



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**EFFECTO DE LA LUTEÍNA SOBRE LOS GENES K-ras Y β -catenina
DURANTE LA QUIMIOPROTECCIÓN DEL CÁNCER DE COLON
EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:

Q. en A. Brisia Villalón Corona

Dirigido por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

SINODALES

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Presidente

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Secretario

Dr. Luis Miguel Salgado Rodríguez
Vocal

Dra. Eva González Jasso
Suplente

Dr. José Luis Blasco Cabal
Suplente

M. en C. Gustavo Pedraza Aboytes
Director de la Facultad de Química

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Sergio Quesada Aldana
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro.
Abril, 2004
México

Nº Adq. H69165

No. Título _____

Clas. 15

619.93

v714e

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio de
Bioquímica Molecular del Departamento de
Investigación y Posgrado de Alimentos de la
Universidad Autónoma de Querétaro bajo la
dirección de la Dra. Rosalía Reynoso Camacho**

RESUMEN

El cáncer es la segunda causa de muerte en nuestro país y la incidencia y mortalidad por cáncer colon rectal se han incrementado en los últimos años. Durante el desarrollo de esta patología se originan trastornos de los mecanismos que controlan la proliferación y diferenciación celular en los que se encuentran implicadas las mutaciones de dos clases de genes: genes supresores de tumores (*p53*, *DCC* y *APC*) y protooncogenes (*K-ras*, *myc* y *β-catenina*).

Por otro lado se sabe que los carotenoides, que son abundantes en alimentos de origen vegetal, tienen la capacidad de ser antimutagénicos y anticarcinogénicos. Sin embargo poco se conoce acerca del potencial de algunos de éstos; como la luteína, para inhibir el cáncer de colon. Estudios epidemiológicos han demostrado que la ingesta alta de alimentos ricos en luteína disminuye el riesgo de padecer este tipo de cáncer, sin embargo, no se sabe en qué etapa del desarrollo del cáncer puede tener un efecto dicho caroteno ni su influencia sobre los genes involucrados en este proceso.

En este estudio se evaluó la capacidad quimioprotectora de la luteína a nivel histológico y molecular sobre el cáncer de colon de ratas. Para lograr tal objetivo el proyecto se dividió en dos etapas. En la primera se estableció el modelo de carcinogénesis en ratas Sprague-Dawley tratadas con 1,2-dimetilhidrazina (1,2-DMH) durante 2 meses y se sacrificaron a diferentes tiempos: 16, 20 y 30 semanas después de iniciado el tratamiento. El tejido se estudió a nivel histológico y se analizaron las mutaciones sobre los genes *K-ras* y *β-catenina* mediante la técnica de polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP). El número de tumores fue mayor a partir de la semana 20 en la cual el 73% de las ratas presentaron tumores y el 80 % de ellos se encontraron distribuidos en la zona medio-distal del colon. Así mismo, el número de tumores por rata fue mayor en los dos últimos tiempos, lo cual correlaciona con el grado de displasia más severa obtenido en los estudios histopatológicos. En el análisis molecular se obtuvo un producto de PCR de 211 pb para *β-catenina* y de 175 pb para *K-ras*, que mediante SSCP fue posible identificar bandas diferentes a las presentadas por los animales control, lo cual nos indica la presencia de posibles mutaciones en estos fragmentos amplificados.

En la siguiente fase del proyecto se evaluó la quimioprotección de la luteína y la influencia que ésta tiene sobre los genes mencionados. La luteína disminuyó hasta en un 50 % el número de tumores en los grupos donde se adicionó el carotenoide antes y después del tratamiento con la 1,2-DMH, dicha acción no fue observada en el grupo en donde el quimioprotector y el carcinógeno se dieron al mismo tiempo.

Se analizaron mediante SSCP los tumores del grupo al cual se le adicionó luteína a la dieta después del tratamiento con 1,2-DMH. Para *K-ras* y *β-catenina* se observó una diferencia en el patrón de bandeo en comparación con las muestras de tumores provenientes del grupo control positivo, por lo que se cree que la luteína pudiera inducir cambios estructurales en estos genes durante el desarrollo de carcinogénesis.

Palabras Clave: Cáncer de colon, quimioprotección, luteína, *K-ras*, *β-catenina*

SUMMARY

Cancer is the second cause of death in Mexico, in the last years its incidence and mortality has increased due to colon rectal cancer. During the development of this pathology exists alterations on the mechanisms that control the cellular proliferation and differentiation. There are two gene mutations involved: tumor suppressor genes (*p53*, *DCC* and *APC*) and protooncogenes (*K-ras*, *myc* and *β-catenin*).

On the other hand, it is known that carotenoids, which are abundant in vegetables, have the capability of being antimutagenic and anticarcinogenic, nevertheless, a little is known about the potential of some of these agents like lutein to inhibit colon cancer.

Epidemiologic research has shown that high consumption of lutein-rich food decreases the risk of contracting this type of cancer, however, it is not known in which stage of cancer development such carotene may have effect and influence over the genes involved in this process.

In this study the chemoprotective potential of lutein at histological and molecular level (*β-catenin* and *K-ras*) over colon cancer on rats was evaluated. To achieve this objective, the project was divided in two stages. In the first one, the carcinogenesis model in rats Sprague Dawley treated with 1,2-dimethylhydrazine (1,2-DMH) for 2 months was established and were sacrificed at different times: 16, 20 and 30 weeks after treatment initiation. Tissue was analyzed at histological and molecular level. The number of tumors was higher after week 20 in which 60% of the rats exhibited tumors and 80% of them were found distributed in the medial-distal zone of the colon. This way, the number of tumors per rat was higher in the last two times, which is correlated with the more severe grade of displasia. In the molecular analysis, a PCR product of 211 bp for *β-catenin* and 175 bp for *K-ras* was obtained, which using the Single Strand Conformation Poliformism technique (SSCP), it was possible to identify different bands to those presented by the in-control animals. This indicates the presence of possible mutations on these amplified fragments.

On the next stage of the project, it was evaluated the chemoprotective stage of lutein and the influence that it has over the genes previously mentioned. Lutein decreased up to 50% the number of tumors in the groups where the carotenoid was added before and after the treatment with 1,2-DMH. Such action was not observed in the groups where chemiprotector and carcinogenic were given at the same time.

On the second stage of the project, the tumors of the group in which lutein was included in the diet after the treatment with 1,2-DMH were analyzed. For the *β-catenin* and *K-ras* lutein treatment had a significant effect on the band pattern compared with the DMH-treated rats, therefore, it is believed that lutein influences the structural changes of these genes during the development of carcinogenesis.

Keywords: Colon cancer, chemoprotection, lutein, *β-catenin* and *K-ras*

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo ha sido un logro gracias a las siguientes personas e instituciones.

Dra. Rosalía Reynoso, por su gran empeño en crear un espacio dedicado a la investigación y enseñanza. Por depositar su confianza en mí para el desarrollo de este trabajo.

Dr. Luis Miguel Salgado, por compartir sus conocimientos y sus valiosas observaciones durante la realización de esta investigación.

Dra. Eva González, por sus consejos, su enseñanza y amistad.

Dra. Loarca, por siempre recibirme cordialmente en su laboratorio cuando fue necesario y por su siempre disponibilidad a ayudar.

Dr. José Luis Blasco, por su orientación en el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Minerva Ramos por su tiempo y sus atinados comentarios.

Al Dr. Gallegos por su invaluable colaboración.

A mis amigos: Victor, Moni, Lourdes, Paola, Xóchitl, quienes siempre me apoyaron. A mis compañeros del laboratorio, en especial a Adriana, Monse, Ari, Karla, Claudia, Diane, Bere y Rosalba, por su incomparable compañía y ayuda.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por impulsar el desarrollo de nuevas investigaciones.

A Dios por siempre
ofrecerme un nuevo día.

A mi familia por apoyarme
en cada paso, especialmente
a mis padres por su amor y
comprensión.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Cáncer	3
2.1.1 Definición	3
2.1.2 Causas	5
2.1.3 El proceso de carcinogénesis	5
2.1.4 Bases moleculares del cáncer	6
2.2 Cáncer colon-rectal	10
2.2.1 Genes y proteínas <i>ras</i>	14
2.2.2 β -catenina	16
2.2.3 Modelos animales en el estudio de la carcinogénesis colon-rectal	18
2.3 Quimioprotección y cáncer	21
2.3.1 La luteína y su potencial quimioprotector	25
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo general	30
4.2 Objetivos específicos	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 Material biológico	31
5.2 Compuestos químicos	31

5.3 Modelo de carcinogénesis	32
5.4 Evaluación de la luteína como agente quimio protector	32
5.5 Sacrificio y toma de muestras de colon	35
5.6 Extracción y cuantificación de DNA	37
5.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38
5.8 Análisis del polimorfismo de cadena sencilla (SSCP)	38
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
7.1 Inducción de tumores en el colon de ratas Sprague-Dawley	41
7.2 Distribución de los tumores y características histológicas de las zonas del colon	46
7.3 Detección de mutaciones en el proceso de carcinogénesis mediante SSCP	52
7.4 Evaluación de la quimio protección de la luteína	61
7.5 Efecto de la luteína sobre el patrón de bandeo de los genes <i>K-ras</i> y <i>β-catenina</i>	66
8. CONCLUSIONES	71
9. BIBLIOGRAFÍA	72
10. APÉNDICES	86

ÍNDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Principales diferencias entre células normales y cancerosas	4
Cuadro 2	Mecanismos de activación de algunos oncogenes y los tumores humanos a los cuales se les ha asociado	8
Cuadro 3	Genes supresores de tumores involucrados en las neoplasias humanas	9
Cuadro 4	Genes que presentan mutaciones en las células de cáncer colon-rectal	12
Cuadro 5	Clasificación de los grupos experimentales durante el tratamiento quimioprotector con luteína: 2ª etapa	34
Cuadro 6	Condiciones para la amplificación de los fragmentos de los genes <i>K-ras</i> y <i>β-catenina</i> utilizando la técnica de PCR	39
Cuadro 7	Incidencia y número total de tumores desarrollados en el colon de ratas tratadas con 1,2-DMH y sacrificadas a diferentes tiempos	45
Cuadro 8	Grado de displasia presentado en el epitelio en las tres regiones del colon de las ratas tratadas con 1,2-DMH en los diferentes tiempos de sacrificio	48
Cuadro 9	Frecuencia de los cambios en el patrón de bandeo de los genes <i>K-ras</i> y <i>β-catenina</i> según el análisis SSCP	56
Cuadro 10	Efecto de la luteína sobre el número de tumores en el colon de ratas tratadas con 1,2-DMH	63
Cuadro 11	Frecuencia de los cambios en el patrón de bandeo en los genes <i>K-ras</i> y <i>β-catenina</i> en la quimioprotección con luteína según el análisis SSCP	68

