferentes líneas celulares transformadas de colon humano (McNabney y Henagan, 2017).

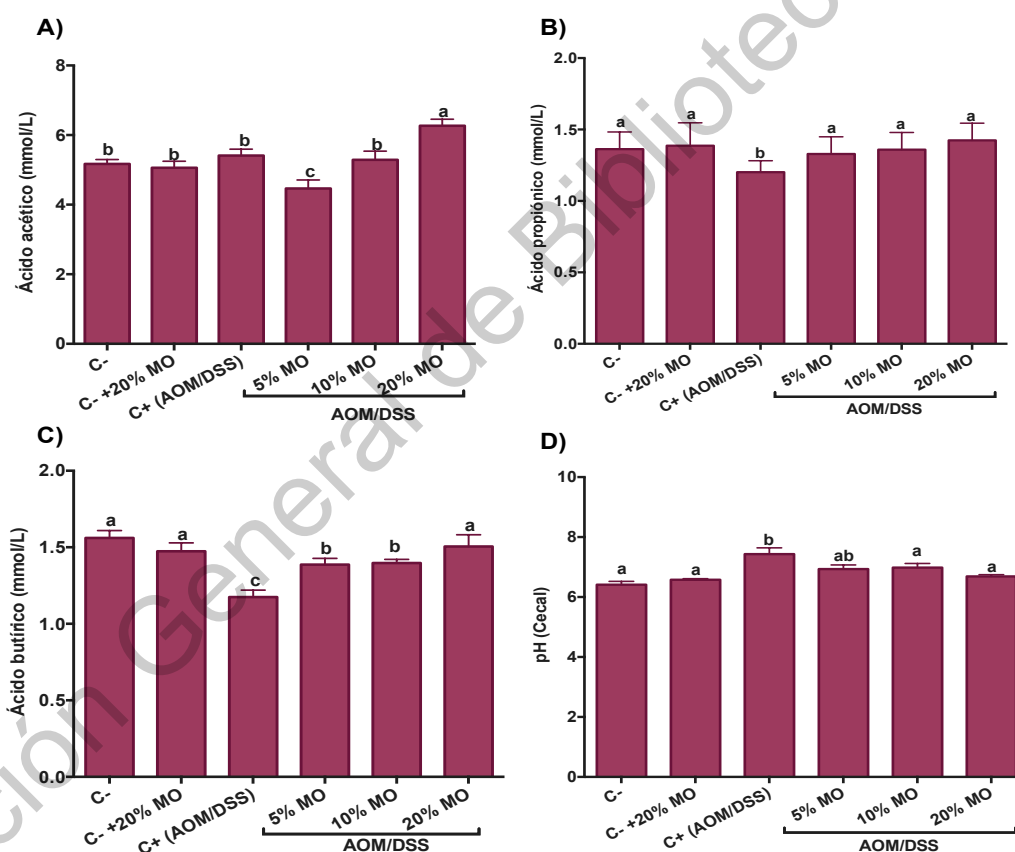


Figura 25. Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y pH en contenido cecal de ratones CD-1 suplementados con hojas de moringa. *Asteriscos sobre las diferentes barras expresan diferencias significativas respecto al control positivo por la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

La producción de AGCC y pH en contenido fecal al inicio y final del tratamiento con hojas de moringa es presentado en la Figura 26. Durante el inicio

del experimento (semana 1) no se reportaron diferencias significativas en la producción de AGCC en ninguno de los grupos. Sin embargo, al final del tratamiento el grupo suplementado con 10% de moringa presenta un incremento en la producción de ácidos grasos (acético < propiónico < butírico) respecto al control positivo ($p < 0.05$). Aunque no hubo diferencia significativa, los grupos suplementados con 5% y 20% de moringa presentaron un leve incremento en todos los AGCC (butírico < propiónico < acético) respecto al control positivo. De acuerdo con los datos obtenidos, el consumo de moringa bajo las condiciones probadas sugiere que ésta puede llegar hasta el colon para servir como sustrato en la producción de AGCC relacionados con la salud intestinal.

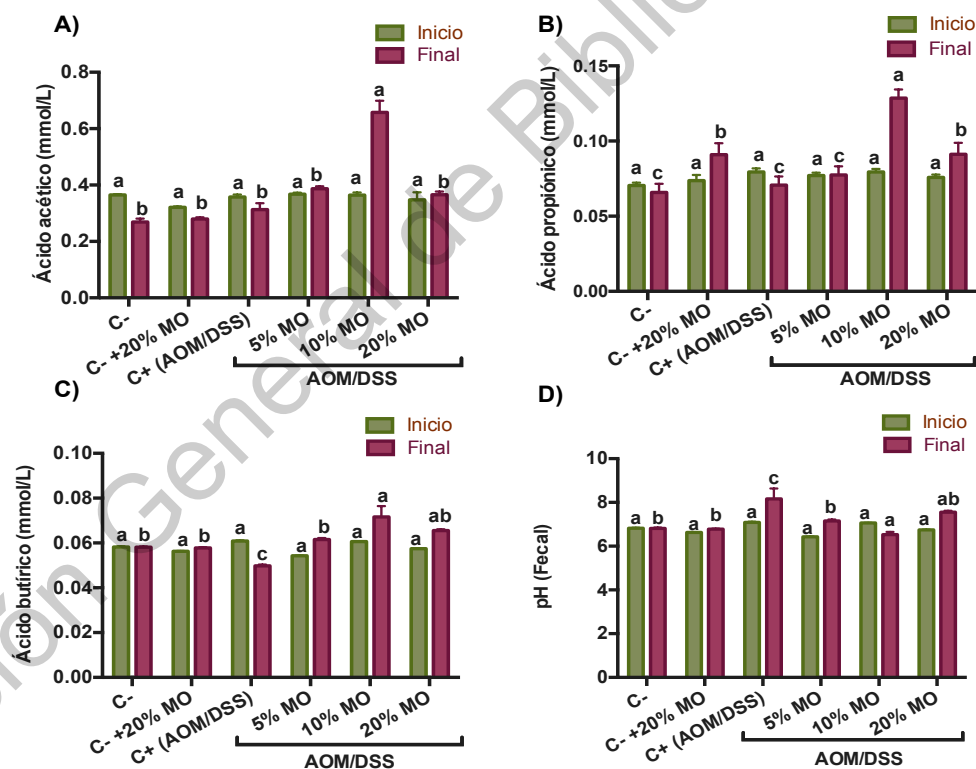


Figura 26. Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y pH en contenido fecal de ratones CD-1 suplementados con hojas de moringa. *Asteriscos sobre las diferentes barras expresan diferencias significativas respecto al control positivo por la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

VII.4.5 Efecto del consumo de hojas de moringa sobre la concentración de citocinas en suero.

La Figura 27 muestra la concentración de algunas citocinas proinflamatorias (Figura 27A-C) y antiinflamatorias (Figura 27D) en el suero de los animales pertenecientes a los diferentes grupos del estudio *in vivo*. Se puede observar que el control inducido (AOM/DSS) presentó el máximo nivel de todas las citocinas proinflamatorias y el menor nivel de IL-10 (citocina de conocido efecto antiinflamatorio). Si bien no hubo diferencias significativas para IL-6 o TNF- α , entre las diferentes dosis de *Moringa oleifera*, la mayor dosis (20% MO) disminuyó los niveles de MCP-1 (factor quimioatrayente de monocitos y macrófagos) incluso por debajo del control basal y presentó, junto a 10 % MO, los mayores niveles de IL-10. MCP-1 se ha identificado como la mayor quimiocina que recluta macrófagos en diferentes tumores humanos, incluyendo el colon y se ha vinculado con el incremento de la aparición de tumores en ciertos tipos de cáncer (Kang *et al.*, 2015). MCP-1 promueve el crecimiento y facilita la supervivencia de células neoplásicas, que junto a proteínas como Mip-1 α y Mip-2 α , permiten el desarrollo de la actividad tumorigénica (Phinney *et al.*, 2018).

Otra citocina clave involucrada en el proceso inflamatorio que desencadena en cáncer es TNF- α , la cual se ha reportado facilita el incremento en el número y tamaño de tumores en el modelo de AOM/DSS, promueve el daño al ADN, estimula angiogénesis e induce la expresión de COX-2 (Candido *et al.*, 2013). Estudios *in vitro* han mostrado que la administración de hojas de *M. oleifera* disminuye la producción de TNF- α , IL-6 e IL-8 en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacárido (LPS), e inhiben la expresión del gen *RelA*, involucrado en la vía de señalización de NF- κ B p64 (Kooltheat *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha reportado que IL-10 inhibe la respuesta antitumoral, debido a que impide la presentación de antígenos de las células propias transformadas a los linfocitos T citotóxicos (LTcx) (Karimi *et al.*, 2015). No obstante, la IL-10 puede ejercer el efecto antitumoral

mediante otros mecanismos tales como la activación de las células asesinas naturales (NK), los linfocitos T, los macrófagos y el óxido nítrico (NO). Estudios en roedores indican que niveles bajos de IL-10 aumentan el riesgo de cáncer y que, por el contrario, el incremento de IL-10 ejerce un papel protector y preventivo al menos para algunos tipos de tumores, sin embargo, el papel de IL-10 en la tumorigénesis sigue siendo aún controvertido (Mannino *et al.*, 2015). Hasta nuestro conocimiento de lo reportado, estos datos son los primeros en mostrar una disminución en mediadores proinflamatorios en el suero de animales tratados con AOM/DSS y diferentes dosis de *Moringa oleifera*.

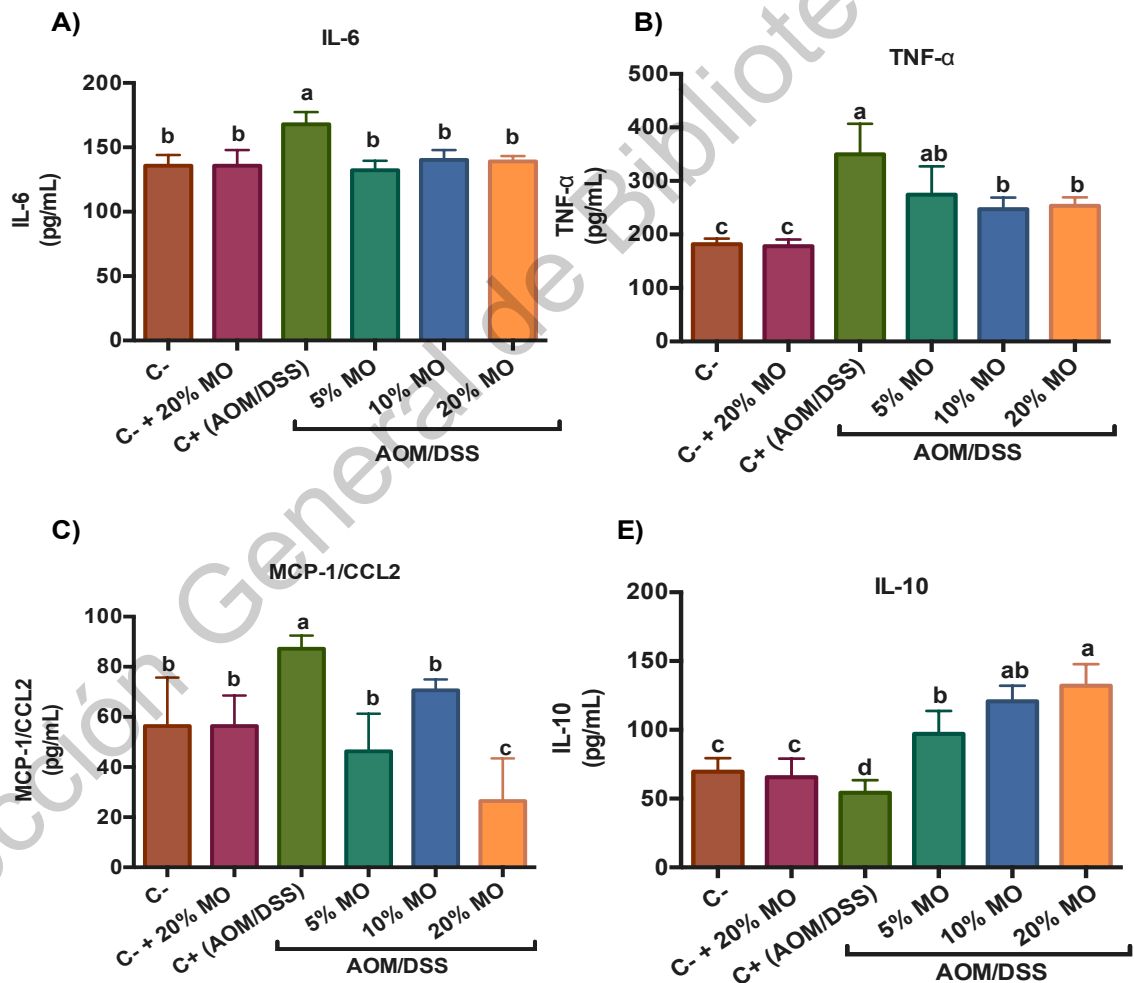


Figura 27. Perfil de citocinas proinflamatorias en suero de ratones inducidos con AOM/DSS y tratados con diferentes dosis de moringa.

VII.4.6 Análisis histopatológico de colon e hígado en ratones suplementados con moringa e inducidos con AOM/DSS.

Imágenes representativas de secciones de hígado (tinción con H&E) de cada uno de los grupos evaluados son presentadas en la Figura 28. El examen histopatológico de las secciones de hígado mostró una estructura histológica normal del lóbulo hepático. A pesar de que no se encontraron diferencias entre los grupos inducidos con AOM/DSS en el presente estudio, se ha reportado que el AOM podría causar degeneración de los hepatocitos, congestión de vasos sanguíneos, necrosis, núcleos picnóticos, infiltración de células inflamatorias, cariólisis y proliferación de células ovals en modelos de carcinogénesis experimental inducida con azoximetano (Abdella *et al.*, 2016).

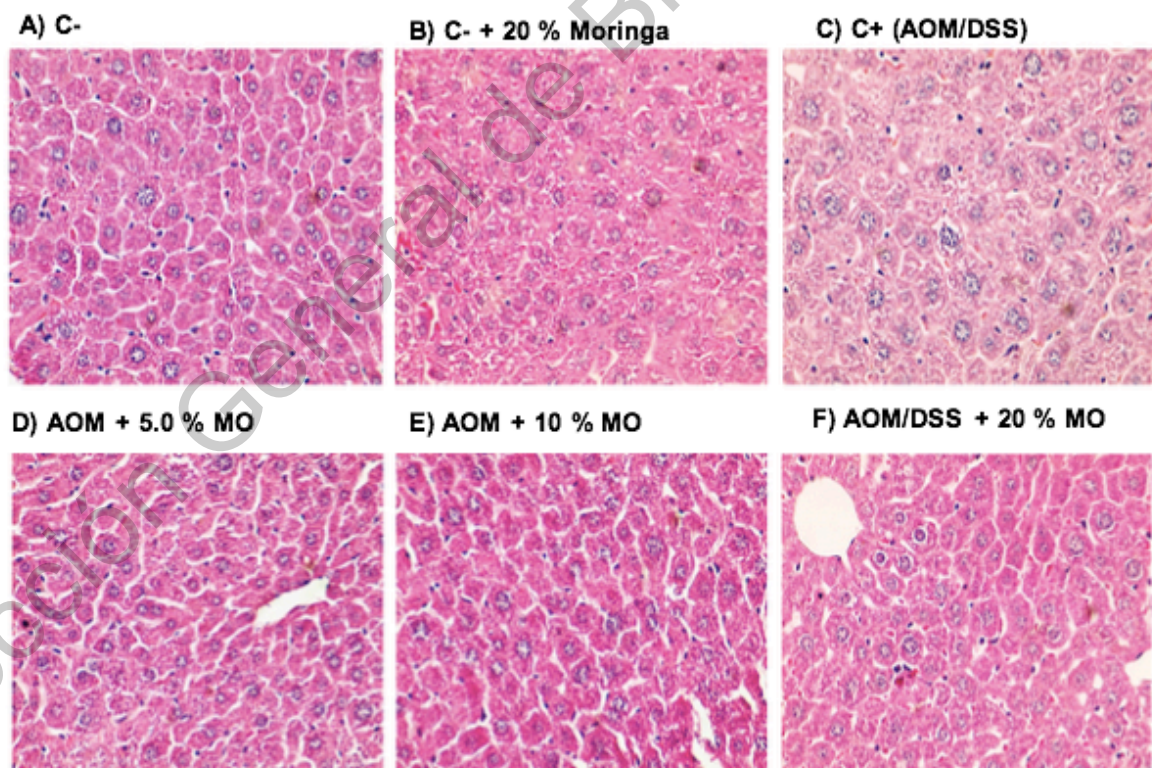


Figura 28. Imágenes representativas del análisis histológico de hígado en ratones sanos e inducidos con AOM/DSS (300X). Tinción con H & E.

Los resultados obtenidos para el análisis histopatológico del colon se presentan en la Figura 29. El control positivo (Figura 29C) presenta el mayor daño en el tejido con un elevado nivel de displasia, núcleos atestados, alargados y pseudoestratificados. De igual forma, presenta una actividad mitótica mayor respecto a los grupos suplementados con 5%, 10% y 20% de hojas de moringa (Figura 29. D-E-F). A pesar de que los grupos tratados con moringa presentan también destrucción a nivel de fosas crípticas, el daño por inflamación es menor que el encontrado en control positivo. Los resultados encontrados podrían correlacionarse con una atenuación de la inflamación celular y que concuerdan con los resultados en la disminución de la actividad de mieloperoxidasa, así como un menor nivel de peroxidación lipídica en el colon.

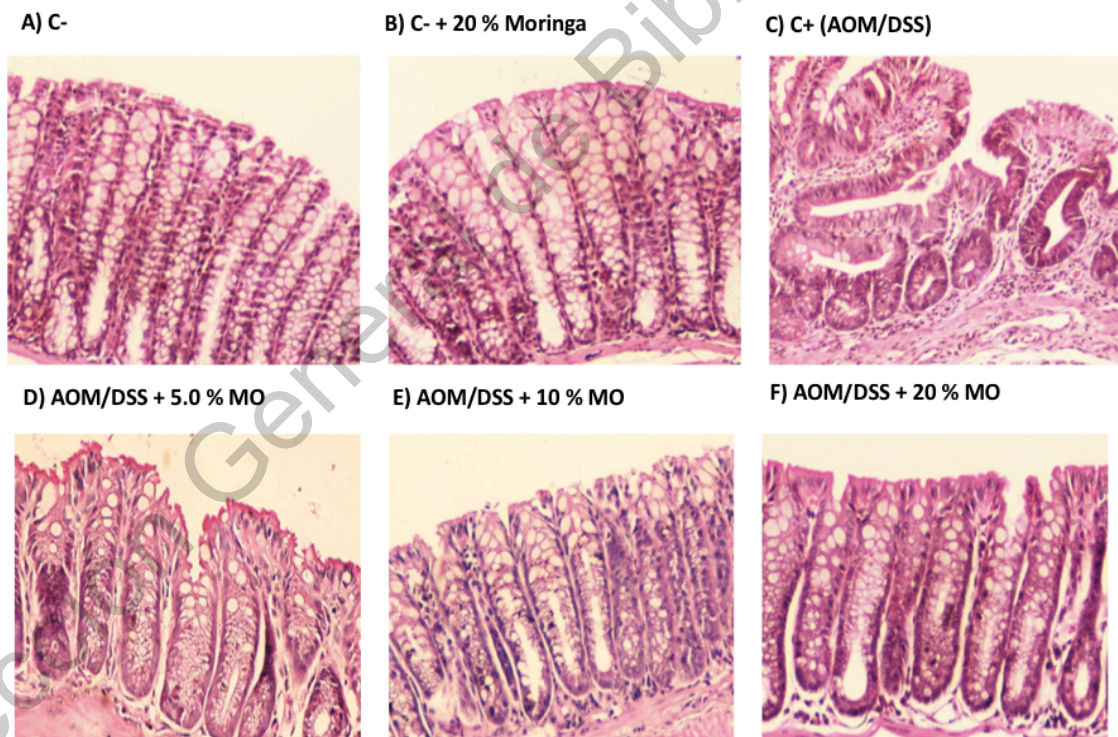


Figura 29. Imágenes representativas del análisis histológico de colon de ratones inducidos por AOM/DSS (300X). Tinción con H & E.