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Algunos posibles esquemas de exposición a un iniciador tumoral (mutagénico) y a un promotor tumoral (no mutagénico) y sus consecuencias	7
Figura 2	Diagrama de flujo acerca de la base molecular del cáncer	11
Figura 3	Esquema de los cambios morfológicos y moleculares que tienen lugar en la progresión del cáncer de colon	13
Figura 4	Cascada de transducción de señales en la que participa Ras	16
Figura 5	Vía de desarrollo en la que participa β -catenina	18
Figura 6	Fosas crípticas aberrantes, tinción con azul de metileno	20
Figura 7	Cambios morfológicos que se presentan en una fosa críptica durante el proceso de carcinogénesis	20
Figura 8	Metabolismo de la 1,2-DMH en roedores	22
Figura 9	Diagrama del modelo de carcinogénesis de colon: 1 ^a etapa	33
Figura 10	a - Apertura de la cavidad abdominal de la rata b - Aparato digestivo de la rata	36
Figura 11	Incidencia y número total de tumores en el colon de las ratas tratadas con 1,2-DMH y sacrificadas a diferentes tiempos	42
Figura 12	Número de tumores desarrollados por ratas tratadas con 1,2-DMH a los diferentes tiempos de sacrificio	44
Figura 13	Número de tumores en las diferentes regiones del colon de ratas tratadas con 1,2-DMH y sacrificadas a diferentes tiempos	45
Figura 14	a - Mucosa normal del colon de rata del grupo control b - Mucosa del colon de rata tratada con 1,2-DMH que presenta displasia leve	51

c - Mucosa del colon de rata tratada con 1,2-DMH que presenta displasia elevada

Figura 15	DNA de muestras de colon de rata	53
Figura 16	Productos de PCR para fragmentos de los genes <i>K-ras</i> y <i>β-catenina</i>	54
Figura 17	PCR-SSCP para el segmento amplificado del gen <i>K-ras</i>	55
Figura 18	PCR-SSCP para el segmento amplificado del gen <i>β-catenina</i>	58
Figura 19	Número de tumores desarrollados en los grupos de ratas sometidos a diferentes tratamientos con luteína	62
Figura 20	Número de tumores desarrollados por rata en los diferentes tratamientos de quimioprotección realizados	65
Figura 21	PCR-SSCP para el segmento del gen <i>K-ras</i> en la evaluación de la luteína como agente quimioprotector	67
Figura 22	PCR-SSCP para el segmento del gen <i>β-catenina</i> en la evaluación de la luteína como agente quimioprotector	69

ABREVIATURAS

1-NP	1-nitropireno
1,2-DMH	1,2 dimetilhidrazina
<i>Abl</i>	Oncogén – Leucemia murina Abelson
AOM	Azoximetano
<i>APC</i>	Gen supresor de tumores - Poliposis coli adenomatosa
<i>BRCA-1</i>	Gen supresor de tumores - Cáncer de mama - Homólogo 1
<i>BRCA-2</i>	Gen supresor de tumores - Cáncer de mama - Homólogo 2
<i>CDK</i>	Oncogén - Cinasa dependiente de ciclina
<i>DCC</i>	Gen supresor de tumores - Deletado en carcinoma de colon
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
<i>erb-B1</i>	Oncogén - Leucemia eritroblástica - Homólogo 1
<i>erb-B2</i>	Oncogén - Leucemia eritroblástica - Homólogo 2
FCAs	Fosas crípticas aberrantes
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FMO	Flavinmonooxigenasas
GDP	Guanosina 5' difosfato
Grb2	Receptor del factor de crecimiento unido a proteína 2
GSK-3 β	Cinasa de la sintasa del glucógeno 3 β
GTP	Guanosina 5' trifosfato
<i>HNPCC</i>	Gen supresor de tumores - Cáncer colon-rectal hereditario no polipoide
<i>Hst</i>	Oncogén - Codifica para una proteína de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos
IGFI	Factor de crecimiento tipo insulina
<i>int-2</i>	Oncogén - Codifica para una proteína de la familia del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
<i>Jun</i>	Oncogén – Fibrosarcoma
<i>K-ras</i>	Oncogén - Sarcoma de Kirsten en rata
MAM	Metilazoximetanol
MAPK	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos

MNU	Metilnitrosourea
<i>Myc</i>	Oncogén - Mielocitomatosis aviaria
<i>neu</i>	Oncogén - Neuroblastoma
NF-1	Neurofibromina 1
NF-2	Neurofibromina 2
NGF	Factor de crecimiento nervioso
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PhIP	2-amino 1-metil 6,6-fenilimidazol (4,5-b) piridina
PI3K	Cinasa de fosfatidilinositol
<i>Rb</i>	Gen supresor de tumores –Retinoblastoma
Rho/Rac	Proteínas involucradas en la organización del citoesqueleto de actina
RNA	Ácido ribonucleico
SSCP	Análisis del polimorfismo de cadena sencilla
Tcf/Lef	Factores de transcripción - Factor de células T/factor potenciador linfoide
TGF- β	Gen supresor de tumores - Factor de crecimiento transformante
β -TrCP	Proteína que contienen repeticiones de transducina- β

1. INTRODUCCIÓN

En nuestro país durante el año 2001 la morbilidad por cáncer ocupó el cuarto lugar y fue la segunda causa de muerte en la población con un índice del 12 % superado únicamente por las enfermedades cardiovasculares (INEGI, 2001). El cáncer colon rectal ha tomado gran importancia en los países de occidente en vías de desarrollo, presentándose con mayor frecuencia en el hombre y el 90 % de los casos se diagnostica después de los 50 años de edad.

En el desarrollo del cáncer se encuentran implicadas alteraciones en genes supresores de tumores y protooncogenes, los cuales provocan trastornos de los mecanismos que controlan la muerte celular programada, la proliferación y diferenciación celular. Entre los genes que participan en dicho proceso se encuentran *K-ras* y *β -catenina*, los cuales están mutados en aproximadamente el 50 % de los tumores colon rectales (Bos, 1989; Sparks *et al.*, 1998).

Por otro lado se ha demostrado a través de estudios epidemiológicos que una alta ingesta de vegetales y frutas puede proteger a los humanos contra cierto tipo de cánceres incluyendo el de colon. Entre los constituyentes de las frutas y vegetales a los que se les atribuye esta propiedad se encuentran los carotenoides, de los cuales sólo el β -caroteno ha sido el más estudiado por su capacidad anticarcinogénica. Sin embargo, existen otros carotenoides igual de abundantes en los alimentos tales como el licopeno y la luteína que podrían ser los responsables del bajo riesgo de cáncer observado (Slattery *et al.*, 2000a).

Se ha comprobado que la luteína al 0.05 % incorporada en la dieta puede disminuir el número de fosas crípticas aberrantes (FCAs) en ratones a los que se les indujo cáncer de colon (Kim *et al.*, 1998). Así mismo, se ha reportado que disminuye la incidencia y crecimiento de tumores en cáncer de mama en ratas al adicionar bajas concentraciones (0.002 % y 0.02 %) de este carotenoide en la dieta basal (Park *et al.*, 1998). Sin embargo, poco se sabe sobre la etapa de progresión del cáncer en la que podría tener un su papel quimioprotector ni el mecanismo por el cual actúa como tal.

Es por ello que en este estudio se evaluó la capacidad quimioprotectora de la luteína y su influencia sobre los genes *K-ras* y β -*catenina* durante el desarrollo de cáncer de colon inducido en ratas Sprague-Dawley con un agente alquilante (1,2-dimetilhidrazina, 1,2-DMH). Para tales determinaciones se realizaron estudios histopatológicos y moleculares como el análisis del polimorfismo de cadena sencilla (SSCP).

2. ANTECEDENTES

2.1 CÁNCER

2.1.1 Definición

El cáncer es una forma común de designar a todos los tumores malignos y se define como el trastorno de los mecanismos que controlan la proliferación y la diferenciación de las células en los organismos pluricelulares (Torroella y Villa-Treviño, 1998).

Hanahan y Weinberg (2000) consideran seis características de las células cancerosas: ignoran las señales que controlan la proliferación celular, así como las que promueven la diferenciación, adquieren capacidad para sostener la proliferación celular, evaden la apoptosis, tienen capacidad invasiva y angiogénica; por tanto las células cancerosas están definidas por dos propiedades hereditarias: 1) se reproducen a pesar de las restricciones normales e 2) invaden y colonizan territorios normalmente reservados para otras células. Una célula anormal aislada que no prolifere más que sus vecinas normales, no produce ningún daño significativo pero si su proliferación está fuera de control, producirá un tumor o neoplasia, una masa de células anormales. Sin embargo, si las células neoplásicas permanecen agrupadas en una masa única, se dice que el tumor es benigno y generalmente puede conseguirse una curación completa extrayendo la masa quirúrgicamente. Un tumor se considera canceroso sólo si es maligno, es decir, si sus células tienen la capacidad de invadir el tejido circundante. La capacidad invasora implica, generalmente, la habilidad de liberarse, entrar en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos y formar tumores secundarios o metástasis en otros lugares del cuerpo (Doll y Peto, 1987).

En el cuadro 1 se mencionan las principales diferencias entre las células normales y las células cancerosas.

Cuadro 1. Principales diferencias entre células normales y cancerosas

Células Normales	Células cancerosas
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tienen una división de funciones dentro del tejido como consecuencia de un programa de diferenciación determinado. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Existe una diferenciación celular incompleta por lo que ya no cumplen con las características propias del tejido.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Su tiempo de vida es limitado por lo que su muerte se efectúa en forma programada. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Son inmortales, es decir, tienen crecimiento indefinido.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Su proliferación es controlada, ya que responden a mecanismos reguladores (factores de crecimiento) que les indican cuándo dividirse y cuándo no. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Su proliferación celular es descontrolada, ya que no responden a los factores de crecimiento, con lo que se vuelven autónomas, o bien la respuesta a dichos factores se encuentra aumentada.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Presentan inhibición por contacto, proliferan hasta entrar en contacto con otras células vecinas. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pierden la inhibición por contacto, por lo que pueden crecer en capas o estratos formando la masa tumoral.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Presentan dependencia de anclaje, por lo tanto no tienen posibilidad de moverse y requieren de un soporte sólido sobre el cual fijarse y proliferar. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se hacen independientes al anclaje ganando la capacidad de movilización.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Su citoesqueleto se encuentra organizado lo que les confiere una arquitectura característica. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sufren una desorganización en la disposición celular original del tejido.

(Torroella y Villa-Treviño, 1998)

2.1.2 Causas

Se cree que la mayoría de los cánceres se originan a partir de una célula que ha experimentado una mutación somática. Pero para que la progenie de esta célula se transforme en cancerosa ha de sufrir más cambios, los cuales requieren de varias mutaciones adicionales dadas por factores exógenos o ambientales y endógenos o hereditarios. Dentro de los primeros encontramos a los de naturaleza química (agentes alquilantes, hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos, aminas aromáticas, amidas, colorantes nitrogenados, productos vegetales y microbianos naturales, etc.; que habitualmente causan simples cambios locales en la secuencia de nucleótidos), rayos ultravioleta y radiaciones ionizantes (rayos X, que típicamente causan roturas de cromosomas y translocaciones), virus (introducen en las células DNA extraño), los hábitos alimenticios y exposiciones laborales (Torroella y Villa-Treviño, 1998; Peto, 2001). El cáncer también puede desarrollarse debido a daños genéticos que han sufrido las células germinales por lo que la progenie hereda el daño y el nuevo individuo queda predispuesto genéticamente a contraer la enfermedad. Entre los síndromes de cáncer hereditario se encuentran el retinoblastoma y las afecciones relacionadas con los sistemas de reparación del DNA. La sensibilidad individual es también un factor que contribuye a las causas endógenas del cáncer (Torroella y Villa-Treviño, 1998; Cotran *et al.*, 2000; Ponder, 2001).

2.1.3 El proceso de carcinogénesis

La velocidad con que el proceso de carcinogénesis se desarrolla está dada por los agentes mutagénicos (iniciadores tumorales) así como por ciertos agentes no mutagénicos (promotores tumorales) los cuales afectan a la expresión génica, estimulan la proliferación celular y alteran el equilibrio homeostático de las células mutadas y no mutadas.

Los promotores tumorales causan cáncer con una frecuencia alta sólo si se aplican después de un tratamiento con un iniciador mutagénico. Los cambios

producidos por un iniciador tumoral son irreversibles y se pueden poner de manifiesto mediante tratamiento con un promotor tumoral incluso después de un largo intervalo de tiempo (Figura 1). Así, en el desarrollo de un cáncer dado contribuyen muchos factores; algunos de éstos son característicos del entorno. Por lo que, en principio, gran parte de cánceres se pueden prevenir (Berenblum, 1954; Reddy y Fialkow, 1988).

2.1.4 Bases moleculares del cáncer

En la carcinogénesis los principales blancos de mutaciones son tres clases de genes reguladores: los protooncogenes que estimulan el crecimiento, los genes supresores de tumores que inhiben el crecimiento y los genes que regulan la muerte celular programada o apoptosis. Se considera que los alelos mutantes de los protooncogenes son dominantes, ya que transforman a las células aún en la presencia de sus correspondientes alelos normales. Por el contrario, para que se produzca la transformación neoplásica de la célula deben resultar dañados los dos alelos normales de los genes supresores de tumores, por lo que esta familia de genes se denomina a veces oncogenes recesivos. Los genes que regulan la apoptosis pueden ser dominantes, como los protooncogenes o pueden comportarse como genes supresores del cáncer (Cotran *et al.*, 2000). Una gran proporción de protooncogenes codifican para componentes de las vías intracelulares de señalización, las cuales estimulan a la célula a dividirse (Cuadros 2 y 3) (Harris, 1986; Bishop, 1991).

Además de las tres clases de genes anteriormente mencionados, existe una cuarta categoría, los que regulan la reparación del DNA dañado, y que también están implicados en la carcinogénesis. Los genes de la reparación del DNA influyen indirectamente sobre la proliferación o la sobrevivencia celular a través de su efecto sobre la capacidad del organismo para reparar la lesión no letal de otros genes, entre ellos los protooncogenes, los genes supresores de tumores y los genes que regulan la apoptosis. La alteración de los genes que intervienen en la reparación del DNA puede predisponer a las mutaciones del genoma y, por lo

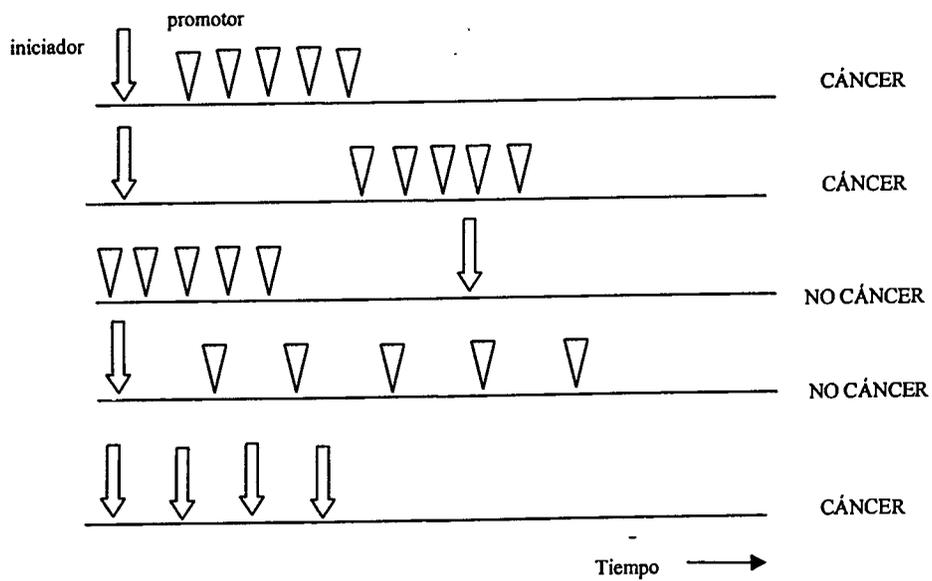


Figura 1. Algunos posibles esquemas de exposición a un iniciador tumoral (mutagénico) y a un promotor tumoral (no mutagénico) y sus consecuencias (Alberts *et al.*, 1994).

Cuadro 2. Mecanismos de activación de algunos oncogenes y su asociación con tumores humanos

Categoría	Oncogén	Mecanismo	Tumor humano asociado
Factor de crecimiento			
Factores de crecimiento de los fibroblastos	<i>hst-1</i>	Sobreexpresión	Cáncer gástrico
	<i>int-2</i>	Amplificación	Cáncer de vejiga
			Cáncer de mama
Receptores de factores de crecimiento			
Familia del receptor EGF	<i>erb-B1</i>	Sobreexpresión	Carcinoma de pulmón
	<i>erb-B2</i>	Amplificación	Cánceres de mama, ovario, pulmón y estómago
	<i>erb-B3</i>	Sobreexpresión	Cánceres de mama
Proteínas involucradas en la transducción de señales			
Unión a GTP	<i>ras</i>	Mutaciones puntuales	Cáncer de pulmón, colon y páncreas
Tirosina cinasa del tipo no receptor	<i>abl</i>	Translocación	Leucemia mieloide crónica Leucemia linfoblástica aguda
Proteínas reguladoras nucleares			
Activadores de la transcripción	<i>myc</i>	Translocación	Linfoma de Burkitt
	<i>N-myc</i>	Amplificación	Neuroblastoma Carcinoma de células de pulmón
	<i>L-myc</i>	Amplificación	Carcinoma de células de pulmón
Reguladores del ciclo celular			
Ciclinas	Ciclina CD	Translocación Amplificación	Linfoma del manto Cánceres de mama, hígado, esófago
Cinasa dependiente de ciclina	CDK4	Amplificación o mutación puntual	Glioblastoma, melanoma, sarcoma

(Weinberg, 1996; Hunter, 1997)

Cuadro 3. Genes supresores de tumores involucrados en las neoplasias humanas

Localización subcelular de la proteína codificada	Gen	Función	Tumores asociados
Superficie celular	Receptor de TGF- β	Inhibición del crecimiento	Carcinoma de colon
	Cadherina E	Adherencia celular	Carcinoma de estómago, mama
Anclado a la membrana citoplasmática	<i>NF-1</i>	Inhibición de la transducción de la señal <i>ras</i>	Schwannomas
Citoesqueleto	<i>NF-2</i>	Desconocida	Schwannomas y meningiomas
Citosol	<i>APC</i>	Inhibición de transducción de señales	Carcinoma de estómago, colon, páncreas; melanoma
Núcleo	<i>Rb</i>	Regulación del ciclo celular	Retinoblastoma; osteosarcoma; carcinoma de mama, colon, pulmón
	<i>p53</i>	Regulación del ciclo celular y apoptosis en respuesta a la lesión de DNA	Casi todos los cánceres humanos
	<i>WT-1</i>	Transcripción nuclear	Tumor de Wilms
	<i>p16 (INK4a)</i>	Regulación del ciclo celular por inhibición de cinasas dependientes de ciclinas	Cáncer de páncreas y esófago
	<i>BRCA-1</i>	Reparación del DNA	Cáncer de mama
	<i>BRCA-2</i>	Reparación del DNA	Cáncer de mama

(Cotran *et al.*, 2000)

tanto, a la transformación neoplásica. Para que se produzca inestabilidad del genoma, la alteración ha de afectar a los dos alelos de los genes de la reparación del DNA; en este sentido, dichos genes pueden ser considerados también como genes supresores de tumores (Cotran *et al.*, 2000).

La carcinogénesis es un proceso de pasos múltiples, tanto a nivel fenotípico como genético. Una neoplasia maligna posee varios atributos fenotípicos, como el crecimiento excesivo, la capacidad de infiltración local y la de producir metástasis. Estas características se adquieren de forma progresiva, fenómeno al que se ha denominado progresión tumoral. A nivel molecular, la progresión es consecuencia de la acumulación de lesiones genéticas que, en algunos casos, están potenciadas por los defectos de la reparación del DNA (Figura 2).

2.2 CÁNCER COLON-RECTAL

El cáncer colon-rectal es una de las enfermedades crónico degenerativas con creciente incidencia en los países occidentales, ocupando el segundo lugar como causa de muerte en los Estados Unidos de América. Se presenta con mayor frecuencia en el hombre, y el 90 % de los casos se diagnostican después de los 50 años de edad (Landis *et al.*, 1998). En el estado de Querétaro en el año 2001 esta neoplasia ocupó el noveno lugar entre los cánceres más comunes como el de próstata, tráquea, bronquios, estómago, cervico uterino y mama (Anuario Estadístico Querétaro de Arteaga, 2001).

La mayoría de los cánceres colon-rectales (90-95 %) surgen de tumores benignos llamados pólipos adenomatosos los cuales forman una masa que emerge hacia la luz intestinal. Su progresión resulta un proceso en etapas, con alteraciones en genes supresores y oncogenes, desarrollado lentamente durante varios años.