VII.4.7 Efecto del consumo de hojas de moringa en la expresión de genes asociados al proceso inflamatorio.

Con el objetivo de evaluar el efecto del consumo de moringa sobre la modulación de genes se llevo a cabo el estudio de la expresión genes relacionados con la respuesta inflamatoria en el tejido colonico. La Figura 30 muestra el mapa de calor o *heatmap* tras la agrupación jerárquica del análisis de expresión de genes de los diferentes tratamientos, en comparación con el control AOM/DSS. El grupo suplementado con 10% de moringa (AOM/DSS + 10%MO) fue el tratamiento que exhibió un patrón similar en la agrupación de genes respecto al control sano y fue el que se encontró más distante según la distancia euclidiana al control positivo AOM/DSS (Z-score: 4.906), seguido por los tratamientos AOM/DSS+20% MO (Z-score:4.666) y AOM/DSS+5% MO (Z-score:3.362).

La expresión diferencial de los genes evaluados para los diferentes grupos con y sin tratamientos en comparación con el control inducido (AOM/DSS) se presenta en la Figura 31. De los 84 genes evaluados, 62 genes se expresaron diferencialmente en el control sano (fold change > 2) (Figura 31A); 65 en el grupo suplementado con 10% de moringa (Figura 31B) y 27 en el grupo con administración de 20% de moringa en comparación con el control inducido (AOM/DSS) (Figura 31C). Específicamente, en el grupo suplementado con 10% de moringa hubo una reducción significativa de *IL-2*, *IL-6*, *TNF*, *IL-1 β* e *INF- γ* . Dentro de los genes asociados a citocinas proinflamatorias generalmente se encuentran incluidas las interleucinas *IL-1*, *IL-2*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-12*, *IL-15* e *IL-17*, mientras que como antiinflamatorias, se han descrito las interleucinas *IL-4* e *IL-10* (West *et al.*, 2015). Se ha reportado que una regulación descontrolada de éstas citocinas está implicada en el desarrollo de cáncer de colon e inflamación a lo largo del tracto gastrointestinal (West *et al.*, 2015). De esta forma, la inflamación crónica en el tracto intestinal se encuentra asociada a la activación de macrófagos y células T que liberan citocinas proinflamatorias codificadas por genes como *IL-1 β* , *IL-6* e *IL-8* (Bondurant *et al.*,

2013). El gen que codifica para *IL-2* se ha vinculado a la enfermedad inflamatoria intestinal, contribuyendo de ésta forma a las diferentes patologías asociadas (Bondurant *et al.*, 2013). Por su parte, se ha reportado que *IL-6* expresa para el gen asociado al desarrollo del mecanismo de activación de NF- κ B en el epitelio intestinal (Wang *et al.*, 2003), de ésta forma la señalización de IL-6 ha sido implicada en la tumorigénesis (Vainer *et al.*, 2018). Kim *et al.* (2014) informaron que la administración con betaína en ratones ICR inducidos con AOM/DSS, suprimió de manera efectiva la incidencia de tumores colónicos al disminuir la expresión de citocinas como: *TNF- α* , *IL-6*, *COX-2* e *iNOS*.

A pesar de que el papel de *IL-1* en CCR es controvertido, el mecanismo de señalización de *IL-1 β* se ha vinculado a la promoción de tumores malignos y se asocia a diferentes vías inflamatorias. Se ha informado que la expresión de *IL-1 β* se encuentra incrementada en biopsias de pacientes con CCR metastásico (Elaraj *et al.*, 2006). Por su parte, se ha evidenciado que el bloqueo de *IL-1 β* usando IL-1RA recombinante disminuye significativamente el desarrollo tumoral en el colon de ratones inducidos con AOM/DSS, lo que indica un papel pro-tumorigénico de IL-1 β (Wang *et al.*, 2014).

Por otra parte, se encontró una disminución de la expresión diferencial de citocinas como *CCL2*, *CCL4*, *CCL5* y *CCL22* en los grupos suplementados con 10% y 20% de hojas de moringa respecto al control inducido (AOM/DSS). Diversas investigaciones han indicado que una variedad de quimiocinas son secretadas por el microambiente colonico como consecuencia de disrupciones en la homeóstasis del tejido debido a la respuesta inflamatoria (Chen *et al.*, 2018). La expresión de quimiocinas está regulada intrínsecamente por vías epigenéticas y genéticas y también extrínsecamente por hipoxia, señales metabólicas y la microbiota (Nagarsheth *et al.*, 2017). El incremento excesivo de *CCL2* y *CCL5* ha sido implicado en el desarrollo del CCR (Wang *et al.*, 2009).

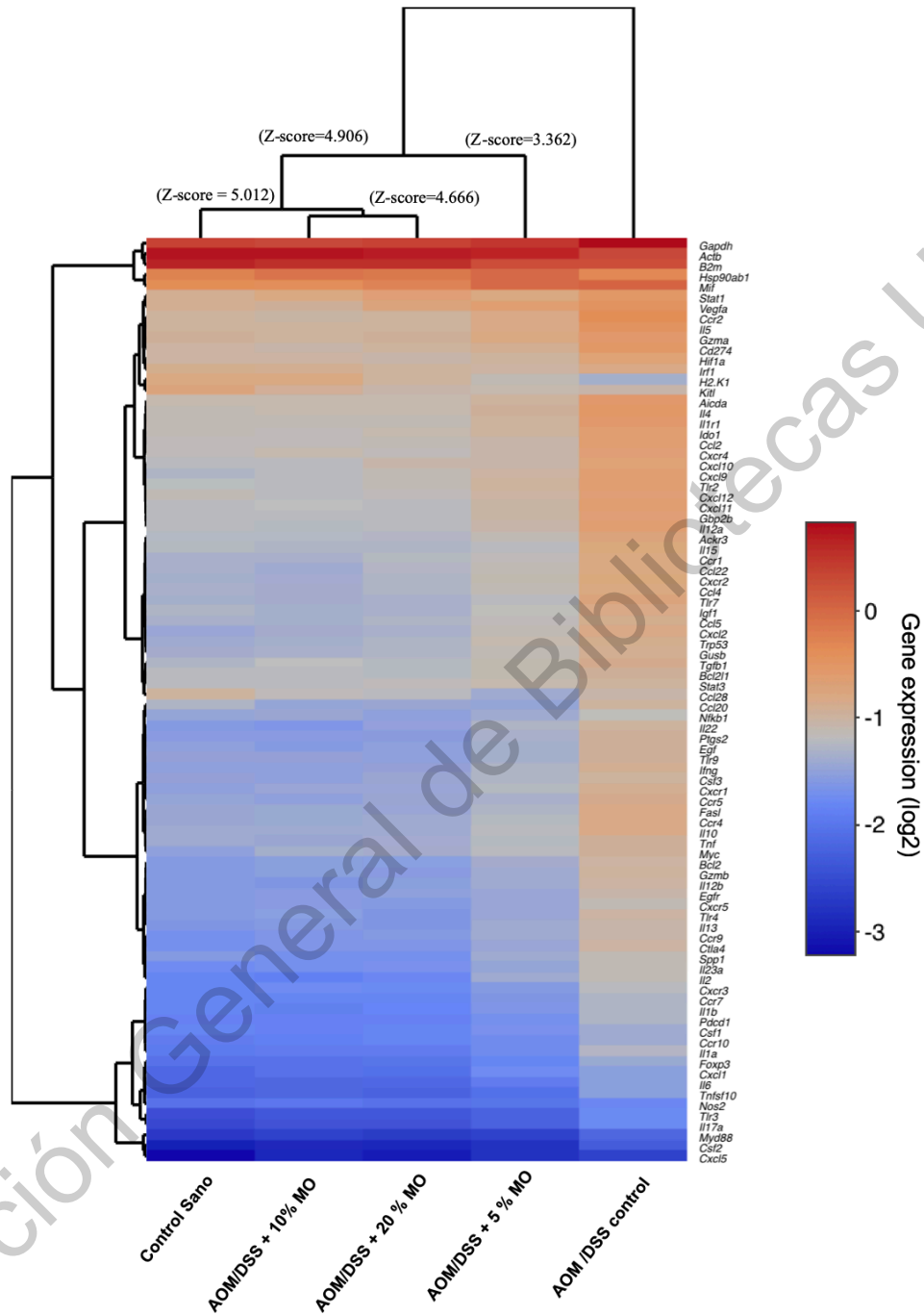


Figura 30. Visualización de gráficos de calor (*Heatmaps*) obtenidos tras el arreglo RT² Profiler PCR Array en las muestras de colon. Los valores Z de agrupación se basaron en la medición de distancia euclidiana y el método de Ward para el análisis de grupos. Cada columna corresponde a 1 tratamiento y cada fila representa un gen. El cambio en el nivel de expresión se muestra en rojo (mayor expresión) o azul (menor expresión), relativo a la media entre todas las muestras.

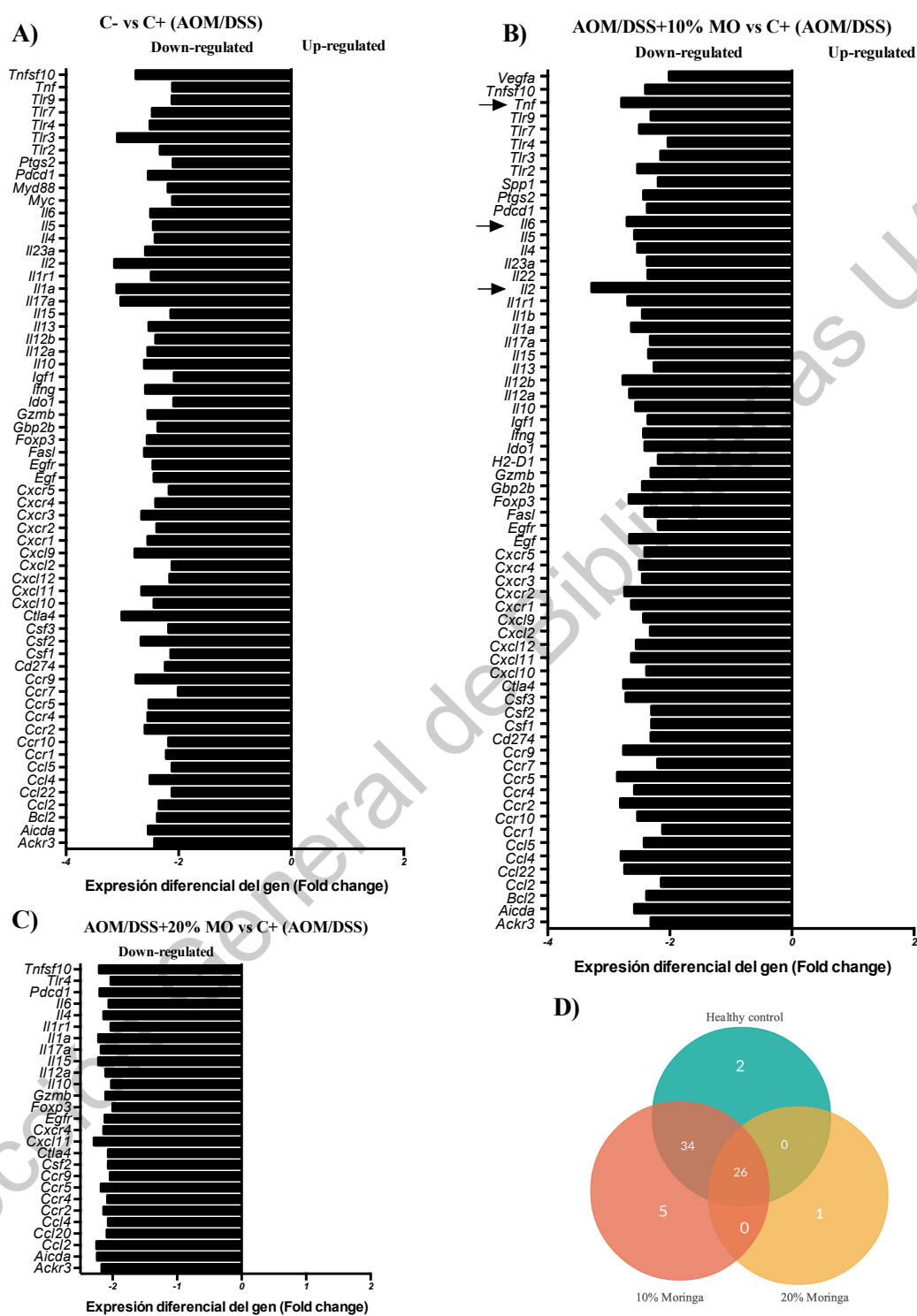


Figura 31. Expresión diferencial de genes en los diferentes tratamientos vs control positivo (AOM/DSS) obtenidos tras el arreglo RT² Profiler PCR Array en las muestras de colon.

La Figura 32 muestra los *clusters* obtenidos tras el análisis jerárquico. Se obtuvieron ocho *clusters* de acuerdo con las funciones moleculares o procesos biológicos los cuales corresponden a: (A) Transducción de señal; (B) Respuesta inmune e inflamatoria; (C) Receptores de quimiocinas e interleucinas; (D) Interleucinas; (E) Receptores y factores de crecimiento; (F) Quimiocinas; (G) Objetivos de NFκB; y (H) Apoptosis.

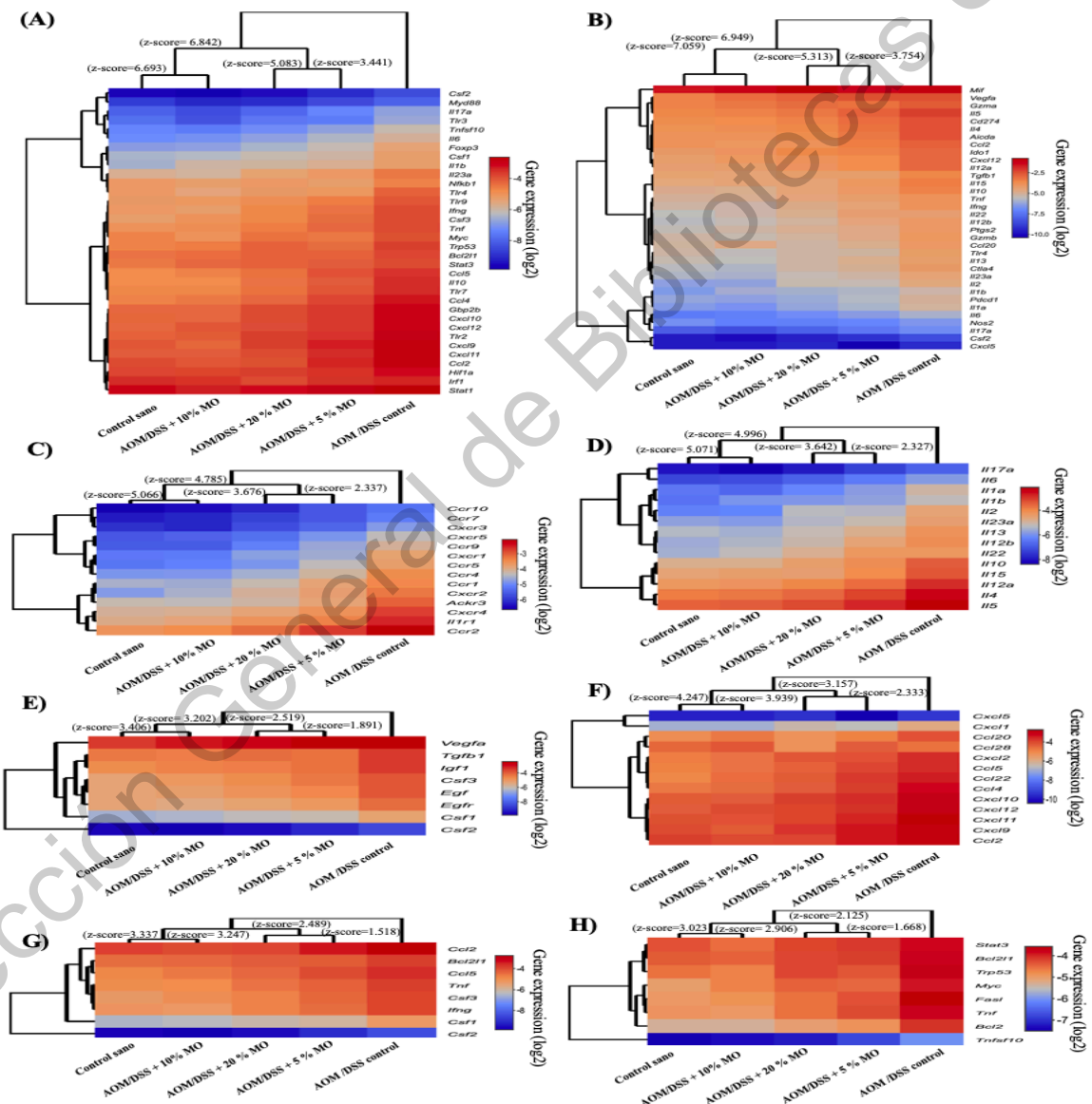


Figura 32. Grupos (*clusters*) obtenidos del análisis jerárquico de acuerdo a las funciones moleculares y procesos biológicos. El cambio en el nivel de expresión se muestra en rojo (mayor expresión) o azul (menor expresión), relativo a la media entre todos los grupos.

De acuerdo con el análisis de agrupamiento, el *cluster* de “transducción de señal” (34 genes) podría ser explicado como una de las funciones moleculares principalmente modulada por los diferentes tratamientos evaluados, así como el *cluster* de “respuesta inmunitaria e inflamatoria” (33 genes) como el principal proceso biológico modulado. En el caso particular, el tratamiento con 10% de hojas de moringa exhibió el mejor efecto sobre la regulación de genes, al atenuar la respuesta inflamatoria mediante la regulación negativa principalmente de *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-6*, *TNF- α* en el modelo de cáncer colorrectal asociado a colitis. Una propuesta general de la interacción entre la respuesta inflamatoria (macrófago) y el colonocito, así como los principales resultados encontrados durante el estudio *in vivo* se encuentra resumido en la Figura 33.