Utilizando sondas de DNA de protooncogenes conocidos y de genes supresores de tumores ha sido posible conocer las mutaciones que se acumulan con el tiempo para producir éste tipo de cáncer. El 75 % de los cánceres colon-rectales tienen mutaciones de inactivación en el gen supresor *p53*; el 50 % tienen

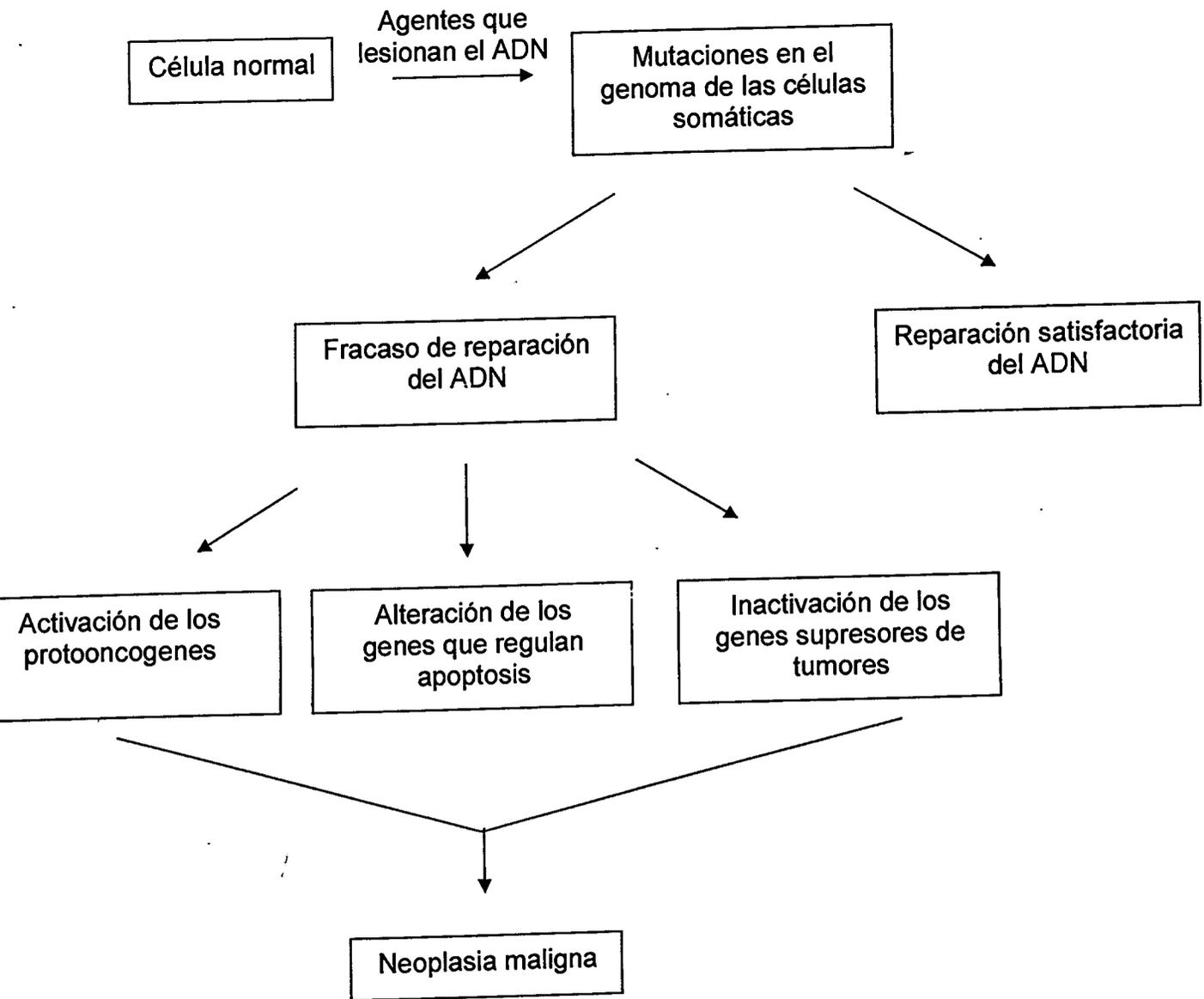


Figura 2. Diagrama de flujo acerca de la base molecular del cáncer (Cotran *et al.*, 2000)

mutaciones puntuales en el protooncogen *ras* (normalmente una mutación específica de activación, en el codón 12 del gen *K-ras*); un pequeño porcentaje tiene amplificado el número de copias del protooncogen *myc*; y otro mínimo tiene mutaciones en otros protooncogenes conocidos (Cuadro 4). Dado que para el desarrollo del cáncer son necesarias varias mutaciones, podría plantearse si también es importante el orden concreto en el que éstas se producen. Así, en el cáncer de colon, se considera que la inactivación de *APC* es un primer paso, importante para la carcinogénesis, y que esta mutación existe en las lesiones neoplásicas más precoces (adenoma). Cabe destacar que en modelos experimentales (ratones) con una disrupción dirigida en el gen *APC* desarrollan múltiples adenomas cólicos, los que tienen deleciones homocigóticas del gen *p53* desarrollan muchos tumores, pero no carcinomas de colon. Esto indica que las mutaciones de *p53* desempeñan un papel importante en la progresión, pero no en la iniciación, del cáncer de colon (Figura 3) (Fearon y Vogelstein, 1990; Su *et al.*, 1993; Cotran *et al.*, 2000).

Cuadro 4. Genes que presentan mutaciones en las células de cáncer colon-rectal

Gen	Cromosoma	% de tumores con mutaciones	Clase
<i>K-ras</i>	12	~50	Oncogén
<i>β-catenina</i>	3	~50	Oncogén
<i>neu</i>	17	2	Oncogén
<i>myc</i>	8	2	Oncogén
<i>APC</i>	5	>70	Supresor de tumores
<i>DCC</i>	17	>70	Supresor de tumores
<i>p53</i>	17	>70	Supresor de tumores
<i>HNPCC</i>	2	~15	Supresor de tumores

(Modificado de Marx, 1992)

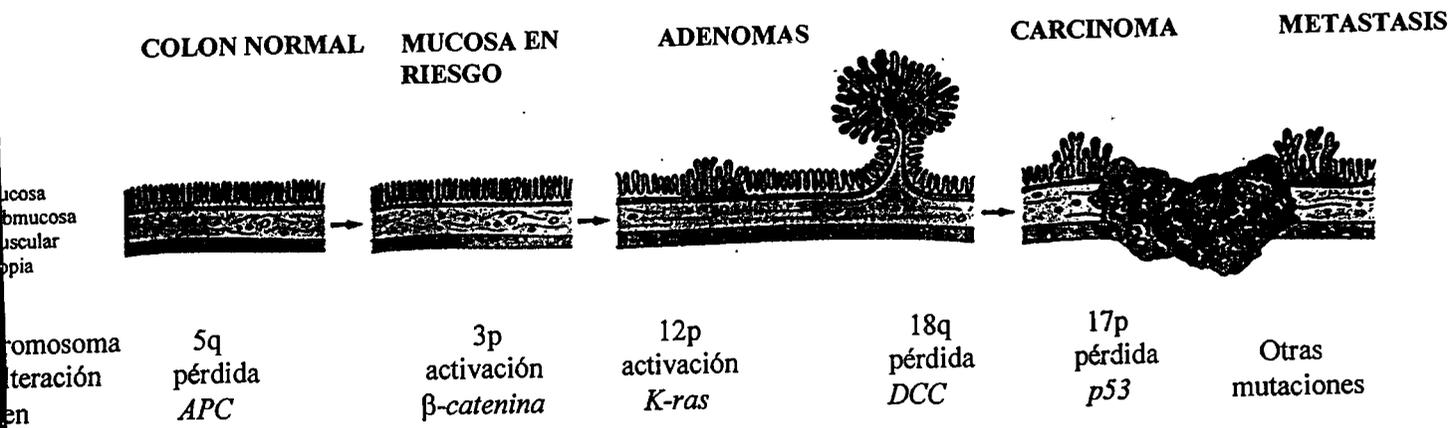


Figura 3. Esquema de los cambios morfológicos y moleculares que tienen lugar en la progresión del cáncer de colon (Cotran *et al.*, 2000).

A pesar de que las mutaciones en *APC*, *ras*, *DCC* y *p53* parecen ser pasos cruciales en una gran proporción de cánceres colon-rectales, estas mutaciones no siempre ocurren en la misma secuencia, y no son la única ruta de la enfermedad (Fearon y Vogelstein, 1990).

2.2.1 Genes y proteínas *ras*

Los miembros de la familia *ras* son los protooncogenes que más comúnmente se encuentran alterados en tumores sólidos humanos; la frecuencia varía alrededor del 30 % y en algunos casos, como los adenocarcinomas pancreáticos y de pulmón supera el 50 % (Barbacid, 1987).

En los humanos existen tres genes *ras* funcionales: *H-ras-1*, *K-ras-2* y *N-ras* que codifican para proteínas homólogas, con un peso molecular de 21 kDa. Las proteínas Ras pertenecen a un conjunto muy extenso de GTPasas, la familia de las proteínas G, las cuales participan en el control de una gran variedad de procesos celulares. Estas proteínas, como todas las GTPasas, son moléculas que unen e hidrolizan GTP y funcionan como interruptores con dos conformaciones: un estado inactivo unido a GDP, y un estado activo, unido a GTP.

El recambio entre las formas activa e inactiva se encuentra regulado principalmente por tres clases diferentes de factores: proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) e inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs). La activación de Ras involucra el intercambio de GDP por GTP, el cual está dado por los GEFs, entre los que se encuentra Sos, y está regulada negativamente por los GDIs (Boguski y McCormick, 1993). Las proteínas Ras tienen una capacidad intrínseca, muy baja, para hidrolizar GTP, pero el proceso es acelerado de manera significativa por las proteínas GAP.

Las proteínas Ras adquieren la capacidad de inducir transformación celular por el cambio de uno sólo de sus aminoácidos. Las mutaciones transformantes de estos genes ocurren en los codones 12,13, 59 ó 61, siendo las de los codones 12 y 61 las que ocurren con mayor frecuencia en los tumores humanos (Barbacid, 1987). Estas mutaciones provocan cambios de aminoácidos que se encuentran en el sitio activo

de la proteína y por ello afectan profundamente su función, pues resultan en la permanencia de la forma activa de Ras al impedir la hidrólisis necesaria del GTP. La forma activa de la proteína Ras se encuentra estrechamente relacionada al flujo de señales regulatorias para el control del ciclo celular, proliferación y diferenciación (Santana y García-Carrancá, 1996).

Las proteínas Ras funcionan como componentes críticos en cascadas de transducción de señales iniciadas por la estimulación de diversos receptores. La unión del receptor con su ligando, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento tipo insulina (IGFI), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), provoca la activación del receptor y su autofosforilación dando lugar a que el complejo Grb2/Sos se una a este receptor fosforilado. El complejo Grb2/Sos está presente en el citosol en células no estimuladas, se une al receptor activado a través de Grb2, mediante sus dominios SH2, lo que resulta en acercar a Sos a la membrana plasmática provocando la activación de Ras al promover el intercambio de GDP por GTP.

La proteína activa Ras estimula dos vías de señalización. Por un lado la cascada de las MAP cinasas (MAPK, proteínas activadas por mitógenos) que llegan hasta el núcleo activando factores de transcripción como jun, fos, myc, que promueven la expresión de determinados genes involucrados en proliferación y por el otro lado a las proteínas Rho/Rac, las cuales a su vez producen cambios en el citoesqueleto de actina (Figura 4).

Ras también interviene en la inhibición de apoptosis actuando a través de la vía de señalización de la cinasa de fosfatidilinositol 3 (PI3K) y AKT, ambas originan el bloqueo de la liberación de citocromo c a partir de la membrana mitocondrial. Este proceso es llevado a cabo principalmente por la fosforilación mediada de AKT quien inactiva a BAD la cual normalmente se encuentra destinada a promover la liberación del citocromo c para impedir la función antiapoptótica de Bcl-2 y Bcl-XL (Kennedy *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000).

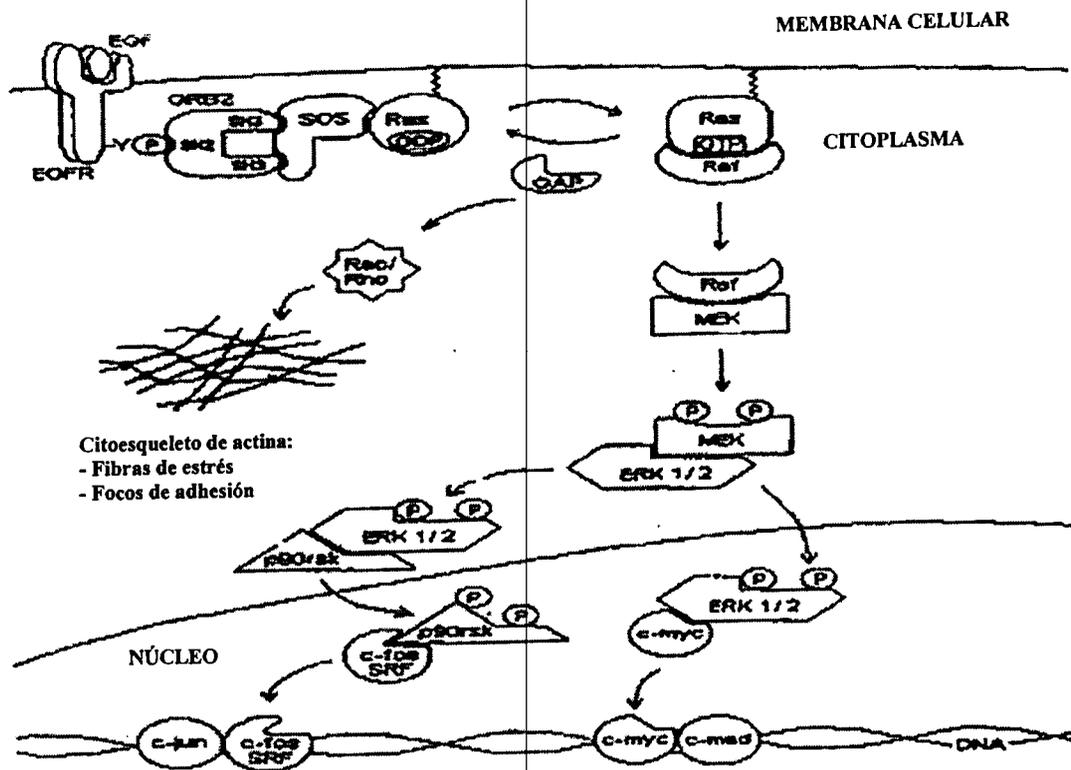


Figura 4. Cascada de transducción de señales en la que participa Ras (Santana y García-Carrancá, 1996)

2.2.2 β -catenina

β -catenina es una proteína intracelular producto del gen *CTNNB1*, la cual se encuentra involucrada estructuralmente en la adhesión celular al unirse a cadherinas transmembranales a través de la superficie de la membrana plasmática. También participa como activador transcripcional cuando forma un complejo en el núcleo con miembros de la familia Tcf/Lef (factor de células T/factor potenciador linfoide; factores de transcripción) (Korinek *et al.*, 1998).

Los niveles de β -catenina en citoplasma están regulados a través de la cascada de transducción de señales Wnt, en la cual un complejo proteico constituido por APC, axina y la cinasa de la sintasa del glucógeno 3β (GSK- 3β), la regulan

negativamente (Hecht y Kemler, 2000; Polakis, 2000). En ausencia de la vía de señalización Wnt, APC sirve de soporte que permite la aproximación de β -catenina con el complejo GSK-3 β -axina. GSK-3 β une a axina y la fosforila posteriormente este complejo se acopla a APC la cual es fosforilada también por GSK-3 β , β -catenina se une a APC fosforilado, interactúa con axina y es fosforilada por GSK-3 β en residuos de serina-treonina siendo ésta blanco de ubiquitinación por proteínas que contienen repeticiones de transducina- β (β -TrCP) para su posterior degradación (Figura 5) (Aberle *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999).

En tumores humanos las mutaciones en *CTNNB1*, dan lugar a cambios en los residuos de fosforilación serina-treonina de β -catenina, estabilizándola y permitiendo la acumulación de complejos β -catenina-Tcf-Lef en el núcleo (Sparks *et al.*, 1998). Este complejo es capaz de activar varios genes incluyendo *c-myc*, *c-jun* y *ciclina D1*. Las mutaciones en β -catenina usualmente ocurren en los sitios adyacentes o entre los cuatro sitios reguladores de fosforilación (codones 33, 37, 41 y 45) localizados en la porción N-terminal de la proteína (Robbins *et al.*, 1996; Kitaeva *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1997; Zurawel *et al.*, 1998; Koesters *et al.*, 1999). Estos cambios están asociados con una variedad de cánceres entre los que se encuentran el de piel, cerebro, hígado y colon y han sido encontrados especialmente, en alrededor de 50 % de los tumores humanos de colon en los cuales el gen *APC* no presenta ninguna mutación (Sparks *et al.*, 1998).

En un estudio reciente, Koesters y col. (2001) encontraron en tumores de ratas inducidos con 1,2-dimetilhidrazina (1,2-DMH) que el 99 % de éstos tenían una mutación puntual en el codon 41 (ACC \rightarrow ATC) de β -catenina resultando un reemplazo del sitio de fosforilación treonina por isoleucina. En esta misma investigación se encontró que las mutaciones en β -catenina ocurren en presencia o ausencia de mutaciones en *K-ras*. Este hallazgo sugiere fuertemente que ambas vías de señalización Wnt y MAPK actúan independientemente una de otra y que las mutaciones que las afectan contribuyen de manera sinérgica en la carcinogénesis de colon de rata.

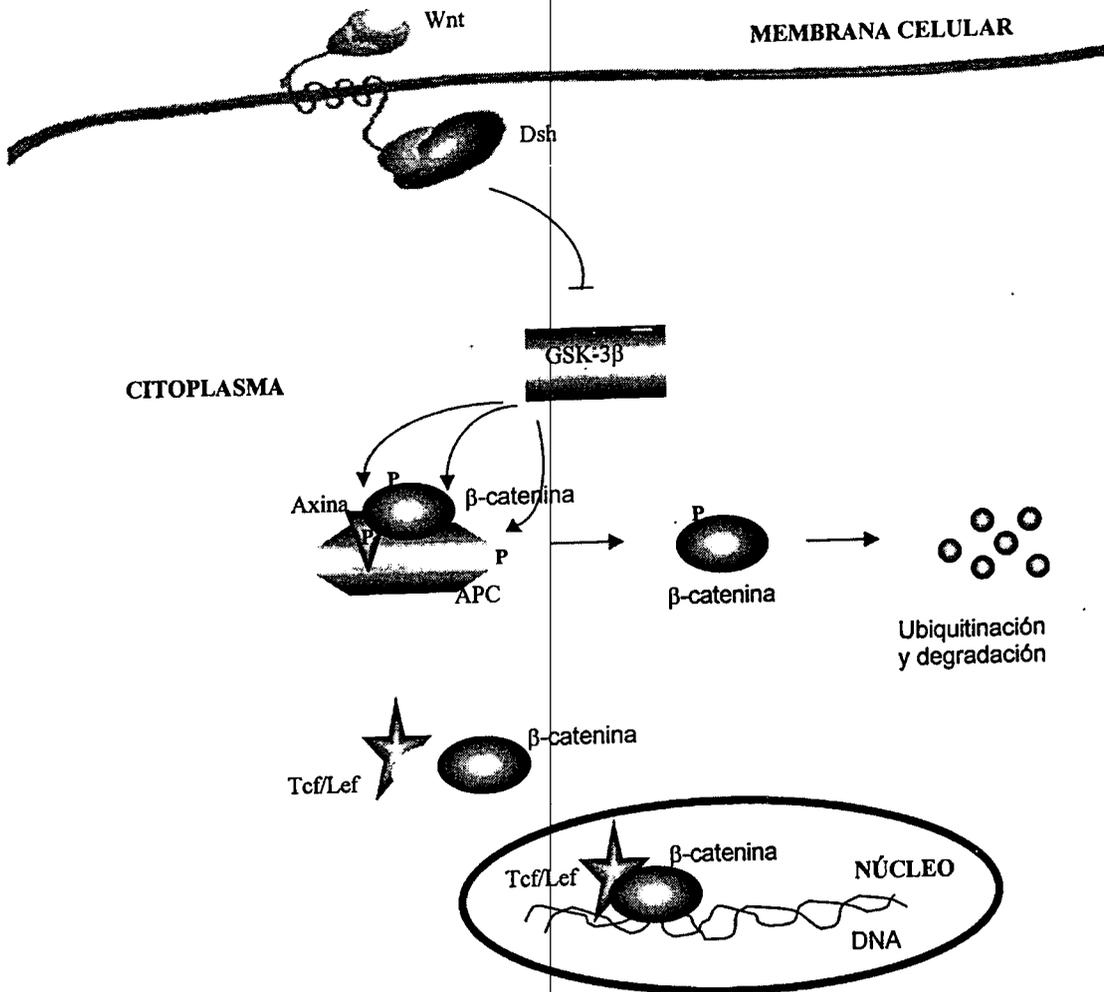


Figura 5. Vía de desarrollo en la que participa β -catenina (Novak y Dedhar, 1999)

2.2.3 Modelos animales en el estudio de carcinogénesis colon-rectal

Los estudios donde se emplean modelos animales permiten probar y definir el papel de los factores exógenos y endógenos en la etiología y prevención del cáncer de colon. Se han utilizado varios biomarcadores para el seguimiento de la

carcinogénesis entre los que se encuentran: proteínas relacionadas con ciclo celular, cuantificación y localización de células en tejido de colon en proliferación, marcadores de diferenciación, alteraciones enzimáticas, expresión de oncogenes específicos o sus productos y fosas cripticas aberrantes (FCAs). Estas últimas son un sistema específico en el estudio de la carcinogénesis de colon, el número y características de crecimiento de las FCAs se incrementan con el tiempo conforme el daño se va presentando (Bird y Good, 2000).

Las FCAs fueron detectadas por primera vez en roedores en 1987 por Ranjana Bird, pocas semanas después de haber inyectado un carcinógeno químico. Las FCAs son fáciles de reconocer en un colon donde se presente tal daño ya que son de dos a tres veces más grandes que las criptas normales, son microscópicamente elevadas, tienen una apertura alargada hacia el lumen y poseen una cubierta delgada de epitelio que permite se tiña más intensamente que las criptas normales (Figuras 6 y 7). Es importante saber que la morfología y características fenotípicas de las FCAs y tumores en colon de ratas, que han sido tratadas con carcinógenos, es similar a las que presentan los humanos que desarrollan la anomalía (Corpet y Taché, 2002a).