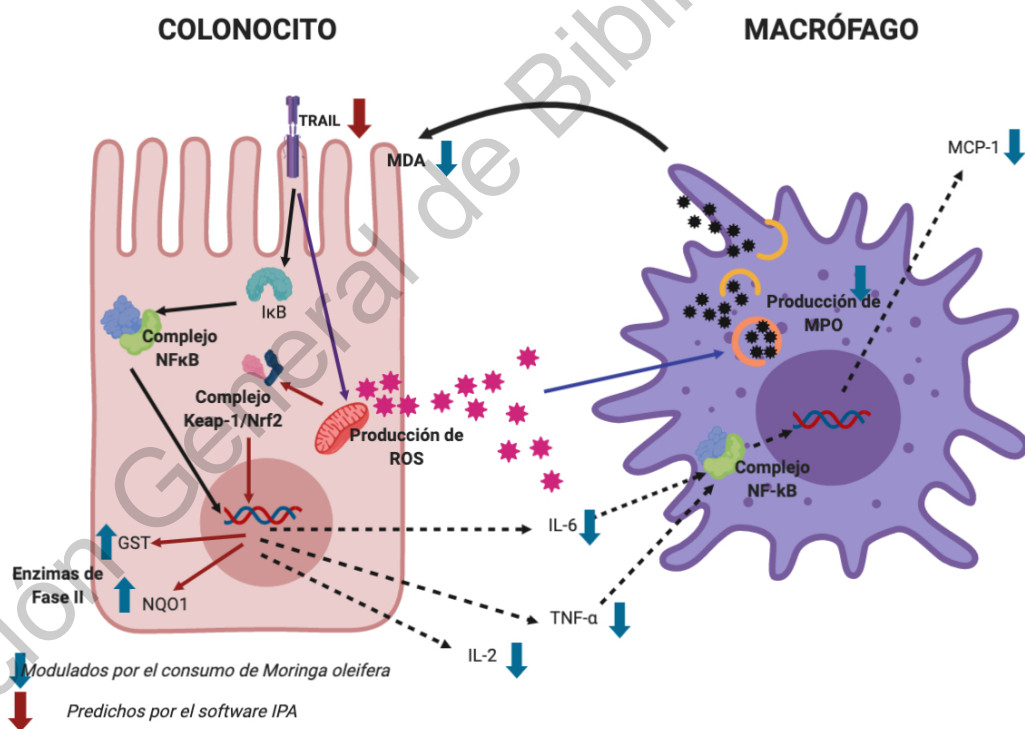


Figura 33. Mecanismo de acción propuesto de acuerdo con los principales resultados obtenidos en el estudio *in vivo*. La Figura fue elaborada con el Software BioRender.

VII.5 Efecto del extracto acuoso, metanólico y de glucosinolatos obtenidos a partir de hojas de moringa sobre células de adenocarcinoma humano HCT116 y HT-29.

Con el fin de atribuir los efectos observados en el estudio *in vivo* a un conjunto específico de compuestos de las hojas de moringa, se decidió evaluar el efecto de diferentes extractos (acuoso, metanólico y glucosinolatos) sobre la proliferación de las líneas celulares HCT116 y HT-29. Estas células se eligieron debido a que HCT116 exhibe características de inestabilidad de microsatélites de las células de cáncer de colon en etapa temprana, mientras que HT-29 son células estables a microsatélites que se han asociado con etapa avanzadas del CCR (Charepalli *et al.*, 2016).

VII.5.1 Concentración inhibitoria de los diferentes extractos sobre la proliferación celular de HCT116 y HT-29

El porcentaje de inhibición celular ejercido por el extracto acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y el extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH) sobre células de adenocarcinoma humano HCT116 y HT-29 se muestra en la Figura 34.

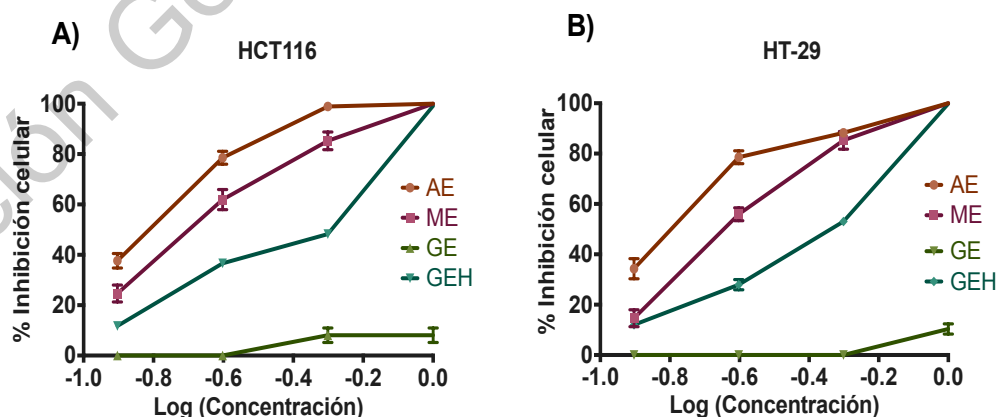


Figura 34. Porcentaje de inhibición celular de (A) HCT116 y (B) HT-29 suplementadas con 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/mL del extracto acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH) durante 24 h.

La CI_{50} para cada uno de los extractos se presenta en el Cuadro 9. AE presentó el porcentaje de inhibición más alto y la CI_{50} más baja para ambas líneas celulares (HCT116: 0.17 mg/mL; HT-29: 0.19 mg/mL); mientras GE presentó la mayor CI_{50} (HCT116: 2.80 mg/mL; HT-29: 3.17 mg/mL). Se ha informado que por sí solo, el extracto de glucosinolatos no ejerce un efecto inhibitorio, pero su transformación o hidrólisis a isotiocianatos ejerce un efecto antiproliferativo sobre células tumorales (Fofaria *et al.*, 2015; Boscaro *et al.*, 2018). Esta tendencia fue observada en el presente estudio, donde, el extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH) presentó una menor CI_{50} (HCT116: 0.55 mg/mL; HT-29: 0.59 mg/mL) en comparación al extracto de glucosinolatos no hidrolizado (GE). Tragulpakseerojn *et al.* (2017) evaluaron el efecto antiproliferativo de un extracto metanólico (70% v/v) a partir de hojas de moringa en células de carcinoma colorrectal humano HCT116 encontrado una CI_{50} de 0.25 mg/mL. Concentraciones similares se obtuvieron en este trabajo para el extracto metanólico (ME) en células HCT116 y HT-29 (CI_{50} : 0.21 mg/mL y 0.25 mg/mL, respectivamente). A pesar de que ya existen reportes del efecto antiproliferativo del extracto acuoso y metanólico de hojas de moringa, este es el primer estudio donde se evalúa el efecto de un extracto de glucosinolatos hidrolizado sobre la proliferación de células HCT116 y HT-29.

Cuadro 9. Concentración inhibitoria (CI_{50}) de los diferentes extractos de *Moringa oleifera* sobre células de adenocarcinoma humano HCT116 y HT-29.

	CI_{50} HCT116 (mg/mL)	CI_{50} HT-29 (mg/mL)
AE	0.17 ± 0.00 ^d	0.19 ± 0.01 ^d
ME	0.21 ± 0.00 ^c	0.25 ± 0.00 ^c
GE	2.80 ± 0.02 ^a	3.17 ± 0.00 ^a
GEH	0.55 ± 0.01 ^b	0.59 ± 0.01 ^b
BITC	50.2 ± 0.01 µg/mL	65.1 ± 0.01 µg/mL
OX	7.5 ± 0.01 µg/mL	12.5 ± 0.01 µg/mL

Datos expresados como la media ± EE de tres experimentos independientes. Valores CI_{50} obtenidos con software Prisma 7. Diferentes letras difieren estadísticamente ($p < 0.05$). BITC: Bencil isotiocianato (estándar); OX: oxaliplatino (control positivo).

De manera global, los valores de la CI_{50} obtenidos para las células HCT116 fueron más bajos que en las células HT-29 para los extractos (AE, ME, GE y GEH), el bencil isotiocianato y el oxaliplatino. Esta tendencia ha sido evidenciada en otros estudios, donde los valores de la CI_{50} de varios fármacos o de compuestos dietarios como las antocianinas son mayores en células HT-29 en comparación con células HCT116 (Richard *et al.*, 2015; Mazewski *et al.*, 2017).

VII.5.2 Efecto de los diferentes extractos de hojas de moringa sobre la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH)

El efecto de los extractos de hojas de moringa sobre la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en células HCT116 y HT-29 suplementadas con los valores de la CI_{50} se muestran en la Figuras 35A y 35B. AE y ME incrementaron la actividad de lactato deshidrogenasa en ambas líneas celulares; GEH solo la incrementó en HCT116, mientras GE no mostró diferencias significativas en comparación con las células no suplementadas ($p < 0.05$). Debido a que LDH se considera una enzima intracelular, localizada en la mitocondria, su liberación o filtración del citoplasma al medio se ha asociado con cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática y/o la incidencia de necrosis (Chan *et al.*, 2013).

Respecto al porcentaje de citotoxicidad, AE, ME y GEH presentaron el mayor en células HCT116 (Figura 35C) (20.1%, 21%, 21.5% respectivamente) y solo AE y ME en células HT-29 (Figura 35D) (19.8% y 22%, respectivamente) en comparación con las células sin tratamiento (C-) ($p < 0.05$). Tendencia similar fue encontrada por Reda *et al.*, 2017, quienes reportaron un efecto citotóxico a partir de la suplementación de un extracto acuoso de hojas de *Moringa oleifera* durante 24 h en tres líneas celulares de cáncer de colon (HCT116, HCT116P53 y Caco2). De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, los extractos de moringa (AE, ME y GEH) podrían estar afectando la integridad de la membrana conduciendo de esta forma a la muerte celular, principalmente a través de la producción de EROs y la liberación de LDH.

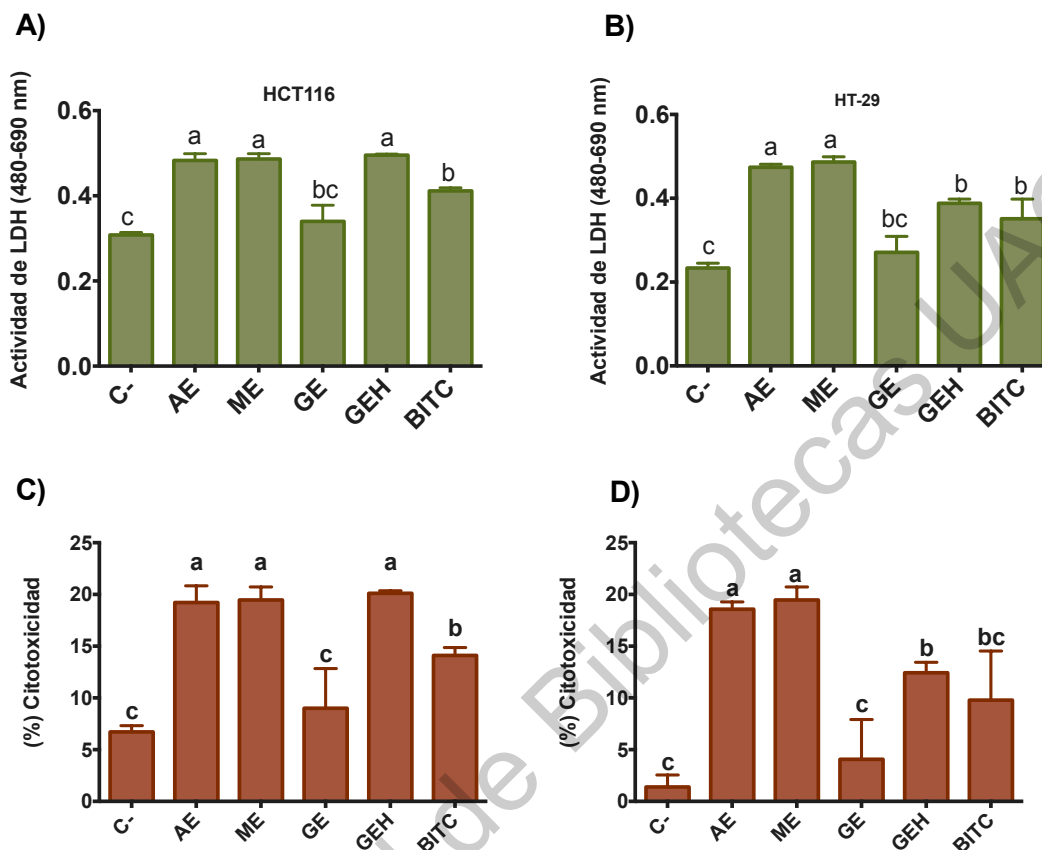


Figura 35. Actividad de LDH y porcentaje de citotoxicidad en células colorrectales humanas (A, C) HCT116 y (B, D) HT-29 suplementadas con la CI_{50} del extracto acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH), bencil isotiocianato (BITC) durante 24 h. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras sobre las barras son estadísticamente diferente ($p < 0.05$).

VII.5.3 Efecto de los diferentes extractos de hojas de moringa sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs)

La Figura 36 muestra el efecto de los extractos de hojas de *Moringa oleifera* en la producción de EROs en células HCT116 y HT-29 (Figuras 35A y 35B, respectivamente). En ambas líneas celulares, AE, GEH y OX exhibieron la mayor producción de EROs (1358, 1642.83 y 1668.7 para HCT116; 1328, 1455.17 y 1400.4 para HT-29; expresadas en RFU; Unidades Relativas de Fluorescencia).

Mayores niveles de EROs se observaron en la línea celular HCT116 en comparación con HT-29 ($p < 0.05$). Se ha reportado que el efecto de las EROs sobre el desarrollo de células tumorales depende en gran medida de la línea celular; por ejemplo, para HCT116, las EROs impactan la ruta de la cinasa N-terminal c-Jun (JNK), aumentando la expresión de proteínas pro-apoptótica y la concentración de Ca^{2+} , disminuyendo de esta forma su potencial de membrana mitocondrial (Khan y Kang, 2017; Liu *et al.*, 2016). Mientras en HT-29, se ha reportado que las EROs estimulan una necroptosis dependiente de EROs que también afecta la vía JNK y aumenta los niveles de caspasa-3 y caspasa-8 (Park *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2017). Las EROs se producen principalmente en el retículo endoplásmico, generando transportes de electrones y una respuesta de proteína desplegada que se traduce en la célula en la detención del ciclo celular y la afectación de la diferenciación celular (Cao y Kaufman, 2014). En años recientes, las terapias con EROs han llamado la atención, ya que se ha propuesto que la generación de EROs muestra poco o nulo efecto secundario en las células normales; mientras que, produce la muerte de células tumorales, alterando su crecimiento y desencadenando la producción de citocinas proinflamatorias (Lin *et al.*, 2017).

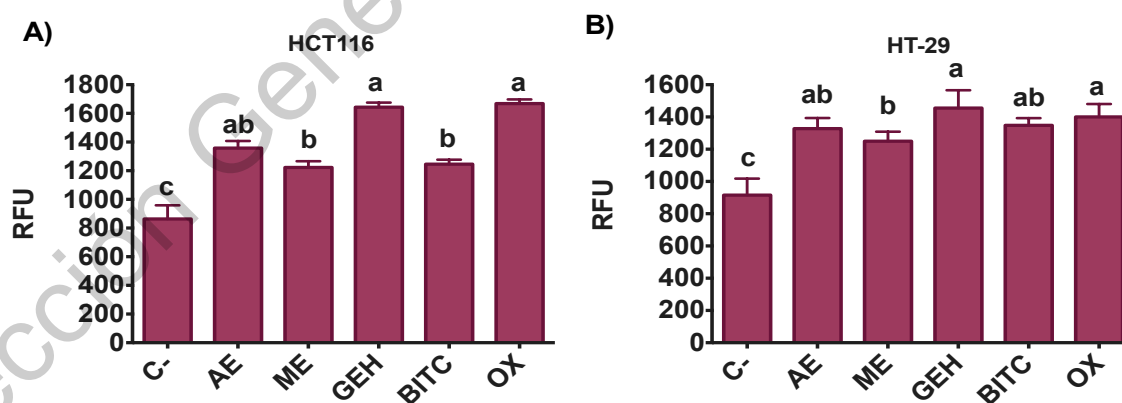


Figura 36. Producción de EROs en células colorrectales humanas (A) HCT116 y (B) HT-29 suplementadas con valores de la CI_{50} del extracto acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH), Bencil isotiocianato (BITC) y oxaliplatino (OX) durante 24 h. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras sobre las barras son estadísticamente diferente ($p < 0.05$). RFU: Unidades Relativas de Fluorescencia.

VII.5.4 Efecto de los diferentes extractos de hojas de moringa sobre la producción de citocinas proinflamatorias

Con respecto a la producción de citocinas proinflamatorias (Figura 36), las dos líneas celulares exhibieron el mismo patrón en la producción de las citocinas evaluadas (IL-1 β y TNF- α). GEH, BITC y OX fueron los tratamientos que mostraron los valores más bajos de IL-1 β en HCT116 y HT-29 (47.32, 43.47, and 35.54 pg/mL; 43.80, 40.40, and 32.07 pg/mL, para cada línea celular, respectivamente) y TNF- α (231.03, 130.64, and 119.21 pg/mL; 291.38, 187.93, and 170.69 pg/mL, respectivamente para cada línea celular). La mayoría de las EROs se producen en respuesta a las citocinas proinflamatorias, que pueden ser reguladas a nivel postraduccional por ellas (Holmström y Finkel, 2014). Las citocinas pueden interrumpir la transferencia normal de electrones y aumentar la tasa de fuga de electrones derivados de la cadena respiratoria, mejorando la formación de EROs (Yang *et al.*, 2013). En consecuencia, las EROs también puede activar factores de transcripción que contribuye a la liberación de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1 y TNF- α y desencadenar la activación de la caspasa-1 con el objetivo de liberar IL-1 β e IL-18, ambos involucrados en el desarrollo del inflammasoma (Marszałek *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2017).

TNF- α es una citocina importante en la progresión de tumores a través de la mejora de la proliferación, supervivencia y migración de células tumorales; por lo tanto, reducir sus concentraciones podría ser beneficioso como estrategia contra el cáncer. En las células HCT116, el TNF- α está regulado por miR-105, que estimula la expresión de p65, fosforilando IKK α/β e IKB α en el citoplasma (Shen *et al.*, 2017). Hasta el momento no hay reportes de los efectos de isotiocianatos sobre citocinas proinflamatorias en las líneas celulares de cáncer colorrectal, pero se ha informado de los efectos inhibitorios *in vivo* del isotiocianato de alilo en la producción de TNF- α durante la angiogénesis e *in vitro* en macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS (Thejass y Kuttan, 2007). Extractos ricos en isotiocianatos obtenidos de semillas de

Moringa oleifera han demostrado que inhiben la producción de IL-1 β asociada con el bloqueo de la ruta de NF-kB, un paso esencial para inducir la producción de IL-1 β asociada a inflamomasoma (Jaja-Chimedza *et al.*, 2017).