En estudios de carcinogénesis se han identificado varios compuestos que son capaces de desarrollar tumores en el colon, entre ellos se encuentran 1,2-dimetilhidrazina (1,2-DMH), azoximetano (AOM), metilnitrosourea (MNU) y 2-amino-1-metil-6,6-fenilimidazol (4,5-b) piridina (PhIP). El más comúnmente usado ha sido la 1,2-DMH o su metabolito AOM ya que son capaces inducir tumores en un 64 % de la población de animales tratados vía oral o hasta un 80 % si el tratamiento con 1,2-DMH se realiza vía subcutánea (Bland y Britton, 1981; Deasy *et al.*, 1983).

Independientemente de la ruta de administración, y en dosis adecuadas, la 1,2-DMH produce una alta incidencia de adenomas y adenocarcinomas en colon de ratas y ratones y en menor cantidad en intestino delgado. En algunos experimentos con ratas se ha visto que desarrolla papilomas y carcinomas en el oído interno, hepatocarcinomas, adenomas en riñón y fibrosarcomas (Chemical Abstracts Service, 1999).

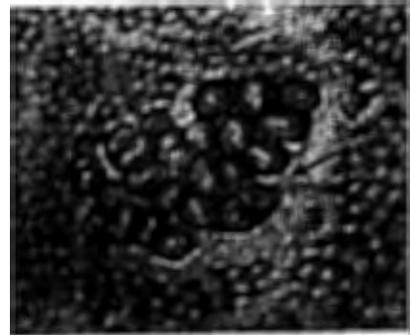
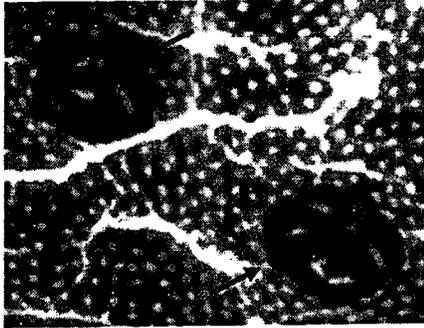


Figura 6. Fosas crípticas aberrantes (FCAs), tinción con azul de metileno. En la fotografía de la derecha se muestran un conjunto de FCAs de humano y en la fotografía de la izquierda dos FCAs de rata. En ambas fotografías es apreciable que las FCAs (señaladas con una flecha) tienen una apertura alargada hacia la luz intestinal y su tamaño es más grande en comparación con las fosas crípticas normales que se encuentran rodeándolas. (Corpet y Taché, 2002b)

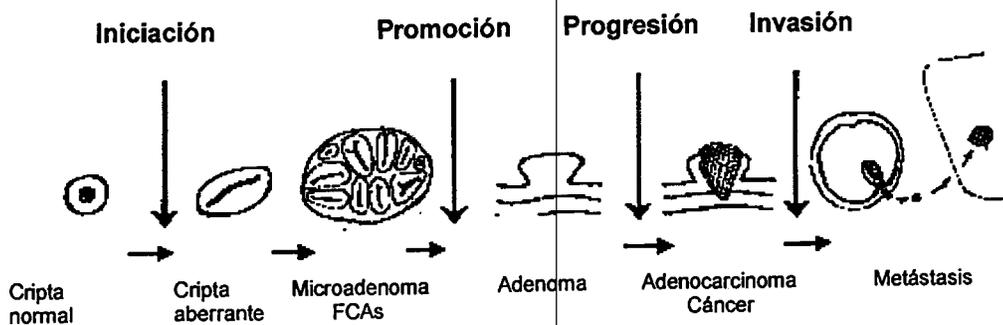


Figura 7. Cambios morfológicos que se presentan en una fosa críptica durante el proceso de carcinogénesis del colon. (Corpet y Taché, 2002b)

El metabolismo de la 1,2-DMH se muestra en la figura 8. La 1,2-DMH es rápidamente absorbida y puede ser N-desmetilada produciéndose formaldehído; también puede sufrir oxidación a través de las flavinmonooxigenasas (FMO) que se encuentran en hígado siendo metabolizada a AOM. Una segunda oxidación da lugar al metabolito metilazoximetanol (MAM), el cual da lugar al ión metilcarbonio, último carcinógeno que se une covalentemente con proteínas, DNA y RNA para formar aductos. Por otro lado algunos de los productos intermedios y finales obtenidos durante el metabolismo de la 1,2-DMH se conjugan principalmente con ácido glucorónico para formar conjugados fácilmente excretables. Sin embargo, estos conjugados se transportan al colon vía entero-hepática donde β -glucuronidasas de la microflora intestinal o producidas por los colonocitos se encargan de reactivar a el carcinógeno último por lo cual la 1,2-DMH es un carcinógeno efectivo y selectivo del colon (Celik *et al.*, 1983; Parkinson, 1996; Corpet y Taché, 2002b).

Es importante hacer la aclaración de que aún no se encuentra totalmente elucidado el metabolismo por el cual la 1,2-DMH llega a convertirse en carcinógeno. No obstante se tiene suficiente evidencia de que en tejido humano, células y preparaciones subcelulares humanas la activación de este carcinógeno se lleva de manera muy similar como ocurre en los roedores prueba de ello es que la mayoría de los tumores que aparecen en el colon de ratas o ratones, a los que se les induce cáncer mediante 1,2-DMH, se localizan en la zona distal e histopatológicamente son muy parecidos a los tumores de colon en humanos (Maskens, 1976; Fiala *et al.*, 1978).

Dado lo anterior, la carcinogénesis química de colon en roedores es ampliamente utilizada en el estudio de los diferentes aspectos del cáncer especialmente en el desarrollo de estrategias terapéuticas y de prevención.

2.3 QUIMIOPROTECCIÓN Y CANCER

Se sabe que entre los factores que influyen en el padecimiento del cáncer colon-rectal se encuentran: la edad, el sedentarismo y exceso de peso, el padecimiento de pólipos, especialmente adenomas, enfermedades inflamatorias intestinales,

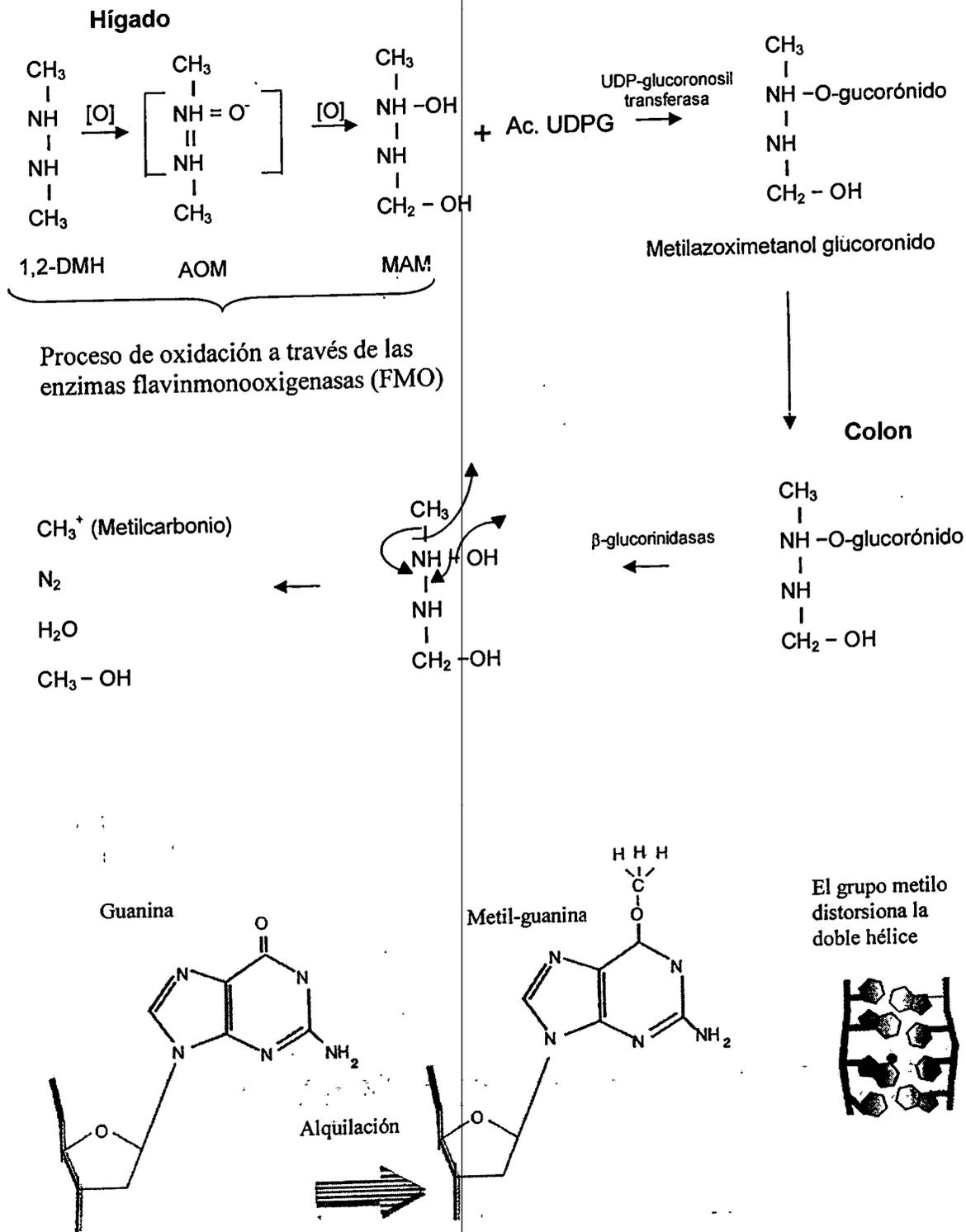


Figura 8. Metabolismo de la 1,2-DMH en roedores (Celik *et al.*, 1983; Parkinson, 1996)

antecedentes familiares de cáncer colon-rectal o poliposis, y la dieta sobre todo si ésta es pobre en fibras, calcio y vitaminas (A, D y E); y rica en grasas, proteínas, calorías y ácidos biliares; por lo que modificaciones en los hábitos alimenticios pueden prevenir de un 70 a un 80 % el cáncer colon-rectal (Cummings y Bingham, 1998). De igual forma, se ha visto que un consumo adecuado de frutas y vegetales está asociado con una menor probabilidad de padecer alguna enfermedad degenerativa como el cáncer; enfermedades cardiovasculares, cataratas, y disfunción inmunológica y cerebral (Ames, 1995).

Antioxidantes como las vitaminas C y E, carotenoides, flavonoides, etc., se encuentran en frutas y vegetales presentes en la dieta. Además de su función alimenticia, se ha demostrado que proporcionan beneficios fisiológicos al reducir enfermedades crónico degenerativas por lo que se les da el nombre de alimentos funcionales o nutraceuticos (Morrissey, 2002).