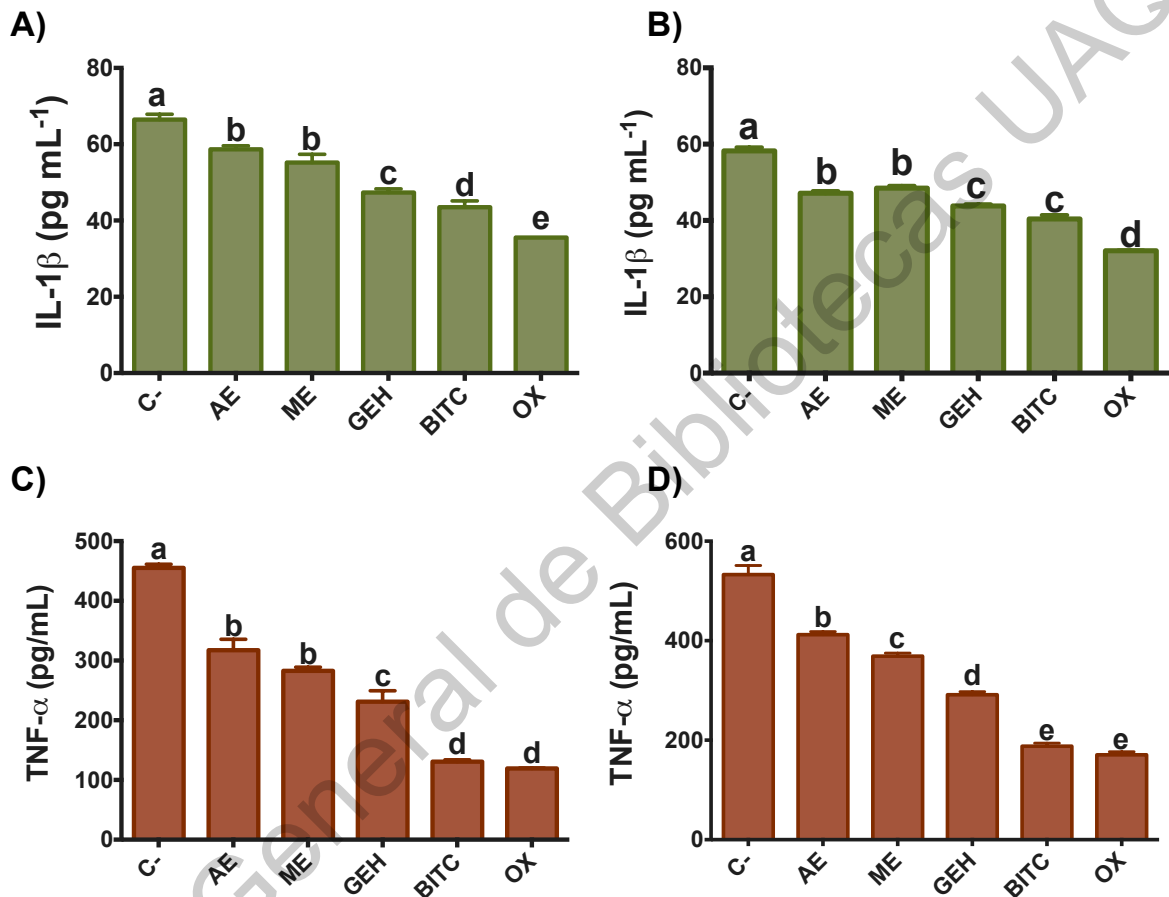


Figura 37. Producción de citocinas proinflamatorias en células colorrectales humanas (A) HCT116 y (B) HT-29 suplementadas con valores de la CI_{50} del extracto acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH), Bencil isotiocianato (BITC) y oxaliplatino (OX). Los datos se expresan como la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras sobre las barras son estadísticamente diferente ($p < 0.05$).

VII.5.5 Efecto de los diferentes extractos de hojas de moringa sobre la inducción de apoptosis en HCT116 y HT-29

El efecto de los extractos de hojas de moringa sobre la apoptosis medida por citometría de flujo se muestra en la Figura 38 (HCT116) y la Figura 39 (HT-29). La población de células apoptóticas HCT116 y HT-29 en comparación con el control aumentó significativamente para todos los tratamientos, especialmente para GEH y OX (control positivo), los cuales mostraron los valores más altos en ambas líneas celulares (56.2 y 56.58% para HCT116; 39 y 42.5% para HT-29; respectivamente). Entre los extractos de *Moringa oleifera*, los extractos acuosos exhibieron un potencial pro-apoptótico significativamente mayor que los extractos metanólicos, lo que podría confirmarse en las concentraciones inhibitorias significativamente más bajas ($p < 0.05$).

La mayor parte del potencial proapoptótico de los extractos de *Moringa oleifera* encontrada en el presente estudio podría atribuirse a los isotiocianatos (generados por la hidrólisis de los glucosinolatos), los cuales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de células tumorales mediante la regulación de NF- κ B en la vía mediada por EROs-Nrf2-ARE (Soundararajan y Kim, 2018). Los productos hidrolíticos de los extractos de acetato de etilo y diclorometano de *Brassica juncea*, un vegetal rico en glucosinolatos, demostraron un alto potencial inhibitor de las células de cáncer de colon HCT116 (CI₅₀: 61.50 y 78.86 μ g/mL); los isotiocianatos encontrados en dichos extractos fueron el isotiocianato de alilo y el 3-(metiltio)-propyl isotiocianato (Bassan *et al.*, 2018).

Por otra parte, se ha reportado que en células HT-29, BITC previene específicamente la metástasis mediante la supresión de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 y, por lo tanto, afecta la migración de células HT-29 (Lai *et al.*, 2010). Así también se ha descrito que BITC inhibe la vía de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/AKT y simultáneamente regula al alza las proteínas relacionadas con la apoptosis (Lopiccolo *et al.*, 2008). Estos efectos potenciales de los isotiocianatos podrían usarse sinérgicamente con OX, un fármaco de tercera generación basado en platino de conocido efecto pro-apoptótico en líneas celulares de cáncer colorrectal. El oxaliplatino se une covalentemente al ADN que produce

aductos de ADN de platino inter e intracatenarios, lo que altera los procesos esenciales que provocan la muerte celular y la activación de las vías apoptóticas relacionadas con el daño del ADN (Howells *et al.*, 2007).

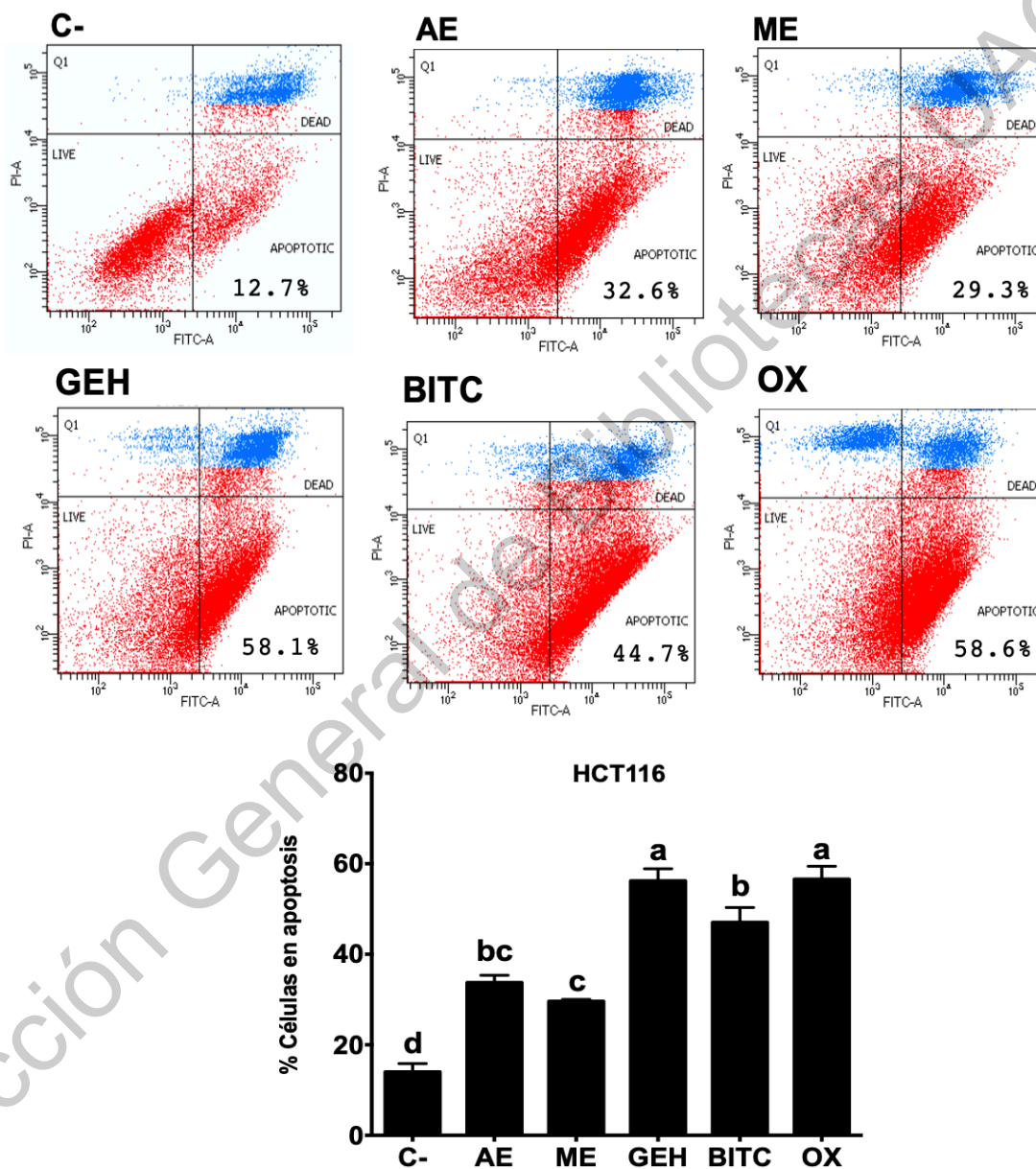


Figura 38. Efecto de los diferentes extractos sobre la inducción de apoptosis en células HCT116. Las células se suplementaron con valores de la CI_{50} del extracto

acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH), Bencil isotiocianato (BITC) y oxaliplatino (OX).

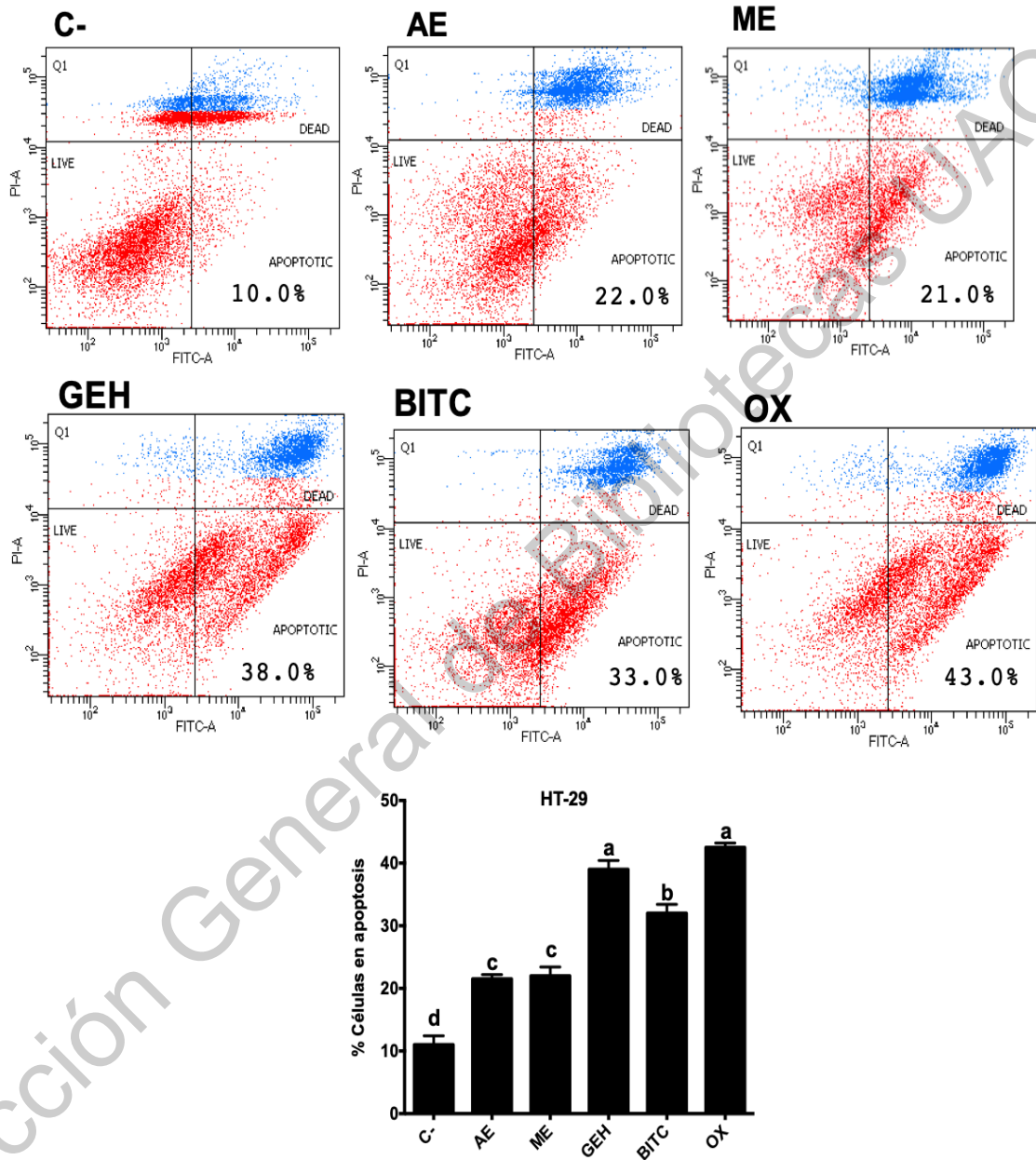


Figura 39. Efecto de los diferentes extractos sobre la inducción de apoptosis en células HT-29. Las células se suplementaron con valores de la CI_{50} del extracto acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH), Bencil isotiocianato (BITC) y oxaliplatino (OX).

VII.5.6 Efecto de los extractos de hojas de moringa sobre la expresión proteica de marcadores de apoptosis

La Figura 40 muestra las imágenes representativas del análisis de la expresión proteica de marcadores de apoptosis, así como la cuantificación de la expresión proteica relativa al control (%) y normalizada contra GAPDH, para células de cáncer de colon HCT116 (Figura 40A) y HT-29 (Figura 40B).

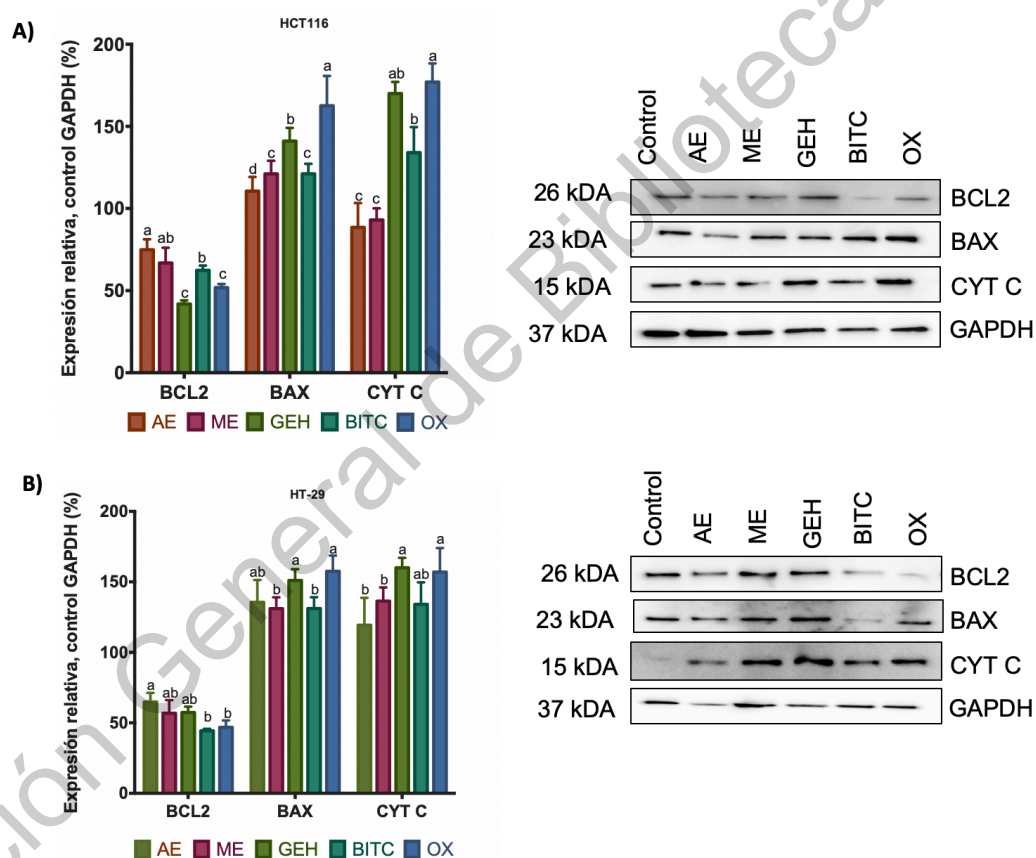


Figura 40. Efecto de los diferentes extractos sobre la expresión de marcadores de apoptosis en células HT-29. Las células se suplementaron con valores de la CI50 del extracto acuoso (AE), extracto metanólico (ME), extracto de glucosinolatos (GE) y extracto de glucosinolatos hidrolizado (GEH), Bencil isotiocianato (BITC) y oxaliplatino (OX).

Los marcadores de apoptosis evaluados exhibieron la misma tendencia para ambas líneas celulares. GEH indujo la expresión de Bax y Cyt c y disminuyó la expresión de Bcl-2 en comparación con el control ($p < 0.05$). AE y ME mostraron la misma tendencia que GEH pero en menor medida. Como se observó en las imágenes de citometría de flujo (Figuras 38 y 39), estos tratamientos que indujeron la apoptosis actuaron a través de la vía apoptótica intrínseca, lo que implica la dimerización de BAX y BCL2 para liberar el Citocromo C e iniciar el ensamblaje del apoptosoma, seguido de caspasa-9 y activación de caspasa-3 (Howells *et al.*, 2007).

Es importante tener en cuenta que los efectos pro-apoptóticos de OX en las líneas celulares HCT116 o HT-29 dependen del tiempo de exposición, donde se ha observado que los efectos principales son entre 14-24 h y 12-24 h, respectivamente para HCT116 y HT-29 (Howells *et al.*, 2007). De acuerdo con el porcentaje de inducción de apoptosis de BITC y la disminución encontrada de BAX, se podría inferir que BITC, incrementó la susceptibilidad de las células tumorales a la apoptosis desencadenando de esta forma la señal de muerte mitocondrial la cual ha sido previamente reportada (Arumugam y Abdull, 2018).

Correlaciones entre los compuestos químicos de *Moringa oleifera* y el efecto observado en la viabilidad celular y el estrés oxidativo (LDH, citotoxicidad y ROS), citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α), apoptosis y marcadores proapoptóticos (Bcl2, Bax y citocromo C) se muestran en la Figura 41 para las líneas celulares HCT116 (Figura 41A) y HT-29 (Figura 41B), respectivamente. En las células HCT116, la glucomoringina (GMG) presentó las correlaciones inversas más altas con la producción de ROS y la apoptosis ($p < 0.05$), el ácido clorogénico y el malonil glucósido de quercetina mostraron las correlaciones inversas más bajas ($p < 0.05$) con ROS, y GMG mostró correlaciones directas con la producción de IL-1 β y TNF- α . Con respecto a los marcadores proapoptóticos y la inducción de apoptosis, GMG y quercetina malonil glucósido mostraron la inducción proapoptótica más fuerte altamente correlacionada con la inducción de Bcl2. Para las células HT-29 (Figura

41B), menos compuestos se correlacionaron significativamente con los efectos observados. El malonil glucósido de quercetina mostró las correlaciones directas más altas con LDH, citotoxicidad y la producción de IL-1 β .