Un concepto estrechamente relacionado con el de alimento funcional es la quimioprotección, la cual ha producido un gran interés en los últimos años como un medio de control para el cáncer. El término quimioprotección se refiere al uso de agentes farmacológicos o naturales como constituyentes que se encuentran naturalmente en la dieta, los cuales inhiben el desarrollo del cáncer invasivo ya sea por el bloqueo del daño al DNA, que inicia la carcinogénesis, o por la inhibición o reversión de la evolución de células premalignas en las cuales el daño ha ocurrido (Sporn, 1976; Potter y Steinmetz, 1996).

La clasificación absoluta de los agentes usados para la quimioprotección es difícil debido a que el mecanismo preciso de acción de muchos de ellos no se conoce. Además, muchos agentes actúan a través de más de un mecanismo.

El esquema desarrollado por Wattenberg (1985) está basado en el periodo de tiempo durante el cual el agente parece exhibir actividad en un modelo animal de carcinogénesis. Con base a esto se han clasificado como: agentes inhibidores de la formación del carcinógeno, agentes bloqueadores o inhibidores de la iniciación del tumor y agentes supresores o inhibidores de la promoción y progresión.

- a) Agentes inhibidores de la formación del carcinógeno: en este grupo se encuentran aquellos compuestos que actúan predominantemente para prevenir la formación de carcinógenos. Ejemplo de éstos es la vitamina C que inhibe la formación de nitrosaminas a partir de aminas secundarias y nitrito en un ambiente acidificado; otros agentes son el ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico, compuestos sulfhidrilo, prolina y tiolprolina.
- b) Agentes bloqueadores del carcinógeno o inhibidores de la iniciación del tumor: muchos de los compuestos carcinogénicos son directos mientras que otros requieren ser activados metabólicamente vía los sistemas enzimáticos de detoxificación de la fase I. En este último caso, el compuesto se transforma en una especie electrofílica capaz de formar aductos con el DNA, lo cual regularmente resulta en una mutación. Los compuestos que bloquean la formación del metabolito activo pueden actuar a nivel de: la inhibición del sistema P-450, la inducción del sistema P-450, la inducción de las enzimas detoxificantes de la fase II, la inmovilización de las especies electrofílicas y la inducción de los sistemas de reparación de DNA. Entre los compuestos con estas propiedades se encuentran los carotenoides, los polifenoles, el ácido elágico, los isotiocianatos, la vainillina y los indoles.
- c) Agentes inhibidores de la promoción y progresión: compuestos capaces de actuar cuando el tumor ya se ha formado, inhibiendo su crecimiento y diseminación. Estos agentes actúan a nivel de promoción o de progresión neoplásica y se clasifican de la siguiente manera: inhibidores del metabolismo de poliaminas, inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico, inhibidores de proteasas, inductores de la diferenciación celular, inhibidores de la expresión del oncogén, inhibidores de la proteína cinasa C e inhibidores del daño oxidativo al DNA. Compuestos con estas características son los retinoides y carotenoides, la curcumina, el ácido cumérico, los inhibidores de proteasas, los inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico, los isocianatos y fenoles, el calcio, la vitamina D, el limoneno y las catequinas.

En una revisión realizada por Corpet y Taché (2002a) de aproximadamente 200 estudios llevados a cabo con diferentes quimioprotectores dan a conocer que sólo la mitad de los mencionados reducen en 50 % tanto la incidencia de FCAs como de tumores. Los agentes quimioprotectores con mayor potencia para reducir el número de FCAs fueron: plurónico al 5 %, polietilenglicol 8000 al 5 %, el aceite de perilla al 12 % adicionado de β -caroteno, sulfato de sulindac inicialmente en 0.3 % y posteriormente en 0.1 %. Para el caso de los tumores se tienen a: celecoxib al 0.15 %, difluorometilornitina en 0.2 % con piroxicom 200ppm, polietilenglicol 8000 al 5 %, tiosulfonato 100ppm. En la mayoría de estas investigaciones los agentes se dieron a las ratas durante los periodos de iniciación o postiniciación (durante y después del carcinógeno), siendo el protocolo de postiniciación de mayor relevancia ya que permite clasificar a los compuestos utilizados así como agentes que previenen la reaparición y la progresión de lesiones precursoras del cáncer de colon.

2.3.1 La luteína y su potencial quimioprotector

El color amarillo, naranja y rojo de muchas frutas es debido a la presencia de carotenoides, los cuales se encuentran entre los pigmentos más ampliamente utilizados. Junto con la clorofila, ellos se encuentran en todos los organismos capaces de realizar fotosíntesis. Pero a diferencia de las clorofilas y antocianinas, los carotenoides también se encuentran en productos de origen animal tales como la leche, mantequilla y yema de huevo debido a que se encuentran propiamente en el alimento de los animales o se han adicionado intencionalmente.

Los carotenoides pueden ser clasificados como carotenoides hidrocarbonados (α -caroteno, β -caroteno y licopeno) u oxicarotenoides (xantofilas) los cuales incluyen a la luteína, zeaxantina y β -criptoxantina. Éstos se encuentran en el anato, extractos de páprika, de alfalfa, de girasol, de flor de cempasúchil, de tomate y de zanahoria, etc., y son utilizados como colorantes en alimentos (Gross, 1987; 1991).

En algunos estudios se ha demostrado que se pueden obtener cantidades importantes de xantofilas, principalmente luteína, a partir de la flor de cempasúchil, las cuales se han utilizado exitosamente para obtener buena pigmentación de la piel y huevos de pollo (Gregory *et al.*, 1986). De tal manera que el consumo de estos alimentos también contribuye al aporte de carotenoides al humano. Otro punto a considerar, para el uso de carotenoides como aditivos colorantes, es que pueden actuar como antioxidantes en la dieta y por ello proteger a las células de daño oxidativo. Los carotenoides son considerados como atrapadores de radicales de oxígeno, forma muy reactiva y mutagénica. Por lo tanto se trata de un grupo muy especial de antioxidantes de naturaleza lipídica (Burton e Ingold, 1984). La actividad antioxidante que ejercen los carotenoides que se encuentran en la membrana celular se halla influida por la posición que en ella ocupan, tal es el caso que presentan la luteína y zeaxantina al ser más efectivas que el β -caroteno como atrapadoras de especies de radicales de oxígeno. Esto debido a su estructura menos hidrofóbica, lo cual les permite reaccionar con los radicales libres en la fase acuosa de la membrana celular, incrementando la integridad de dicha membrana (Krinsky y Deneke, 1982; Britton, 1995).

Además de su función antioxidante, los carotenoides se consideran agentes potenciales en la prevención de enfermedades relacionadas con los procesos de mutagénesis y carcinogénesis (Krinsky, 1990), de la misma forma se ha demostrado tienen la capacidad de incrementar las funciones inmunes y facilitar las comunicaciones celulares (Zhang *et al.*, 1991; Le Marchand *et al.*, 1997). Hasta la fecha el α -caroteno y β -caroteno han sido ampliamente estudiados como agentes anticarcinogénicos. No obstante, se ha informado que el β -caroteno incrementa la incidencia de cáncer de pulmón al ingerirse en poblaciones que tienen alto riesgo de padecerlo (fumadores y/o trabajadores de asbesto) y no tiene ningún efecto sobre enfermedades cardiovasculares (Albanes *et al.*, 1995; Hennekens *et al.*, 1996; Omenn *et al.*, 1996). Los experimentos realizados en animales como rata y ratón resultan muy

contradictorios con respecto al efecto del β -caroteno sobre el cáncer de colon y mama (Temple y Basu, 1987; Alabaster *et al.*, 1995; Kushi *et al.*, 1996; Verhoeven *et al.*, 1997).

Aunque la mayoría de los estudios se han enfocado al β -caroteno existen otros carotenoides como la luteína, un carotenoide sin actividad de provitamina A, de la cual se ha demostrado que tiene propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas, esto se ha sugerido por su capacidad de inhibir la mutagenicidad inducida por 1-Nitropireno (1-NP) y aflatoxina B1 (González de Mejía *et al.*, 1997a, 1997b). En estudios con animales, en los cuales se utilizaron ratones hembra a los que se les indujo cáncer de mama, dos de las concentraciones más bajas de luteína adicionada en la dieta (0.002 % y 0.02 %) inhibieron la incidencia, crecimiento y latencia de los tumores (Park *et al.*, 1998). De la misma forma en una investigación realizada sobre cáncer de colon en ratas, la dosis más baja de luteína (0.24 mg/día) mostró tener la mejor eficiencia en disminuir el número de FCAs en comparación con otros carotenoides, dados en la misma cantidad, como el α - y β -caroteno (Narisawa *et al.*, 1996). También se ha demostrado que la luteína adicionada en la dieta en 0.05 % es capaz de abatir el número de FCAs en ratones tratados con 1,2-DMH (Kim, *et al.*, 1998).

Por otro lado estudios epidemiológicos han demostrado que la alta ingesta de luteína puede proteger contra el cáncer de colon en hombres y mujeres. Esta relación es más fuerte en personas a las cuales se les diagnosticó cáncer a edad temprana y en aquéllas con tumores localizados en el segmento proximal del colon. Los principales alimentos consumidos por dichas personas fueron espinaca, brócoli, lechuga, tomate, naranja, jugo de naranja y zanahoria. Estos datos sugieren que la incorporación de estos alimentos en la dieta pueden ayudar a reducir el riesgo de desarrollar cáncer de colon (Slattery *et al.*, 2000a).

El consumo promedio *per capita* de luteína en los Estados Unidos de América es de aproximadamente 1-2 mg/día, sin embargo la ingesta varía según la cultura de la que se provenga ya que los afro-americanos consumen 3 mg/día

en promedio y los hispano-americanos la mitad de dicha cantidad (Mares-Perlman *et al.*, 2001); la "Food and Drugs Administration" (FDA) no ha fijado una dosis necesaria aunque se recomienda un consumo de 6 mg/día. Por otra parte existen varios productos a base de luteína cuya recomendación es tomar diariamente tres pastillas de 20 mg cada una con la finalidad de prevenir y tratar afecciones como la degeneración de la mácula y aparición de cataratas.

3. JUSTIFICACIÓN

La alta ingesta de vegetales y frutas se ha vinculado con la baja frecuencia de padecer ciertos tipos de cánceres incluyendo el colon-rectal. Entre los varios constituyentes de las frutas y vegetales se encuentran los carotenoides. Dos de ellos, el α - y β -caroteno, han sido estudiados como posibles agentes quimioprotectores. Sin embargo, existen otros como la luteína que podría ser responsable de tal protección. Por otra parte se han realizado investigaciones donde se ha demostrado que la luteína es capaz de disminuir el número de tumores en colon de ratas a las cuales se les ha inducido este cáncer. No obstante, no se ha definido en qué etapa del desarrollo de esta patología protege y si es que tiene algún efecto sobre las mutaciones que sufren los genes *K-ras* y *β -catenina*, los cuales juegan un papel importante durante la génesis de esta enfermedad crónico degenerativa.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el potencial quimioprotector de la luteína mediante el uso de un modelo de carcinogénesis en colon de ratas Sprague-Dawley, inducido con 1,2-dimetilhidrazina (1,2-DMH).