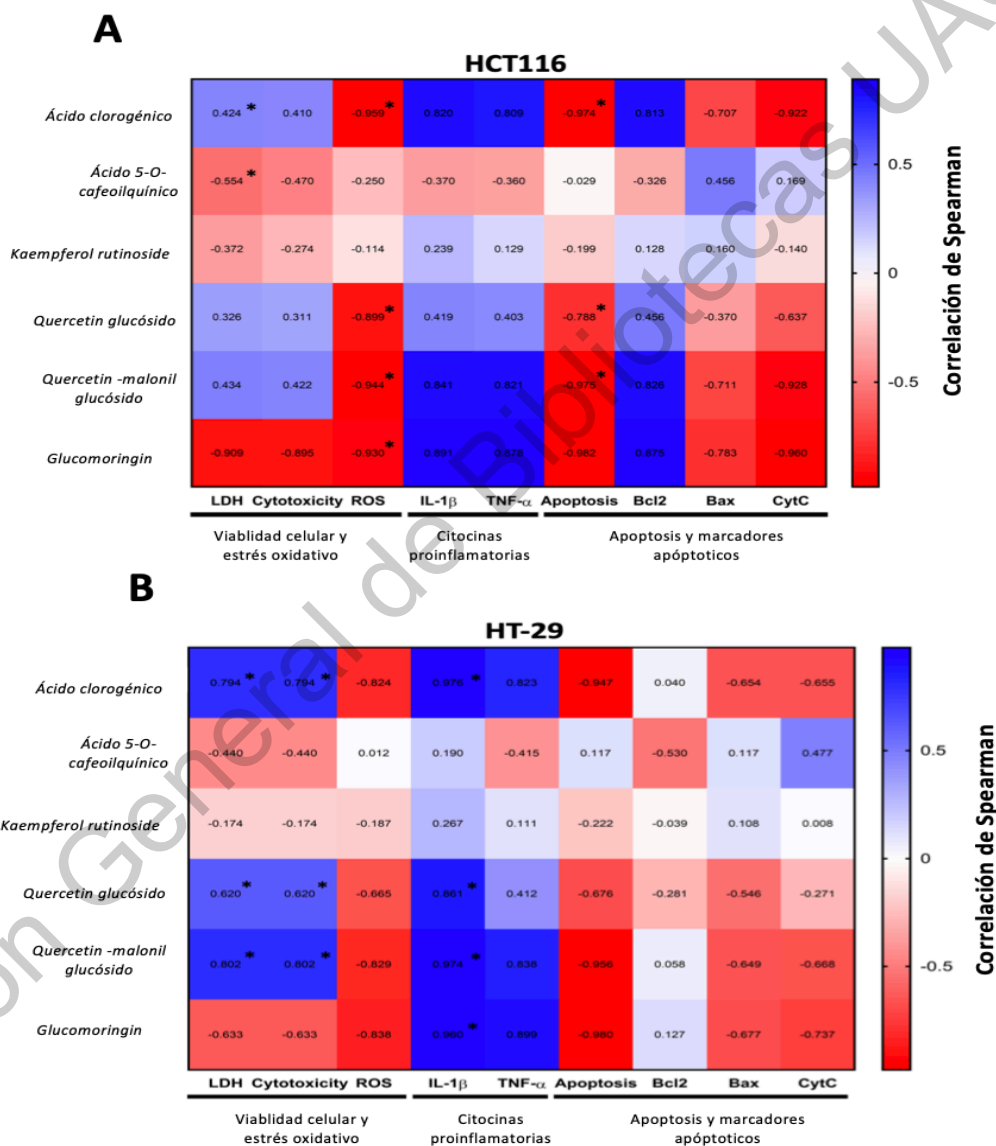


Figura 41. Correlación de Spearman entre los compuestos fenólicos y glucosinolatos presentes en los extractos de *Moringa oleifera* y marcadores biológicos observados en células (A) HCT116 y (B) HT-29.

INTEGRACIÓN DE RESULTADOS

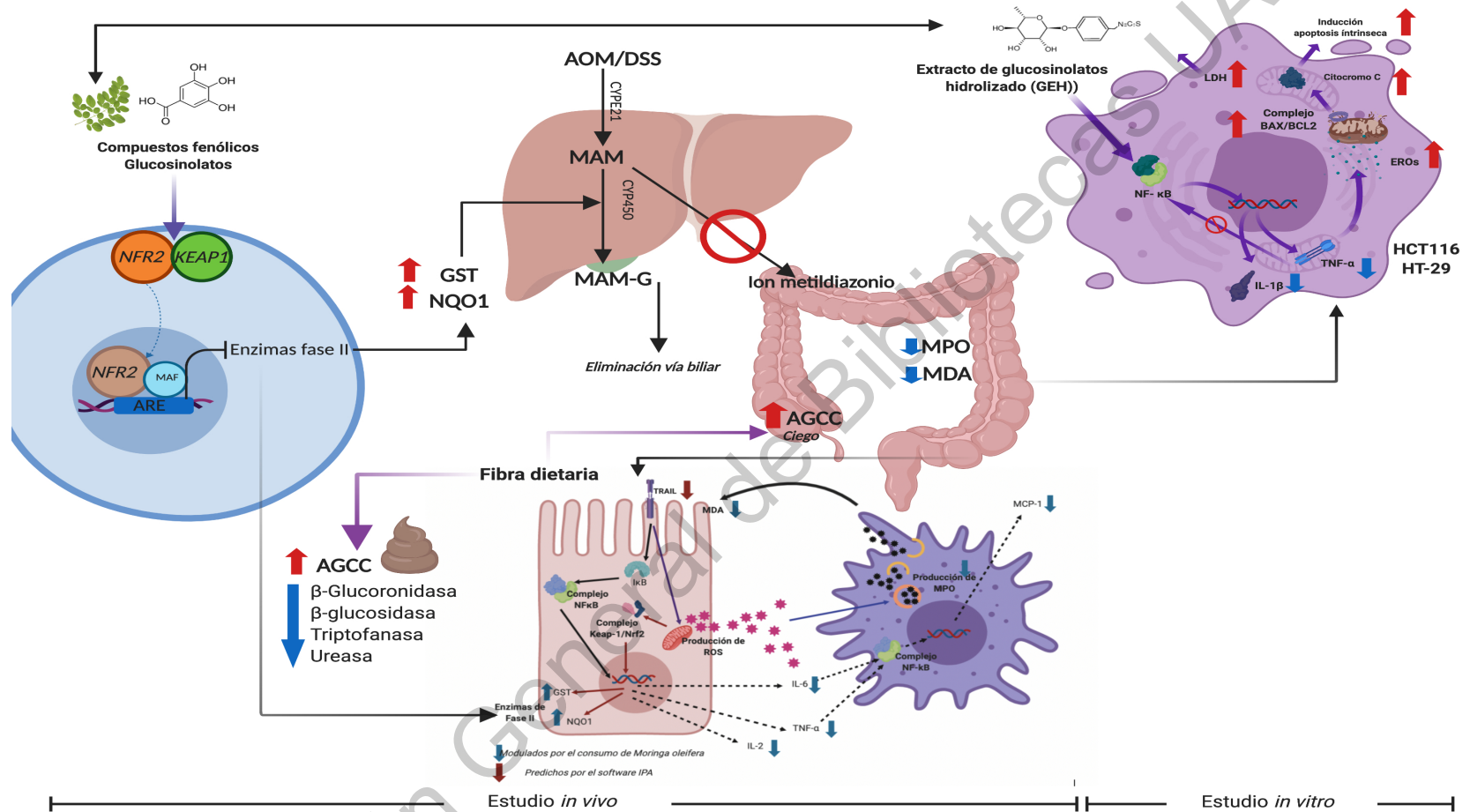


Figura 42. Integración del efecto del quimioprotector de hojas de moringa en los modelos *in vivo* e *in vitro* de cáncer de colon.

VIII. CONCLUSIONES

Las hojas de moringa (*Moringa oleifera*) son fuente de compuestos bioactivos (fibra, ácidos fenólicos y flavonoides) y su consumo presenta potencial antioxidante y quimioprotector a través de la inducción de enzimas de fase II y disminución de marcadores de inflamación como el nivel de peroxidación de lípidos y la actividad de mieloperoxidasa en un modelo de carcinogénesis colorrectal asociado a colitis. La administración de hojas de moringa redujo los niveles de β -glucuronidasa fecal y mieloperoxidasa colónica y promueve la disminución significativa de genes y proteínas asociados al agravamiento de la respuesta inflamatoria dentro del proceso de cáncer de colon.

Los extractos de hojas de Moringa demostraron ser efectivos para inducir apoptosis en células de cáncer de colon humano, proporcionando una base para estudios adicionales sobre el aislamiento, caracterización y evaluación mecánica de los compuestos bioactivos responsables de la actividad antiproliferativa de esta planta. El extracto de glucosinolatos hidrolizado de *Moringa oleifera* ejerció su máximo efecto inhibitorio contra células de cáncer de colon HCT116 y HT-29, estimulando una actividad citotóxica que desencadenó la vía pro-apoptótica intrínseca dependiente de EROs, a través de la disminución de la expresión de Bcl-2, el aumento de Bax y la liberación del citocromo C.

Considerando el arreglo de genes y la evaluación de citocinas durante los estudios *in vivo* e *in vitro* se podría sugerir que el consumo de hojas de moringa modula gran parte de los mecanismos antiinflamatorios a través de la regulación negativa de genes como IL-2, IL-6 y TNF- α involucrados con la vía de NF- κ B, evitando así el desarrollo de cáncer de colon durante estadios tempranos. Este estudio confirma el efecto quimiopreventivo de derivados de fuentes alimenticias funcionales como las hojas de *Moringa oleifera*, las cuales podrían usarse como alternativas viables en la prevención del cáncer colorrectal.

Estudios adicionales *in vivo* sobre el consumo del extracto de glucosinolatos de hojas de moringa en modelos de carcinogénesis colorrectal, permitirán obtener bases científicas adicionales para el desarrollo de productos y/o fármacos con fines terapéuticos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abdella, E. M., Mahmoud, A. M., & El-Derby, A. M. (2016). Brown seaweeds protect against azoxymethane-induced hepatic repercussions through up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and attenuation of oxidative stress. *Pharmaceutical biology*, 54(11), 2496-2504.
- Abdullah, A., Ezekiel, A. O., Opara, J. A., & Abdulkadir, M. A. (2019). Benefits of *Moringa oleifera* Plant as A Functional Food in Health and Diseases. *International Journal of Medical Science and Clinical Research Studies*, 1(1), 12-15.
- activity against early stage human HCT-116 colon cancer cells and colon cancer
- Adedapo, A. D. A., Jegede, O. T., Omobowale, T. O., Nabofa, W., & Oyagbemi, A. (2018). Safety and Efficacy of Methanol Fraction of *Moringa oleifera* as Antihypertensive in L-NAME Induced Hypertensive Rabbits: Bedside to Bench, Implications for Bench Back to Bedside. *Journal of Nutritional Therapeutics*, 7(2), 51-58.
- Aekthammarat, D., Pannangpetch, P., & Tangsucharit, P. (2019). *Moringa oleifera* leaf extract lowers high blood pressure by alleviating vascular dysfunction and decreasing oxidative stress in L-NAME hypertensive rats. *Phytomedicine*, 54, 9-16.
- Agrawal S., Bhattacharya A., Manhas J., Sen S. (2019) Molecular Diagnostics in Colorectal Cancer. In: Shukla K., Sharma P., Misra S. (eds) *Molecular Diagnostics in Cancer Patients*. Springer, Singapore
- Agrawal, S. N. (2016). p53: Its role in carcinogenesis and also a novel target for anticancer therapy. *IOSR-JDMS*, 15(9), 28-34.
- Al-Asmari, A. K., Albalawi, S. M., Athar, M. T., Khan, A. Q., Al-Shahrani, H., & Islam, M.(2015). *Moringa oleifera* as an anti-cancer agent against breast and colorectal cancer cell lines. *PLoS ONE*, 10(8), 1–14
- Al-Salihi, M., Reichert, E., Fitzpatrick, F.A., 2015. Influence of myeloperoxidase on colon tumor occurrence in inflamed versus non-inflamed colons of ApcMin/+mice. *Redox Biol.* 6, 218–225

- Alain Mune Mune, M., Nyobe, E. C., Bakwo Bassogog, C., & Minka, S. R. (2016). A comparison on the nutritional quality of proteins from *Moringa oleifera* leaves and seeds. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1213618.
- Alamro, R. A., Mustafa, M., & Al-Asmari, A. K. (2018). Inflammatory gene mRNA expression in human peripheral blood and its association with colorectal cancer. *Journal of inflammation research*, 11, 351.
- Alcindor, T., & Beauger, N. (2011). Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current oncology*, 18(1), 18.
- An, H. M., Park, S. Y., Lee, D. K., Kim, J. R., Cha, M. K., Lee, S. W., ... Ha, N. J. (2011). Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats. *Lipids in Health and Disease*, 10(1), 116.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists (2002). Official Methods of Analysis. 17th ed.; Arlington, VA. Métodos: 920.39, 920.85, 920.105, 925.23, 991.43.
- Arumugam, A., & Abdull Razis, A. F. (2018). Apoptosis as a Mechanism of the Cancer Chemopreventive Activity of Glucosinolates: A Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 19(6), 1439–1448.
- Axelrad, J. E., Lichtiger, S., & Yajnik, V. (2016). Inflammatory bowel disease and cancer: The role of inflammation, immunosuppression, and cancer treatment. *World journal of gastroenterology*, 22(20), 4794.
- Azcárate-Peril, M. A., Sikes, M., & Bruno-Bárcena, J. M. (2011). The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: A putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 301(3), 401–424.
- Bahrami, A., Hassanian, S. M., ShahidSales, S., Farjami, Z., Hasanzadeh, M., Anvari, K., ... & Avan, A. (2018). Targeting RAS signaling pathway as a potential therapeutic target in the treatment of colorectal cancer. *Journal of cellular physiology*, 233(3), 2058-2066.
- Barcellos-Hoff, M. H., Lyden, D., & Wang, T. C. (2013). The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 13(7), 511.

- Barnes, J. L., Zubair, M., John, K., Poirier, M. C., & Martin, F. L. (2018). Carcinogens and DNA damage. *Biochemical Society Transactions*, 46(5), 1213-1224
- Bassan, P., Bhushan, S., Kaur, T., Arora, R., Arora, S., & Vig, A. P. (2018). Extraction, profiling and bioactivity analysis of volatile glucosinolates present in oil extract of *Brassica juncea* var. *raya*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(3), 399–409.
- Berkovich, L., Earon, G., Ron, I., Rimmon, A., Vexler, A., & Lev-Ari, S. (2013). *Moringa oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappaB and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 212.
- Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*, 54(9), 2325-2340.
- Bhattacharya A, Tiwari P, Sahu P, Kumar S. (2018) A review of the phytochemical and pharmacological characteristics of *Moringa oleifera*. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 10:181.
- Bird R. P. 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.*30:147-151.
- Bondurant, K.L., Lundgreen, A., Herrick, J.S., Kadlubar, S., Wolff, R.K., Slattery, M.L., 2013. Interleukin genes and associations with colon and rectal cancer risk and overall survival. *International Journal of Cancer*. 132, 905–915
- Boroughs, L. K., & DeBerardinis, R. J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nature cell biology*, 17(4), 351.
- Boscaro, V., Boffa, L., Binello, A., Amisano, G., Fornasero, S., Cravotto, G., & Gallicchio, M. (2018). Antiproliferative, Proapoptotic, Antioxidant and Antimicrobial Effects of *Sinapis nigra* L. and *Sinapis alba* L. *Extracts. Molecules*, 23(11), 3004.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*,

68:394–424. doi:10.3322/caac.21492.

- Brunelli, D., Tavecchio, M., Falcioni, C., Frapolli, R., Erba, E., Iori, R., & D'Incalci, M. (2010). The isothiocyanate produced from glucomoringin inhibits NF- κ B and reduces myeloma growth in nude mice in vivo. *Biochemical pharmacology*, 79(8), 1141-1148.
- Campos-Vega, R., Dave Oomah, B., & Vergara-Castañeda, H. A. (2017). In vivo and in vitro studies on dietary fiber and gut health. *Dietary Fiber Functionality in Food and Nutraceuticals: From Plant to Gut*, 123-177.
- Candido J & Hagemann T. (2013). Cancer-Related Inflammation. *J Clin Immunol* 33:79–84.
- Cao, S. S., & Kaufman, R. J. (2014). Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in Cell Fate Decision and Human Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(3), 396–413.
- Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G., Oomah, B.D. (2002). Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:6975-6980.
- Carr, P. R., Alwers, E., Bienert, S., Weberpals, J., Kloor, M., Brenner, H., & Hoffmeister, M. (2018). Lifestyle factors and risk of sporadic colorectal cancer by microsatellite instability status: a systematic review and meta-analyses. *Annals of Oncology*, 29(4), 825-834.
- Carranco, Z. M., Sáenz, E. O., Ornelas, E. G., Barragán, H. B., Ruiz, J. A., Alvarado, R. E. V., & de la Rosa, R. C. (2016). Crecimiento y producción de biomasa de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) bajo las condiciones climáticas del Noreste de México. *Tecnociencia Chihuahua*, 10(3).
- Challa, A., Rao, D. R., Chawan, C. B., & Shackelford, L. (1997). Bifidobacterium longum and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 18(3), 517–521
- Chan, F. K. M., Moriwaki, K., & De Rosa, M. J. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. In *Immune Homeostasis* (pp. 65-70). Humana Press, Totowa, NJ.

- Chandrasinghe, P., Cereser, B., Moorghen, M., Al Bakir, I., Tabassum, N., Hart, A., ... & Warusavitarne, J. (2018). Role of SMAD proteins in colitis-associated cancer: from known to the unknown. *Oncogene*, 37(1), 1.
- Charepalli, V., Reddivari, L., Vadde, R., Walia, S., Radhakrishnan, S., & Vanamala, J. K.P. (2016). Eugenia jambolana (java plum) fruit extract exhibits anti-cancer
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2014). Dextrán sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current protocols in immunology*, 104(1), 15-25.
- Cheenpracha, S., Park, E. J., Yoshida, W. Y., Barit, C., Wall, M., Pezzuto, J. M., & Chang, L. C. (2010). Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(17), 6598-6602.
- Chen, G., Yang, Y., Hu, C., Cheng, X., & Xu, Y. (2016). Protective effects of Huangqin Decoction against ulcerative colitis and associated cancer in mice. *Oncotarget*, 7(38), 61643–61655.
- Chen, J., & Huang, X. F. (2009). The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer biology & therapy*, 8(14), 1313-1317.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., ... & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204.
- Chikara, S., Mamidi, S., Sreedasyam, A., Chittem, K., Pietrofesa, R., Zuppa, A., ... & Reindl, K. M. (2018a). Flaxseed consumption inhibits chemically induced lung tumorigenesis and modulates expression of Phase II enzymes and inflammatory cytokines in A/J mice. *Cancer Prevention Research*, 11(1), 27-37
- Chikara, S., Nagaprashantha, L. D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S., & Singhal, S. S. (2018b). Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters*, 413, 122-134.
- Chow AY. (2010). Cell cycle control by oncogenes and tumor suppressors: driving the

- transformation of normal cells into cancerous cells. *Nature Education* 3:7-12.
- Coppin, J. P., Xu, Y., Chen, H., Pan, M. H., Ho, C. T., Juliani, R., ... & Wu, Q. (2013). Determination of flavonoids by LC/MS and anti-inflammatory activity in *Moringa oleifera*. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1892-1899.
- Costea, T., Hudiță, A., Ciolac, O.-A., Gălățeanu, B., Ginghină, O., Costache, M., Ganea, C., Mocanu, M.-M. (2018). Chemoprevention of colorectal cancer by dietary compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 19, 3787.
- Coz-Bolaños, X., Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., Loarca-Piña, G. F., & Guzmán-Maldonado, S. H. (2018). Moringa infusion (*Moringa oleifera*) rich in phenolic compounds and high antioxidant capacity attenuate nitric oxide pro-inflammatory mediator in vitro. *Industrial Crops and Products*, 118, 95-101.
- Das, B. N., Kim, Y. W., & Keum, Y. S. (2013). Mechanisms of Nrf2/Keap1-dependent phase II cytoprotective and detoxifying gene expression and potential cellular targets of chemopreventive isothiocyanates. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- Davis, C. D., & Ross, S. (2019). Diet and cancer prevention. *Lifestyle Medicine*, 409.
- De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M. L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., ... & Fazio, V. M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of carcinogenesis*, 10(1), 9.
- De-Souza, A. S. C., & Costa-Casagrande, T. A. (2018). Animal models for colorectal cancer. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, 31(2).
- Donovan, M. G., Selmin, O. I., Doetschman, T. C., & Romagnolo, D. F. (2016). Mediterranean Diet, Inflammatory Bowel Diseases, and Colon Cancer. *Mediterranean Diet*. p. 181-201.
- Drew, D. A., Mo, A., Grady, J. J., Stevens, R. G., Levine, J. B., Brenner, B. M., ... & Rosenberg, D. W. (2018). Proximal aberrant crypt foci associate with synchronous neoplasia and are primed for neoplastic progression. *Molecular Cancer Research*, 16(3), 486-495.

- Dyson, N. J. (2016). RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes & development*, 30(13), 1492-1502.
- Eichele, D. D., & Kharbanda, K. K. (2017). Dextrán sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World journal of gastroenterology*, 23(33), 6016-29.
- Elaraj, D. M., Weinreich, D. M., Varghese, S., Puhlmann, M., Hewitt, S. M., Carroll, N. M., ... & Alexander, H. R. (2006). The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. *Clinical Cancer Research*, 12(4), 1088-1096.
- El-Sohaimy, S. A., Hamad, G. M., Mohamed, S. E., Amar, M. H., & Al-Hindi, R. R. (2015). Biochemical and functional properties of *Moringa oleifera* leaves and their potential as a functional food. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*. ISSN: 2315-5094. 4(4): 188-199
- Erzinger, M. M., Bovet, C., Uzozie, A., & Sturla, S. J. (2015). Induction of Complementary Function Reductase Enzymes in Colon Cancer Cells by Dithiole-3-thione versus Sodium Selenite. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 29(1), 10-20.
- Fahey, J. W., Olson, M. E., Stephenson, K. K., Wade, K. L., Chodur, G. M., Odee, D., ... & Hubbard, W. C. (2018). The diversity of chemoprotective glucosinolates in Moringaceae (*Moringa* spp.). *Scientific reports*, 8(1), 7994.
- Fahey, J. W., Wade, K. L., Stephenson, K. K., Shi, Y., Liu, H., Panjwani, A. A., ... & Olson, M. E. (2019). A Strategy to Deliver Precise Oral Doses of the Glucosinolates or Isothiocyanates from *Moringa oleifera* Leaves for Use in Clinical Studies. *Nutrients*, 11(7), 1547.
- Farnsworth, R. H., Achen, M. G., & Stacker, S. A. (2018). The evolving role of lymphatics in cancer metastasis. *Current opinion in immunology*, 53, 64-73.
- Feinberg, A. P. (2019). The molecular genetics of DNA methylation in colorectal cancer. *Cell and Molecular Biology of Colon Cancer*, 72.
- Feregrino-Pérez, A. A., Berumen, L. C., García-Alcocer, G., Guevara-Gonzalez, R. G., Ramos-Gomez, M., Reynoso-Camacho, R., ... & Loarca-Piña, G. (2008).

- Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on azoxymethane-induced colon cancer. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(18), 8737-8744.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.
- Fitriana, W. D., Ersam, T., Shimizu, K., & Fatmawati, S. (2016). Antioxidant activity of *Moringa oleifera* extracts. *Indonensian Journal of Chemistry*, 16(3), 297–301.
- Fofaria, N. M., Ranjan, A., Kim, S. H., & Srivastava, S. K. (2015). Mechanisms of the anticancer effects of isothiocyanates. In *the Enzymes*. Vol. 37, pp. 111-137.
- Forrest, C. M., McNair, K., Vincenten, M. C., Darlington, L. G., & Stone, T. W. (2016). Selective depletion of tumour suppressors Deleted in Colorectal Cancer (DCC) and neogenin by environmental and endogenous serine proteases: linking diet and cancer. *BMC cancer*, 16(1), 772.
- Förster, N., Ulrichs, C., Schreiner, M., Müller, C. T., & Mewis, I. (2015). Development of a reliable extraction and quantification method for glucosinolates in *Moringa oleifera*. *Food Chemistry*, 166, 456–464
- Fujii, T., Sakai, E., Takahashi, H., Yamada, E., Ohkubo, H., Higurashi, T., & Nakajima, A. (2017). The distribution of human rectal aberrant crypt foci and criteria for defining the counting area. *Oncology letters*, 13(6), 4501-4504.
- Fukumoto L.R., Mazza G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3597- 3604
- Gabriel, E., Attwood, K., Al-Sukhni, E., Erwin, D., Boland, P., & Nurkin, S. (2018). Age-related rates of colorectal cancer and the factors associated with overall survival. *Journal of gastrointestinal oncology*, 9(1), 96.
- Galal, A.M, Walker, L.A, & A Khan, I. (2014). Induction of GST and related events by dietary phytochemicals: sources, chemistry, and possible contribution to chemoprevention. *Current topics in medicinal chemistry*, 14(24), 2802-2821.
- Galuppo, M., Giacoppo, S., De Nicola, G. R., Iori, R., Navarra, M., Lombardo, G. E.,

- & Mazzon, E. (2014). Antiinflammatory activity of glucomoringin isothiocyanate in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Fitoterapia*, 95, 160-174.
- Ghanipour, L., Jirström, K., Sundström, M., Glimelius, B., & Birgisson, H. (2017). Associations of defect mismatch repair genes with prognosis and heredity in sporadic colorectal cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 43(2), 311-321.
- Gomes, C. C., Diniz, M. G., & Gomez, R. S. (2019a). The Molecular Basis of Carcinogenesis. In *Premalignant Conditions of the Oral Cavity* (pp. 7-26). Springer, Singapore.
- Gomes, S., Oliveira, C. S. F., Azevedo-Silva, J., Casanova, M. R., Barreto, J., Pereira, H., ... & Baltazar, F. (2019b). The role of diet-related short-chain fatty acids in colorectal cancer metabolism and survival: prevention and therapeutic implications. *Current medicinal chemistry*.
- Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. S. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*, 5(2), 49-56.
- Greenberg, M. V., & Bourc'his, D. (2019). The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1-18.
- Gründemann, C., & Huber, R. (2018). Chemoprevention with isothiocyanates—From bench to bedside. *Cancer letters*, 414, 26-33.
- Gudkov, A. V., & Komarova, E. A. (2016). p53 and the carcinogenicity of chronic inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(11), a026161.
- Gupta, R., Sinha, S., & Paul, R. N. (2018). The impact of microsatellite stability status in colorectal cancer. *Current problems in cancer*, 42(6), 548-559.
- Guzmán Maldonado, S. H., Zamarripa Colmenero, A., & Hernández Durán, L. G. (2015). Calidad nutrimental y nutracéutica de hoja de moringa proveniente de árboles de diferente altura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(2), 317–330.

- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hankey, W., Frankel, W. L., & Groden, J. (2018). Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(1), 159-172.
- Haristoy, X., Fahey, J. W., Scholtus, I. & Lozniewski, A. (2005). Evaluation of the antimicrobial effects of several isothiocyanates on *Helicobacter pylori*. *Planta Med.* 71(4), 326–330
- Hoffmann, M., Schwertassek, U., Seydel, A., Weber, K., Falk, W., Hauschildt, S., & Lehmann, J. (2018). A refined and translationally relevant model of chronic DSS colitis in BALB/c mice. *Laboratory animals*, 52(3), 240-252.
- Holmström, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(6), 411–421.
- Howells, L. M., Mitra, A., & Manson, M. M. (2007). Comparison of oxaliplatin- and curcumin-mediated antiproliferative effects in colorectal cell lines. *International Journal of Cancer*, 121(1), 175–183.
- Hong, S. N. (2018). Genetic and epigenetic alterations of colorectal cancer. *Intestinal research*, 16(3), 327.
- Howells, L. M., Mitra, A., & Manson, M. M. (2007). Comparison of oxaliplatin- and curcumin-mediated antiproliferative effects in colorectal cell lines. *International Journal of Cancer*, 121(1), 175–183.
- Jaafaru, M., Abd Karim, N., Mohamed Eliaser, E., Maitalata Waziri, P., Ahmed, H., Mustapha Barau, M., ... & Abdull Razis, A. (2018). Nontoxic Glucomoringin-Isothiocyanate (GMG-ITC) Rich Soluble Extract Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation of Human Prostate Adenocarcinoma Cells (PC-3). *Nutrients*, 10(9), 1174.
- Jaiswal, D., Rai, P. K., Mehta, S., Chatterji, S., Shukla, S., Rai, D. K., & Watal, G. (2013). Role of *Moringa oleifera* in regulation of diabetes-induced oxidative stress. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 6(6), 426-432.

- Jaja-Chimedza, A., Graf, B. L., Simmler, C., Kim, Y., Kuhn, P., Pauli, G. F., & Raskin, I. (2017). Biochemical characterization and anti-inflammatory properties of an isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extract. *PLOS ONE*, 12(8), e0182658.
- Javarsiani, M. H., Javanmard, S. H., & Colonna, F. (2019). Metastatic components in colorectal cancer. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 24.
- Jeggo, P. A., Pearl, L. H., & Carr, A. M. (2016). DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nature Reviews Cancer*, 16(1), 35.
- Jinghua, L., Linmei, S., Ping, H., Gothai, S., Muniandy, K., Kumar, S. S., ... & Arulselvan, P. (2018). Amelioration of oxidative stress through apoptosis-mediated pathway in colon cancer cells by hexane fraction of *Moringa oleifera* extract. *Pharmacognosy Magazine*, 14(57), 311.
- Ju, J., Gothai, S., Hasanpourghadi, M., Nasser, A. A., Ibrahim, I. A. A., Shahzad, N., ... & Arulselvan, P. (2018). Anticancer potential of *Moringa oleifera* flower extract in human prostate cancer PC-3 cells via induction of apoptosis and downregulation of AKT pathway. *Pharmacognosy Magazine*, 14(58), 477.
- Jung, I. L. (2014). Soluble extract from *Moringa oleifera* leaves with a new anticancer activity. *PloS one*, 9(4), 95492.
- Kang I, Choi S, Ha TJ, Choi M, Wi H, & Lee BW (2015). Effects of Mung bean (*Vigna radiata* L.) ethanol extracts decrease proinflammatory cytokine-induced lipogenesis in the KK-ay diabetes mouse model. *Journal of Medicinal Foods*, 18:841–9. doi:10.1089/jmf.2014.3364.
- Karimi, S., Chattopadhyay, S., & Chakraborty, N. G. (2015). Manipulation of regulatory T cells and antigen-specific cytotoxic T lymphocyte-based tumour immunotherapy. *Immunology*, 144(2), 186-196.
- Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in context. *Cell*, 170(6), 1062-1078.
- Katsidzira, L., Ocvirk, S., Wilson, A., Li, J., Mahachi, C. B., Soni, D., ... & O'Keefe, S. J. D. (2019). Differences in Fecal Gut Microbiota, Short-Chain Fatty Acids and

- Bile Acids Link Colorectal Cancer Risk to Dietary Changes Associated with Urbanization Among Zimbabweans. *Nutrition and cancer*, 1-12.
- Kemp, C. J. (2015). Animal models of chemical carcinogenesis: driving breakthroughs in cancer research for 100 years. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(10), pdb-top069906.
- Khan, I., & Kang, S. C. (2017). Apoptotic Activity of Lactobacillus plantarum DGK-17-Fermented Soybean Seed Extract in Human Colon Cancer Cells via ROS-JNK Signaling Pathway. *Journal of Food Science*, 82(6), 1475–1483
- Khor KZ, Lim V, Moses EJ, Abdul Samad N. (2018). The *in vitro* and *in vivo* anticancer properties of *Moringa oleifera*. *Evidence-Based Complement Altern Med*, 1–14. doi:10.1155/2018/1071243.
- Kim, E., Coelho, D., & Blachier, F. (2013). Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. *Nutrition research*, 33(12), 983-994.
- Kim, D. H., Sung, B., Kang, Y. J., Jang, J. Y., Hwang, S. Y., Lee, Y., ... & Chung, H. Y. (2014). Anti-inflammatory effects of betaine on AOM/DSS-induced colon tumorigenesis in ICR male mice. *International journal of oncology*, 45(3), 1250-1256.
- Kim, J. J., Shajib, M. S., Manocha, M. M., & Khan, W. I. (2012). Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (60).
- Kinsella, A. R. (2018). Multistage carcinogenesis and the biological effects of tumor promoters. In *Naturally Occurring Phorbol Esters* (pp. 33-61). CRC Press.
- Klaunig, J. E., & Wang, Z. (2018). Oxidative stress in carcinogenesis. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 116-121.
- Knickelbein, K., & Zhang, L. (2015). Mutant KRAS as a critical determinant of the therapeutic response of colorectal cancer. *Genes & diseases*, 2(1), 4-12.
- Kooltheat N, Pankla Sranujit R, Chumark P, Potup P, Laytragoon-Lewin N, Usuwanthim K. (2014). An ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* Lam. inhibits human macrophage cytokine production induced by cigarette smoke. *Nutrients*, 6:697–710.

- Kordahi M.C., William DePaolo R. (2018) The Influence of the Microbiota on the Etiology of Colorectal Cancer. In: Sun J., Dudeja P. (eds) Mechanisms Underlying Host-Microbiome Interactions in Pathophysiology of Human Diseases. *Physiology in Health and Disease*. Springer, Boston, MA
- Kosumi, K., Mima, K., Baba, H., & Ogino, S. (2018). Dysbiosis of the gut microbiota and colorectal cancer: the key target of molecular pathological epidemiology. *Journal of laboratory and precision medicine*, 3.
- Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F., & Vousden, K. H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(7), 393.
- Kulesz-Martin, M., Ouyang, X., Barling, A., Gallegos, J. R., Liu, Y., & Medler, T. (2017). Multistage Carcinogenesis: Cell and Animal Models. In *Carcinogenesis* (pp. 11-35).
- Kwak, M. K., Egner, P. A., Dolan, P. M., Ramos-Gomez, M., Groopman, J. D., Itoh, K., ... & Kensler, T. W. (2001). Role of phase 2 enzyme induction in chemoprotection by dithiolethiones. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 480, 305-315.
- Lai, K.-C., Huang, A.-C., Hsu, S.-C., Kuo, C.-L., Yang, J.-S., Wu, S.-H., & Chung, J.-G. (2010). Benzyl Isothiocyanate (BITC) Inhibits Migration and Invasion of Human Colon Cancer HT29 Cells by Inhibiting Matrix Metalloproteinase-2/-9 and Urokinase Plasminogen (uPA) through PKC and MAPK Signaling Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 2935–2942.
- Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring, A. D., ... & Biedrzycki, B. (2015). PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *New England Journal of Medicine*, 372(26), 2509-2520.
- Lennerz, J. K., van der Sloot, K. W., Le, L. P., Batten, J. M., Han, J. Y., Fan, K. C., ... & Korzenik, J. R. (2016). Colorectal cancer in Crohn's colitis is comparable to sporadic colorectal cancer. *International journal of colorectal disease*, 31(5), 973-982.
- Letai, A. (2017). Apoptosis and Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, 1(1),

275–294.

- Li, X. L., Zhou, J., Chen, Z. R., & Chng, W. J. (2015). P53 mutations in colorectal cancer-molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World journal of gastroenterology: WJG*, 21(1), 84.
- Lin, M., Zhang, J., & Chen, X. (2018). Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. *Journal of Functional Foods*, 47, 469-479.
- Lin, S., Li, Y., Zamyatnin, A. A., Werner, J., & Bazhin, A. V. (2017). Reactive oxygen species and colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 233(7), 5119–5132.
- Liu, T., Ren, J., Wang, W., Wei, X. W., Shen, G. B., Liu, Y. T., ... & He, Z. Y. (2015). Treatment of dextrán sodium sulfate-induced experimental colitis by adoptive transfer of peritoneal cells. *Scientific reports*, 5, 16760.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017a). NF-κB signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2, 17023.
- Liu, Y., Gao, J., Huang, S., Hu, L., Wang, Z., Wang, Z., ... & Li, W. (2016). 4-isothiocyanate-2, 2, 6, 6-tetramethyl piperidinoxyl inhibits angiogenesis by suppressing VEGFR2 and Tie2 phosphorylation. *Oncology letters*, 12(4), 2828-2834.
- Liu, Y., Sun, H., Hu, M., Zhang, Y., Chen, S., Tighe, S., & Zhu, Y. (2017b). The role of cyclooxygenase-2 in colorectal carcinogenesis. *Clinical colorectal cancer*, 16(3), 165-172.
- Long, A. G., Lundsmith, E. T., & Hamilton, K. E. (2017). Inflammation and colorectal cancer. *Current colorectal cancer reports*, 13(4), 341-351.
- Lopiccolo, J., Blumenthal, G., Bernstein, W., & Dennis, P. (2008). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. *Drug Resistance Updates*, 11(1–2), 32–50.
- Ma, H., Brosens, L. A., Offerhaus, G. J. A., Giardiello, F. M., de Leng, W. W., & Montgomery, E. A. (2018). Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. *Pathology*, 50(1), 49-59.
- Ma, Z. F., Ahmad, J., Zhang, H., Khan, I., & Muhammad, S. (2019). Evaluation of phytochemical and medicinal properties of *Moringa (Moringa oleifera)* as a

- potential functional food. *South African Journal of Botany*.
- Madrigal-Bujaidar, E., Roaro, L. M., García-Aguirre, K., Garcia-Medina, S., & Alvarez-Gonzalez, I. (2013). Grapefruit juice suppresses azoxymethane-induced colon aberrant crypt formation and induces antioxidant capacity in mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(11), 6851-6856.
- Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1997). Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. *The Journal of Agricultural Science*, 128(3), 311–322
- Maldini, M., Maksoud, S. A., Natella, F., Montoro, P., Petretto, G. L., Foddai, M. & Pintore, G. (2014). *Moringa oleifera*: study of phenolics and glucosinolates by mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 49(9), 900-910.
- Mallillin, A. C., Trinidad, T. P., Sagum, R. S., de Leon, M. P., Borlagdan, M. P., Baquiran, A. F. P., & Aviles, T. F. (2014). Mineral availability and dietary fiber characteristics of *Moringa oleifera*. *Food Public Health*, 4, 242-6.
- Mandal, P. (2018). Molecular signature of nitric oxide on major cancer hallmarks of colorectal carcinoma. *Inflammopharmacology*, 26(2), 331-336.
- Mannino, M. H., Zhu, Z., Xiao, H., Bai, Q., Wakefield, M. R., & Fang, Y. (2015). The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer letters*, 367(2), 103-107.
- Mansour, H. H., Ismael, N. E., & Hafez, H. F. (2014). Modulatory effect of *Moringa oleifera* against gamma-radiation-induced oxidative stress in rats. *Biomedicine & Aging Pathology*, 4(3), 265-272.
- Marcuello, M., Vymetalkova, V., Neves, R. P., Duran-Sanchon, S., Vedeld, H. M., Tham, E., ... & Castells, A. (2019). Circulating biomarkers for early detection and clinical management of colorectal cancer. *Molecular aspects of medicine*.
- Marszałek, A., Szyłberg, L., Wiśniewska, E., & Janiczek, M. (2012). Impact of COX-2, IL-1 β , TNF- α , IL-4 and IL-10 on the process of carcinogenesis in the large bowel. *Polish Journal of Pathology*, 63(4), 221–227.
- Mauer, J., Denson, J. L., & Brüning, J. C. (2015). Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends in immunology*, 36(2), 92-101.
- Mazewski, C., Liang, K., & de Mejia, E. G. (2017). Inhibitory potential of anthocyanin-

- rich purple and red corn extracts on human colorectal cancer cell proliferation in vitro. *Journal of functional foods*, 34, 254-265.
- Mazewski, C., & Gonzalez de Mejia, E. (2018). Impact of Anthocyanins on Colorectal Cancer. In *Advances in Plant Phenolics: From Chemistry to Human Health* (pp. 339-370). American Chemical Society.
- McGinley, J. N., Thompson, M. D., & Thompson, H. J. (2010). A method for serial tissue processing and parallel analysis of aberrant crypt morphology, mucin depletion, and beta-catenin staining in an experimental model of colon carcinogenesis. *Biological procedures online*, 12(1), 118.
- McIntyre, R. E., Buczacki, S. J., Arends, M. J., & Adams, D. J. (2015). Mouse models of colorectal cancer as preclinical models. *Bioessays*, 37(8), 909-920.
- McNabney, S., & Henagan, T. (2017). Short chain fatty acids in the colon and peripheral tissues: a focus on butyrate, colon cancer, obesity and insulin resistance. *Nutrients*, 9(12), 1348.
- Meek, D. W. (2015). Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochemical Journal*, 469(3), 325-346.
- Miyamoto, S., Suzuki, R., Yasui, Y., Kohno, H., Sugie, S., Murakami, A., ... Tanaka, T. (2007). Lack of enhancing effect of lauric acid on the development of aberrant crypt foci in male ICR mice treated with azoxymethane and dextrán sodium sulfate. *Journal of Toxicology Pathology*, 20, 93–100.
- Mokhtari, R. B., Baluch, N., Homayouni, T. S., Morgatskaya, E., Kumar, S., Kazemi, P., & Yeger, H. (2018). The role of Sulforaphane in cancer chemoprevention and health benefits: a mini-review. *Journal of cell communication and signaling*, 12(1), 91-101.
- Morin, P. J., Kinzler, K. W., & Sparks, A. B. (2016). β -Catenin Mutations: Insights into the APC Pathway and the Power of Genetics. *Cancer research*, 76(19), 5587-5589.
- Moyo, B., Masika, P. J., Hugo, A., & Muchenje, V. (2011). Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African Journal of Biotechnology*, 10(60), 12925-12933.

- Müller, M. F., Ibrahim, A. E., & Arends, M. J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv*, 469(2), 125-134.
- Nagarsheth, N., Wicha, M. S., & Zou, W. (2017). Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 17(9), 559.
- Nakanishi, S., Kataoka, K., Kuwahara, T., & Ohnishi, Y. (2003). Effects of high amylose maize starch and *Clostridium butyricum* on metabolism in colonic microbiota and formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Microbiology and immunology*, 47(12), 951-958.
- Nam, T. G. (2011). Lipid peroxidation and its toxicological implications. *Toxicological research*, 27(1), 1.
- Nenadis N., Wang L., Tsimidou M, Zhang H. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS+ assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15): 4669-4674.
- Nguyen, H. T., & Duong, H. Q. (2018). The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncology letters*, 16(1), 9-18.
- Oficjalska, K., Raverdeau, M., Aviello, G., Wade, S. C., Hickey, A., Sheehan, K. M., ...Creagh, E. M. (2015). Protective role for caspase-11 during acute experimental murine colitis. *The Journal of Immunology*, 194(3), 1252–1260
- Oh, E. T., & Park, H. J. (2015). Implications of NQO1 in cancer therapy. *BMB reports*, 48(11), 609.
- Okayasu, I., Yamada, M., Mikami, T., Yoshida, T., Kanno, J., & Ohkusa, T. (2002). Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextrán sulfate sodium-induced colitis model. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 17(10), 1078-1083.
- Okuda, T., & Ali, E. N. (2019). Application of *Moringa oleifera* plant in water treatment. In *Water and wastewater treatment technologies* (pp. 63-79). Springer, Singapore.
- Olson, M. E., & Fahey, J. W. (2011). *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(4), 1071-1082.

- Onwasigwe, E. N., Verghese, M., Reid, H., Holden, C., Smith, L., Willis, S., ... & Walker, L. T. (2019). Chemopreventive Effect of Allspice in Azoxymethane (AOM) Induced Fisher 344 Male Rats. *Food and Nutrition Sciences*, 10(2), 220-234.
- Ortega, A. M. M., & Campos, M. R. S. (2019). Medicinal Plants and Their Bioactive Metabolites in Cancer Prevention and Treatment. In *Bioactive Compounds* (pp. 85-109). Woodhead Publishing.
- Otto, T., & Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93.
- Padmanabhan, S., Waly, M. I., Taranikanti, V., Guizani, N., Rahman, M. S., Ali, A., ... & Deth, R. C. (2018). Modifiable and Non-modifiable Risk Factors for Colon and Rectal Cancer. In *Bioactive Components, Diet and Medical Treatment in Cancer Prevention* (pp. 121-130). Springer, Cham.
- Palmela, C., Peerani, F., Castaneda, D., Torres, J., & Itzkowitz, S. H. (2018). Inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis: a review of the phenotype and associated specific features. *Gut and liver*, 12(1), 17.
- Parang, B., Barrett, C. W., & Williams, C. S. (2016). AOM/DSS model of colitis-associated cancer. In *Gastrointestinal Physiology and Diseases* (pp. 297-307). Humana Press, New York, NY.
- Pari, L., Karamac, M., Kosinska, A., Rybarczyk, A., & A., R. (2007). Antioxidant activity of the crude extracts of drumstick tree [*Moringa oleifera* Lam.] and sweet broomweed [*Scoparia dulcis* L.] leaves. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57(2), 203–208.
- Park, M. H., & Hong, J. T. (2016). Roles of NF- κ B in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. *Cells*, 5(2), 15.
- Park, M. H., Kim, J. H., Chung, Y.-H., & Lee, S. H. (2016). Bakuchiol sensitizes cancer cells to TRAIL through ROS- and JNK-mediated upregulation of death receptors and downregulation of survival proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473(2), 586–592.
- Perše, M., & Cerar, A. (2011). Morphological and Molecular Alterations in 1,2 Dimethylhydrazine and Azoxymethane Induced Colon Carcinogenesis in Rats.

- Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–14.
- Perše, M., & Cerar, A. (2012). Dextrán sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *BioMed Research International*, 2012.
- Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448.
- Phinney BB, Ray AL, Peretti AS, Jerman SJ, Grim C, Pinchuk I V. (2018). MK2 regulates macrophage chemokine activity and recruitment to promote colon tumor growth. *Frontiers in Immunology*, 9:1–12.
- Pierotti, M. A., Frattini, M., Molinari, F., Sozzi, G., & Croce, C. M. (2016). *Oncogenes*. Holland-Frei Cancer Medicine, 1-22.
- Prochaska, H. J., Santamaria, A. B., & Talalay, P. (1992). Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(6), 2394-2398.
- Rajan, T. S., De Nicola, G. R., Iori, R., Rollin, P., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2016). Anticancer activity of glucomoringin isothiocyanate in human malignant astrocytoma cells. *Fitoterapia*, 110, 1-7.
- Ramírez-Jiménez, A. K., Reynoso-Camacho, R., Mendoza-Díaz, S., & Loarca-Piña, G. (2014). Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. *Food Chemistry*, 161, 254–260
- Ramos-Gomez, M., Kwak, M. K., Dolan, P. M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., & Kensler, T. (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), 3410-3415.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Reda, F., Borjac, J., Fakhouri, R., & Usta, J. (2017). Cytotoxic effect of *Moringa oleifera* on colon cancer cell lines. *Acta Horticulturae*, (1158), 269–278.
- Reddy, B. S. (2018). Diet and colon cancer: evidence from human and animal model

- studies. In *Diet, nutrition and cancer: a critical evaluation* (pp. 47-66). CRC Press.
- Rescigno, T., Tecce, M. F., & Capasso, A. (2018). Protective and restorative effects of nutrients and phytochemicals. *The open biochemistry journal*, 12, 46.
- Richard, S. M., & Martinez Marignac, V. L. (2015). Sensitization to oxaliplatin in HCT116 and HT29 cell lines by metformin and ribavirin and differences in response to mitochondrial glutaminase inhibition. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 11(2), 336–340.
- Roager, H. M., & Licht, T. R. (2018). Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nature communications*, 9(1), 1-10.
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition*, 57(1), 1-24.
- Rúa, K. A. P., & Peña, C. M. M. (2012). Bases moleculares del cáncercolorrectal. *Iatreia*, 25(2), 137-148.
- Rungratanawanich, W., Memo, M., & Uberti, D. (2018). Redox homeostasis and natural dietary compounds: Focusing on antioxidants of rice (*oryza sativa* L.). *Nutrients*, 10(11), 1605.
- Rushworth SA, MacEwan DJ. (2011). The role of Nrf2 and cytoprotection in regulating chemotherapy resistance of human leukemia cells. *Cancers*, 3:1605–21. doi:10.3390/cancers3021605.
- Sadahiro, S., Ohmura, T., Saito, T., & Suzuki, S. (1991). Relationship between length and surface area of each segment of the large intestine and the incidence of colorectal cancer. *Cancer*, 68(1), 84–87.
- Saeed, O., Lopez-Beltran, A., Fisher, K. W., Scarpelli, M., Montironi, R., Cimadamore, A., ... & Cheng, L. (2019). RAS genes in colorectal carcinoma: pathogenesis, testing guidelines and treatment implications. *Journal of clinical pathology*, 72(2), 135-139.
- Saini, R. K., Sivanesan, I., & Keum, Y. S. (2016). Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. *3 Biotech*, 6(2), 203.

- Samec, M., Liskova, A., Kubatka, P., Uramova, S., Zubor, P., Samuel, S. M., ... & Kudela, E. (2019). The role of dietary phytochemicals in the carcinogenesis via the modulation of miRNA expression. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 1-15.
- Sánchez-Machado, D. I., Núñez-Gastélum, J. A., Reyes-Moreno, C., Ramírez-Wong, B., & López-Cervantes, J. (2010). Nutritional quality of edible parts of *Moringa oleifera*. *Food Analytical Methods*, 3(3), 175–180.
- Saucedo-Pompa, S., Torres-Castillo, J. A., Castro-López, C., Rojas, R., Sánchez-Alejo, E. J., Ngangyo-Heya, M., & Martínez-Ávila, G. C. G. (2018). Moringa plants: Bioactive compounds and promising applications in food products. *Food research international*, 111, 438-450.
- Saura-Calixto, F. (2010). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(1), 43-49.
- Sefrioui, D., Vermeulin, T., Blanchard, F., Chapusot, C., Beaussire, L., Armengol-Debeir, L., ... & Houivet, E. (2017). Copy number variations in DCC/18q and ERBB2/17q are associated with disease-free survival in microsatellite stable colon cancer. *International journal of cancer*, 140(7), 1653-1661.
- Shen, Z., Zhou, R., Liu, C., Wang, Y., Zhan, W., Shao, Z., ... Zhao, L. (2017). MicroRNA-105 is involved in TNF- α -related tumor microenvironment enhanced colorectal cancer progression article. *Cell Death and Disease*, 8(12).
- Shi, N., Clinton, S. K., Liu, Z., Wang, Y., Riedl, K. M., Schwartz, S. J., ... Chen, T. (2015). Strawberry phytochemicals inhibit azoxymethane/dextrán sodium sulfate-induced colorectal carcinogenesis in Crj: CD-1 mice. *Nutrients*, 7(3), 1696–1715.
- Shiga, M., Lajolo, M., Filisetti, M. (2003). Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Ciencia y Tecnología Alimentos. Caminas* 23:141-148.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(1), 7-34.
- Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular*

- Cell Biology*, 1.
- Smith, N. R., Jensen, B. W., Zimmermann, E., Gamborg, M., Sørensen, T. I., & Baker, J. L. (2016). Associations between birth weight and colon and rectal cancer risk in adulthood. *Cancer epidemiology*, 42, 181-185.
- Soundararajan, P., & Kim, J. S. (2018). Anti-carcinogenic glucosinolates in cruciferous vegetables and their antagonistic effects on prevention of cancers. *Molecules*, 23(11), 2983.
- Sreelatha, S., & Padma, P. R. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 303–311
- Sreelatha, S., Jeyachitra, A., & Padma, P. R. (2011). Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1270-1275.
- Steinberg, P. (2019). Red Meat-Derived Nitroso Compounds, Lipid Peroxidation Products and Colorectal Cancer. *Foods*, 8(7), 252.
- stem cells. *Cancers*, 8(3), 1–11
- Sun, W., Wu, X., Gao, H., Yu, J., Zhao, W., Lu, J.-J., ... Chen, X. (2017). Cytosolic calcium mediates RIP1/RIP3 complex-dependent necroptosis through JNK activation and mitochondrial ROS production in human colon cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 108, 433–444.
- 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 dextrán sodium sulfate. *Cancer Science*, 94(11), 965–973.
- Tariq, K., & Ghias, K. (2016). Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer biology & medicine*, 13(1), 120.
- Teixeira, E. M. B., Carvalho, M. R. B., Neves, V. A., Silva, M. A., & Arantes-Pereira, L. (2014). Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Food chemistry*, 147, 51-54.
- Thejass, P., & Kuttan, G. (2007). Allyl isothiocyanate (AITC) and phenyl isothiocyanate (PITC) inhibit tumour-specific angiogenesis by downregulating

- nitric oxide (NO) and tumour necrosis factor- α (TNF- α) production. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 16(2), 247–257.
- Tilg, H., Adolph, T. E., Gerner, R. R., & Moschen, A. R. (2018). The intestinal microbiota in colorectal cancer. *Cancer cell*, 33(6), 954-964.
- Tiloke, C., Phulukdaree, A., & Chuturgoon, A. A. (2013). The antiproliferative effect of *Moringa oleifera* crude aqueous leaf extract on cancerous human alveolar epithelial cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 226.
- Tragulpakseerojn, J., Yamaguchi, N., Pamonsinlapatham, P., Wetwitayaklung, P., Yoneyama, T., Ishikawa, N., & Apirakaramwong, A. (2017). Anti-proliferative effect of *Moringa oleifera* Lam (*Moringaceae*) leaf extract on human colon cancer HCT116 cell line. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(February), 371–378.
- Vainer, N., Dehlendorff, C., & Johansen, J. S. (2018). Systematic literature review of IL-6 as a biomarker or treatment target in patients with gastric, bile duct, pancreatic and colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(51), 29820.
- Valdez-Solana, M. A., Mejía-García, V. Y., Téllez-Valencia, A., García-Arenas, G., Salas-Pacheco, J., Alba-Romero, J. J., & Sierra-Campos, E. (2015). Nutritional content and elemental and phytochemical analyses of *Moringa oleifera* grown in Mexico. *Journal of Chemistry*, 2015.
- Vargas-Rondón, N., Villegas, V. E., & Rondón-Lagos, M. (2018). The role of chromosomal instability in cancer and therapeutic responses. *Cancers*, 10(1), 4.
- Vergara-Castañeda, H. A., Guevara-González, R. G., Ramos-Gómez, M., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Maldonado, H., Feregrino-Pérez, A. A., ... & Loarca-Piña, G. (2010). Non-digestible fraction of cooked bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Bayo Madero suppresses colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-induced rats. *Food & function*, 1(3), 294-300.
- Verma, A. R., Vijayakumar, M., Mathela, C. S., & Rao, C. V. (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2196-2201.
- Verma, A., & Shukla, G. (2013). Administration of prebiotic inulin suppresses 1, 2

- dimethylhydrazine dihydrochloride induced procarcinogenic biomarkers fecal enzymes and preneoplastic lesions in early colon carcinogenesis in Sprague Dawley rats. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 991-996.
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44, 566-571.
- Waly, M. I., Al-Rawahi, A. S., Al Riyami, M., Al-Kindi, M. A., Al-Issaei, H. K., Farooq, S. A., ... & Rahman, M. S. (2014). Amelioration of azoxymethane induced-carcinogenesis by reducing oxidative stress in rat colon by natural extracts. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 60.
- Wang, D., DuBois, R. N., & Richmond, A. (2009). The role of chemokines in intestinal inflammation and cancer. *Current opinion in pharmacology*, 9(6), 688-696.
- Wang, L., Walia, B., Evans, J., Gewirtz, A.T., Merlin, D., Sitaraman, S. V., (2003). IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia. *J. Immunol.* 171, 3194–201.
- Wang, Y., Wang, K., Han, G. C., Wang, R. X., Xiao, H., Hou, C. M., ... & Chen, G. J. (2014). Neutrophil infiltration favors colitis-associated tumorigenesis by activating the interleukin-1 (IL-1)/IL-6 axis. *Mucosal immunology*, 7(5), 1106.
- Wargovich, M. J., Brown, V. R., & Morris, J. (2010). Aberrant crypt foci: the case for inclusion as a biomarker for colon cancer. *Cancers*, 2(3), 1705-1716.
- West, N. R., McCuaig, S., Franchini, F., & Powrie, F. (2015). Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nature Reviews Immunology*, 15(10), 615.
- Yamagishi, H., Kuroda, H., Imai, Y., & Hiraishi, H. (2016). Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chinese journal of cancer*, 35(1), 1-8.
- Yang, V. W. (2018). The Cell Cycle. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 197–219.
- Yang, Y., Bazhin, A. V., Werner, J., & Karakhanova, S. (2013). Reactive Oxygen Species in the Immune System. *International Reviews of Immunology*, 32(3), 249–270.

- Yang, Y., Cheng, J.-Z., Singhal, S. S., Saini, M., Pandya, U., Awasthi, S., & Awasthi, Y. C. (2001). Role of Glutathione S-Transferases in Protection against Lipid Peroxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 19220–19230.
- Yassa, H. D., & Tohamy, A. F. (2014). Extract of *Moringa oleifera* leaves ameliorates streptozotocin-induced Diabetes mellitus in adult rats. *Acta histochemica*, 116(5), 844-854.
- Zhang, L. (2011). Voluntary oral administration of drugs in mice. *Protocol Exchange*, 1-11.
- Zhang, L., & Shay, J. W. (2017). Multiple roles of APC and its therapeutic implications in colorectal cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 109(8).
- Zhang, X., Hu, F., Li, G., Li, G., Yang, X., Liu, L., ... & Feng, Y. (2018). Human colorectal cancer-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through IL-6/JAK2/STAT3 signaling. *Cell death & disease*, 9(2), 25.
- Zhao, G., Nyman, M., & Åke Jönsson, J. (2006). Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomedical Chromatography*, 20(8), 674-682.
- Zhao, M., Mishra, L., & Deng, C. X. (2018a). The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *International journal of biological sciences*, 14(2), 111.
- Zhao, P., & Zhang, Z. (2018). TNF- α promotes colon cancer cell migration and invasion by upregulating TROP-2. *Oncology letters*, 15(3), 3820-3827.
- Zhao, Y., Hu, X., Zuo, X., & Wang, M. (2018b). Chemopreventive effects of some popular phytochemicals on human colon cancer: A review. *Food & function*, 9(9), 4548-4568.
- Zhu, Q., Gao, R., Wu, W., & Qin, H. (2013). The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. *Tumor Biology*, 34(3), 1285–1300.

ANEXOS

ANEXO 1

Manejo y manipulación de animales

Los animales se alojaron en jaulas de acero inoxidable con las siguientes dimensiones: 32 cm x 23 cm x 22 cm (largo*ancho*altura). La NOM-062-ZOO-1999 (apartado 5.1.1) considera que ratones entre 15-25 gramos deben tener un área de alojamiento 78 cm² por ratón y la jaula debe tener una altura mínima de 12 cm. Por lo tanto, para la etapa 1 del trabajo se alojaron 6 ratones por jaula y para la etapa 2 se alojaron 4 animales por jaula. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad (50 ± 10 %), con ciclos día/noche de 12/12 h, así como temperatura adecuada (23 ± 2 °C) y ventilación constante. Se realizaron lavados con hipoclorito de cada canastilla cada tercer día, así como de todo el material que estuvo en contacto con los animales. De igual manera para la manipulación de los animales durante el trabajo experimental, se siguió las especificaciones de la NOM-062-200-199 en su apartado 10.4 que indica que se debe usar guantes, cubre bocas y bata mientras se esté en contacto con los animales.

Monitoreo de conducta

Durante todo el experimento, se llevó a cabo el monitoreo de conducta de los animales. Se realizaron mediciones semanales de consumo de agua, alimento y peso corporal. Para el registro del peso corporal, se sujetó la cola del animal entre el pulgar y el dedo índice y se levantó para depositarla en el canasto para roedores de la balanza. Si el animal perdía más de un 20% de su peso se consideró el criterio de retiro del experimento. Se realizaron movimientos lentos para evitar el estrés y lastimar al animal. También se realizó el monitoreo del número de veces de defecación y la evaluación de presencia/ausencia de sangre en heces.

Condiciones de sacrificio

Administración de anestesia: Al finalizar el experimento, los animales fueron anestesiados con cámara de dióxido de carbono, el cual tiene la propiedad de ser anestésico, ya que disminuye la tensión de oxígeno que conduce a la somnolencia en pocos minutos (método descrito por la norma NOM-062-ZOO-1999, punto 9.4.1.3.3). Cuando el animal estuvo perfectamente anestesiado, se realizó una toma de muestra de sangre del corazón por punción. Una vez que se tomó la muestra de sangre del corazón por punción cardiaca, se realizó un corte de la vena porta para asegurar la muerte clínica con tijeras quirúrgicas esterilizadas (en acuerdo a la norma NOM-062-ZOO-1999, punto 9).

Recolección de muestras biológicas

Posteriormente se realizó una incisión con bisturí esterilizado desde el tórax hasta el ano separando la piel y el músculo para tener acceso a las vísceras abdominales. Se extrajo intestino delgado, colon, hígado y riñones, los cuales, posteriormente se lavaron con solución fisiológica. Parte de las muestras obtenidas se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C para estudios moleculares y otra parte fue fijada con formaldehído al 4% en solución amortiguadora de sales (PBS) para los estudios histopatológicos.

Desecho de animales y material quirúrgico

Los desechos se almacenaron en bolsas color amarillo (cadáveres) o rojo (residuos peligrosos), cuidando de no rebasar el 80% de su capacidad en un congelador (temperatura máxima 4 °C), las bolsas se rotularon con la leyenda “desechos patológicos” y almacenadas en un periodo máximo de 15 días hasta su debido transporte e incineración, los cuales estuvieron a cargo de la empresa Planta Incineradora de Residuos Bio-Infecciosos S.A. de C.V. procedimiento establecido en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

C.U., Querétaro, 23 de septiembre de 2016
No. de oficio. CBQ16/0921-1

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca
Facultad de Química
Presente

AT'N: M. en C. Liceth Cuéllar Núñez

Nos permitimos hacer de su conocimiento que, en reunión del Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro celebrada el 21 de septiembre del año 2016, con objeto de llevar a cabo la revisión de propuesta de investigación, el protocolo titulado "**Evaluación del efecto quimioprotector de hojas de moringa (*Moringa oleifera* L) en un modelo *in vivo* de cáncer de colon**" del cual usted es responsable fue evaluado, por lo cual se da la resolución de: **aprobado**.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

Dra. Laura Cristina Berumen
Presidente

Dr. Moustapha Bah
Investigador



NOV. 22, 2016

Hora: 13:33h

Centro Universitario, Cerro de las Campanas, Santiago de Querétaro, Qro., México. C.P. 76010
Tel. 01 4421 192 12 67 Fax 192 13 02

ANEXO 2

Cuadro 10. Listado de genes evaluados mediante el arreglo de PCR “Mouse Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT² Profiler PCR” formato H

Posit ion	Unigene	Refseq	Symbol	Description	Gname	RT2 Catalog
A01	Mm.6522	NM_007722	Ackr3	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7	AW541270/CXC-R7/CXCR-7/Cmkor1/Cxcr7/RDC-1/Rdc1	PPM03179A
A02	Mm.391503	NM_009645	Aicda	Activation-induced cytidine deaminase	Aid/Arp2	PPM27965B
A03	Mm.257460	NM_009741	Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	AW986256/Bcl-2/C430015F12Rik/D630044D05Rik/D830018M01Rik	PPM02918F
A04	Mm.238213	NM_009743	Bcl2l1	Bcl2-like 1	Bcl(X)L/Bcl-XL/Bcl2l/BclX/bcl-x/bcl2-L-1	PPM02920F
A05	Mm.290320	NM_011333	Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	AI323594/HC11/JE/MCAF/MCP-1/MCP1/SMC-CF/Scya2/Sigje	PPM03151G
A06	Mm.116739	NM_016960	Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	CKb4/LARC/MIP-3A/MIP-3[a]/MIP3A/ST38/Scya20/exodus-1	PPM03142B
A07	Mm.12895	NM_009137	Ccl22	Chemokine (C-C motif) ligand 22	ABCD-1/DCBCK/MDC/Scya22	PPM02950B
A08	Mm.143745	NM_020279	Ccl28	Chemokine (C-C motif) ligand 28	CCK1/MEC/Scya28	PPM03603C
A09	Mm.244263	NM_013652	Ccl4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	AT744.1/Act-2/MIP-1B/Mip1b/Scya4	PPM02948F
A10	Mm.284248	NM_013653	Ccl5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	MuRantes/RANTES/SlSd/Scya5/TCP228	PPM02960F
A11	Mm.274927	NM_009912	Ccr1	Chemokine (C-C motif) receptor 1	Cmkbr1/Mip-1a-R	PPM03174A
A12	Mm.8021	NM_007721	Ccr10	Chemokine (C-C motif) receptor 10	Cmkbr9/Gpr2	PPM03166A
B01	Mm.6272	NM_009915	Ccr2	Chemokine (C-C motif) receptor 2	Cc-ckr-2/Ccr2a/Ccr2b/Ckr2/Ckr2a/Ckr2b/Cmkbr2/mJe-r	PPM03176A
B02	Mm.1337	NM_009916	Ccr4	Chemokine (C-C motif) receptor 4	C-C CKR-4/CHEMR1/Cmkbr4/LESTR/Sdf1r	PPM03147A
B03	Mm.14302	NM_009917	Ccr5	Chemokine (C-C motif) receptor 5	AM4-7/CD195/Cmkbr5	PPM03150B
B04	Mm.2932	NM_007719	Ccr7	Chemokine (C-C motif) receptor 7	CC-CKR-7/CCR-7/CD197/Cdw197/Cmkbr7/EB1/Ebi1h	PPM03156G
B05	Mm.440604	NM_009913	Ccr9	Chemokine (C-C motif) receptor 9	A130091K22Rik/Cmkbr10/GPR-9-6	PPM03167A
B06	Mm.245363	NM_021893	Cd274	CD274 antigen	A530045L16Rik/B7h1/Pdcd111/Pdcd1lg1/Pdl1	PPM34637A
B07	Mm.795	NM_007778	Csf1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	C87615/Csfm/MCSF/op	PPM03116C
B08	Mm.4922	NM_009969	Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	Csfgm/GMCSF/Gm-CSf/MGI-IGM	PPM02990F
B09	Mm.1238	NM_009971	Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	Csfg/G-CSF/MGI-IG	PPM02989B
B10	Mm.390	NM_009843	Ctla4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	Cd152/Ctla-4/Ly-56	PPM03217E
B11	Mm.21013	NM_008176	Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Fsp/Gro1/KC/Mgsa/N51/Scyb1/gro	PPM03058C
B12	Mm.877	NM_021274	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	C7/CRG-2/INP10/IP-10/IP10/Ifi10/Scyb10/gIP-10/mob-1	PPM02978E
C01	Mm.131723	NM_019494	Cxcl11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	Cxc11/H174/Itac/Ip9/Itac/Scyb11/Scyb9b/b-R1/betaR1	PPM03192C

C02	Mm.3032 31	NM_0217 04	Cxcl12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	Pbsf/Scyb12/Sdf1/Tlsf/Tpar1	PPM029 65E
C03	Mm.4979	NM_0091 40	Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CINC-2a/GROb/Gro2/MIP-2/MIP- 2a/Mgsa-b/Mip2/Scyb/Scyb2	PPM029 69F
C04	Mm.4660	NM_0091 41	Cxcl5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	AMCF-II/ENA-78/GCP- 2/LIX/Scyb5/Scyb6	PPM029 66F
C05	Mm.766	NM_0085 99	Cxcl9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	BB139920/CMK/Mig/MuMIG/Scyb 9/crg-10	PPM029 73B
C06	Mm.3370 35	NM_1782 41	Cxcr1	Chemokine (C-X-C motif) receptor 1	Il8ra	PPM053 08E
C07	Mm.2344 66	NM_0099 09	Cxcr2	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2	CD128/CDw128/Cmkar2/Gpcr16/l L-8Rh/IL-8rb/IL8RA/Il8rb/mL-8RH	PPM030 29A
C08	Mm.1287 6	NM_0099 10	Cxcr3	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3	Cd183/Cmkar3	PPM031 45F
C09	Mm.1401	NM_0099 11	Cxcr4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	CD184/Cmkar4/LESTR/PB- CKR/PBSF/SDF- 1/Sdf1/b2b220Clo	PPM031 49E
C10	Mm.6246	NM_0075 51	Cxcr5	Chemokine (C-X-C motif) receptor 5	Blr1/CXC-R5/CXCR- 5/Gpcr6/MDR15	PPM037 56A
C11	Mm.2524 81	NM_0101 13	Egf	Epidermal growth factor	A1790464	PPM037 03C
C12	Mm.4398 82	NM_0079 12	Egfr	Epidermal growth factor receptor	9030024J15Rik/AI552599/ErbB/Er rb1/Erp/Wa5/wa-2/wa2	PPM037 14F
D01	Mm.3355	NM_0101 77	FasL	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	APT1LG1/CD178/CD95- L/CD95L/Fas-L/Faslg/Tnfsf6/gld	PPM029 26E
D02	Mm.1822 91	NM_0540 39	Foxp3	Forkhead box P3	JM2/scurfin/sf	PPM054 97F
D03	Mm.4579 78	NM_0102 59	Gbp2b	Guanylate binding protein 1	Gbp-1/Gbp1/Mag-1/Mpa-1/Mpa1	PPM054 93B
D04	Mm.1551 0	NM_0103 70	Gzma	Granzyme A	AW494114/Ctla- 3/Ctla3/Hf/SE1/TSP-1/TSP1	PPM258 19F
D05	Mm.1487 4	NM_0135 42	Gzmb	Granzyme B	AI553453/CCP-1/C11/CCP1/Ctla- 1/Ctla1/GZB	PPM053 03F
D06	Mm.4396 75	NM_0103 80	H2-D1	Histocompatibility 2, D region locus 1	H-2D/H2-D	PPM280 44F
D07	Mm.4668 82	NM_0010 01892	H2-K1	Histocompatibility 2, K1, K region	H-2K/H-2K(d)/H2-K/K-f	PPM258 49D
D08	Mm.3879	NM_0013 13919	Hif1a	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	AA959795/HIF-1-alpha/HIF 1- alpha/HIF1alpha/MOP1/bHLHe78	PPM037 99C
D09	Mm.392	NM_0083 24	Ido1	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1	Ido/Indo	PPM053 63A
D10	Mm.2403 27	NM_0083 37	Igng	Interferon gamma	IFN-g/Igng	PPM031 21A
D11	Mm.2685 21	NM_0105 12	Igf1	Insulin-like growth factor 1	C730016P09Rik/Igf-1/Igf-1	PPM033 87F
D12	Mm.874	NM_0105 48	Il10	Interleukin 10	CSIF/Il-10	PPM030 17C
E01	Mm.1037 83	NM_0083 51	Il12a	Interleukin 12A	IL-12p35/Il-12a/L112a/p35	PPM030 19A
E02	Mm.2397 07	NM_0013 03244	Il12b	Interleukin 12b	Il-12b/Il-12p40/Il12p40/p40	PPM030 20E
E03	Mm.1284	NM_0083 55	Il13	Interleukin 13	Il-13	PPM030 21B
E04	Mm.4392	NM_0083 57	Il15	Interleukin 15	AI503618/IL-15	PPM030 22C
E05	Mm.5419	NM_0105 52	Il17a	Interleukin 17A	Ctla-8/Ctla8/IL-17/IL-17A/Il17	PPM030 23A
E06	Mm.1553 4	NM_0105 54	Il1a	Interleukin 1 alpha	Il-1a	PPM030 10F
E07	Mm.2228 30	NM_0083 61	Il1b	Interleukin 1 beta	IL-1beta/Il-1b	PPM031 09F
E08	Mm.896	NM_0083 62	Il1r1	Interleukin 1 receptor, type I	CD121a/CD121b/IL-1R1/IL-iR/Il1r- 1	PPM030 11C
E09	Mm.1419 0	NM_0083 66	Il2	Interleukin 2	Il-2	PPM029 37C
E10	Mm.1035 85	NM_0169 71	Il22	Interleukin 22	IL-22/IL-22a/ILTIFa/Itif	PPM054 81A
E11	Mm.1254 82	NM_0312 52	Il23a	Interleukin 23, alpha subunit p19	IL-23/p19	PPM037 63F

E12	Mm.2763 60	NM_0212 83	Il4	Interleukin 4	BSF-1/Il-4	PPM030 13F
F01	Mm.4461	NM_0105 58	Il5	Interleukin 5	Il-5	PPM030 14F
F02	Mm.1019	NM_0013 14054	Il6	Interleukin 6	Il-6	PPM030 15A
F03	Mm.1052 18	NM_0083 90	Irf1	Interferon regulatory factor 1	AU020929/Irf-1	PPM032 03D
F04	Mm.4512 4	NM_0135 98	Kitl	Kit ligand	Clo/Con/Gb/Kitlg/Mgf/SCF/SF/SLF /Sl/blz/contrasted	PPM029 83C
F05	Mm.2326	NM_0107 98	Mif	Macrophage migration inhibitory factor	GIF/Glif	PPM029 85H
F06	Mm.2444	NM_0108 49	Myc	Myelocytomatosis oncogene	AU016757/Myc2/Niard/Nird/bHLH e39	PPM029 24F
F07	Mm.2130 03	NM_0108 51	Myd88	Myeloid differentiation primary response gene 88	-	PPM033 99A
F08	Mm.2567 65	NM_0086 89	Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105	NF-KB1/NF-kappaB/NF- kappaB1/p105/p50/p50/p105	PPM029 30F
F09	Mm.2893	NM_0013 13921	Nos2	Nitric oxide synthase 2, inducible	MAC-NOS/NOS-II/Nos-2/Nos2a/i- NOS/iNOS	PPM029 28B
F10	Mm.5024	NM_0087 98	Pdcd1	Programmed cell death 1	Ly101/PD-1/Pdc1	PPM252 29A
F11	Mm.2925 47	NM_0111 98	Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	COX2/Cox-2/PES-2/PGHS-2/PHS II/PHS-2/Pghs2/TIS10/gripghs	PPM036 47E
F12	Mm.2884 74	NM_0092 63	Spp1	Secreted phosphoprotein 1	2AR/Apl-1/BNSP/BSPI/Bsp/ETA- 1/Eta/OP/Opn/Opnl/Ric/Spp-1	PPM036 48C
G01	Mm.2774 06	NM_0092 83	Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1	2010005J02Rik/AA408197	PPM040 25F
G02	Mm.4731 90	NM_0114 86	Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3	1110034C02Rik/AW109958/Aprf	PPM046 43F
G03	Mm.2483 80	NM_0115 77	Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	TGF-beta1/TGFbeta1/Tgfb/Tgfb-1	PPM029 91B
G04	Mm.8759 6	NM_0119 05	Tlr2	Toll-like receptor 2	Ly105	PPM042 20B
G05	Mm.3387 4	NM_1261 66	Tlr3	Toll-like receptor 3	AI957183	PPM042 16B
G06	Mm.3804 9	NM_0212 97	Tlr4	Toll-like receptor 4	Lps/Ly87/Ran/M1/Ras12-8	PPM042 07F
G07	Mm.2397 9	NM_1332 11	Tlr7	Toll-like receptor 7	-	PPM042 08A
G08	Mm.4488 9	NM_0311 78	Tlr9	Toll-like receptor 9	-	PPM042 21A
G09	Mm.1293	NM_0136 93	Tnf	Tumor necrosis factor	DIF/TNF-a/TNF- alpha/TNFSF2/TNFalpha/Tnfa/Tnf sf1a	PPM031 13G
G10	Mm.1062	NM_0094 25	Tnfsf10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	A330042121Rik/AI448571/APO- 2L/Ly81/TL2/Trail	PPM029 25B
G11	Mm.222	NM_0116 40	Trp53	Transformation related protein 53	Tp53/bbl/bfy/bhy/p44/p53	PPM029 31C
G12	Mm.2821 84	NM_0095 05	Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	Vegf/Vpf	PPM030 41F
H01	Mm.3284 31	NM_0073 93	Actb	Actin, beta	Actx/E430023M04Rik/beta-actin	PPM029 45B
H02	Mm.163	NM_0097 35	B2m	Beta-2 microglobulin	Ly-m11/beta2-m/beta2m	PPM035 62A
H03	Mm.3090 92	NM_0080 84	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapd	PPM029 46E
H04	Mm.3317	NM_0103 68	Gusb	Glucuronidase, beta	AI747421/Gur/Gus/Gus-r/Gus- s/Gus-t/Gus-u/Gut/asd/g	PPM054 90C
H05	Mm.2180	NM_0083 02	Hsp90ab 1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	90kDa/AL022974/C81438/Hsp84/ Hsp84-1/Hsp90/Hspcb	PPM048 03F
H06	N/A	SA_0010 6	MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination	MIGX1B	
H07	N/A	SA_0010 4	RTC	Reverse Transcription Control	RTC	PPX633 40A
H08	N/A	SA_0010 4	RTC	Reverse Transcription Control	RTC	PPX633 40A
H09	N/A	SA_0010 4	RTC	Reverse Transcription Control	RTC	PPX633 40A

H10	N/A	SA_0010 3	PPC	Positive PCR Control	PPC	
H11	N/A	SA_0010 3	PPC	Positive PCR Control	PPC	
H12	N/A	SA_0010 3	PPC	Positive PCR Control	PPC	

Dirección General de Bibliotecas UAQ