4.2 Objetivos específicos

- I. Evaluar las alteraciones histológicas desarrolladas durante la carcinogénesis de colon, inducido con 1,2-DMH, en ratas Sprague-Dawley a diferentes tiempos, posteriores al inicio del tratamiento con el carcinógeno.
- II. Analizar los cambios que se presenten en los genes *K-ras* y *β-catenina* en los tumores generados en el modelo de carcinogénesis mediante la técnica de análisis de polimorfismo de cadena sencilla (SSCP).
- III. Determinar la etapa de quimioprotección de la luteína incorporada a la dieta basal de ratas Sprague-Dawley, durante el desarrollo de cáncer de colon, usando marcadores histológicos.
- IV. Estudiar las alteraciones de los genes *K-ras* y *β-catenina* mediante la técnica de análisis de polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) durante la administración de la luteína en las diferentes etapas del desarrollo de carcinogénesis de colon.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Rátas macho Sprague-Dawley de cuatro semanas de edad adquiridas en Harlan de México S.A. de C.V.

5.2 Compuestos químicos

La 1,2-Dimetilhidrazina (1,2-DMH) se adquirió de Fluka

Reactivos utilizados para la extracción de DNA: fenol equilibrado (ultrapuro, USB), cloroformo y alcohol isoamílico (J.T. Baker), alcohol etílico (Merck), proteinasa K 20 mg /ml (BioRad)

El kit para llevar a cabo las reacciones de PCR (Taq DNA polimerasa 5 U/ μ l, mezcla de dNTP's 10 mM) así como los marcadores de peso molecular se obtuvieron de Invitrogen

Los reactivos con que se realizaron las electroforesis tanto en geles de agarosa como de acrilamida se obtuvieron de BioRad excepto la formamida que se adquirió en Sigma Chemical Co.

Las sales utilizadas para amortiguadores y solventes de uso general fueron grado analítico de la marca J.T.Baker

Cuando fue requerido se utilizó agua grado HPLC estéril

Para lograr los objetivos planteados en el proyecto éste se dividió en dos etapas: en la primera se estableció el modelo de carcinogénesis en ratas Sprague Dawley y en la segunda se evaluó el efecto quimioprotector de la luteína sobre el cáncer de colon.

5.3 Modelo de carcinogénesis

Se utilizaron 60 ratas macho Sprague-Dawley de cuatro semanas de edad las cuales se mantuvieron en jaulas metálicas, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y temperatura de 25 °C. Se les suministró agua y alimento (2018S Harlan Tekland) *ad limitum* y semanalmente se monitoreó su peso. Después de una semana de aclimatación se dividieron aleatoriamente en tres grupos.

Cada grupo consistía de 15 ratas tratadas y 5 ratas control, a las primeras se les inyectó vía subcutánea (s.c.) 21 mg/kg de 1,2 dimetilhidrazina (1,2-DMH) semanalmente durante 8 semanas mientras que a las ratas control sólo se les inyectó por la misma vía el vehículo de 1,2-DMH (0.9 % NaCl y 0.037 % de EDTA, pH 6.5) durante el mismo tiempo; los grupos se sacrificaron 16, 20 y 30 semanas posteriormente al inicio del tratamiento (Figura 9).

5.4 Evaluación de la luteína como agente quimioprotector

Se utilizaron 140 ratas Sprague-Dawley de cuatro semanas de edad. Después de una semana de aclimatación y monitoreo, las ratas fueron aleatoriamente divididas en siete grupos de tratamiento, los cuales son descritos en el cuadro 5.

Con el fin de evaluar en qué etapa del desarrollo del cáncer la luteína juega su papel como quimioprotector, se trabajó con tres grupos en los cuales este carotenoide se incorporó a la dieta, por un periodo de ocho semanas, antes, durante y después del tratamiento con 1,2-DMH.

La luteína se adicionó en 0.002 % ésta se suspendió en aceite de cártamo sin antioxidante y posteriormente se impregnaron las croquetas de la dieta con dicha mezcla.

Para esta segunda etapa el tiempo de sacrificio fue a las 20 semanas de iniciado cada tratamiento.

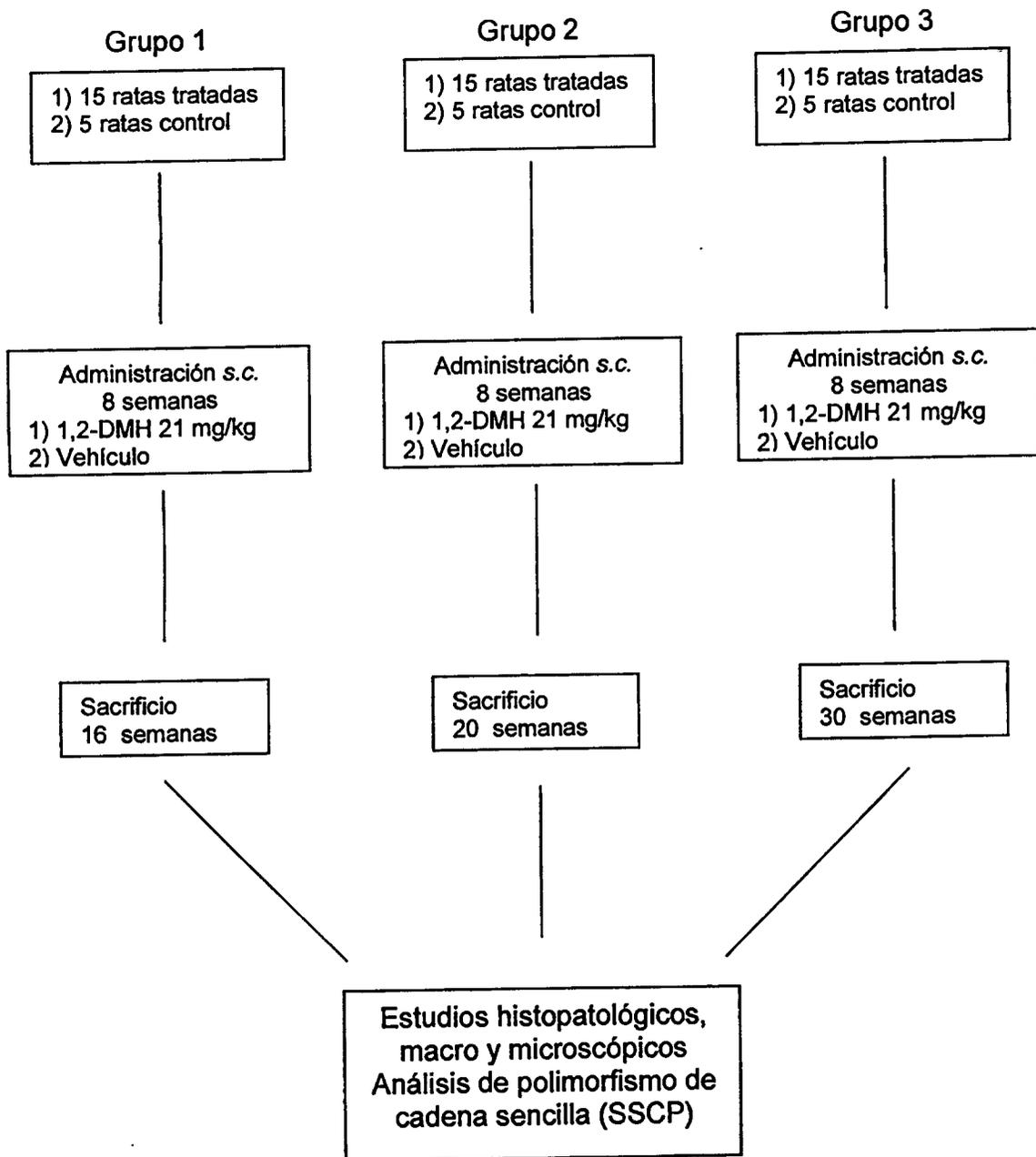


Figura 9. Diagrama del modelo de carcinogénesis de colon: 1ª etapa

Cuadro 5. Clasificación de los grupos experimentales durante el tratamiento quimioprotector con luteína: 2ª etapa

Grupo	n	DMH	Luteína	Tratamiento
1	15	x	x	Control, aceite incorporado a la dieta 8 semanas
2	20	x	x	Control, vehículo de 1,2-DMH administrado 8 semanas
3	15	✓	x	Control positivo, 1,2-DMH administrada 8 semanas
4	22	x	✓	Control, luteína incorporada a la dieta 16 semanas
5	22	✓	✓	Incorporación de la luteína a la dieta durante 8 semanas, antes de la administración de 1,2-DMH
6	22	✓	✓	Incorporación de la luteína a la dieta durante 8 semanas, al mismo tiempo que la administración de 1,2-DMH
7	22	✓	✓	Incorporación de la luteína a la dieta durante 8 semanas, después de la administración de 1,2-DMH

n= número de ratas por grupo

Todos los grupos se sacrificaron a las 20 semanas de iniciados los tratamientos.

5.5 Sacrificio y toma de muestras de colon

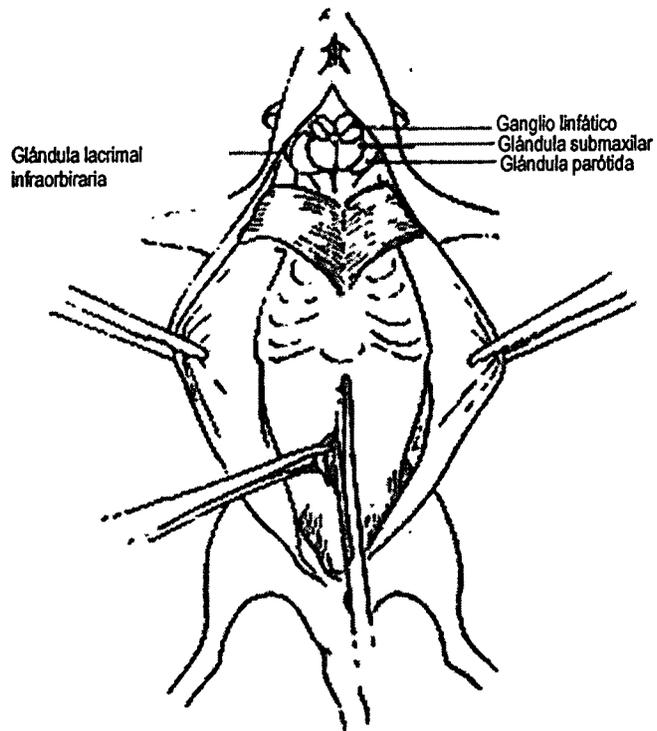
Después de 24 h de ayuno se sacrificó a las ratas una vez que se comprobó que había pérdida de reflejo parpebral debido al efecto de la anestesia. Se fijó al animal sobre una tabla de disección en posición de decúbito supino y se realizó una incisión en la línea media ventral para retirar la piel, durante toda la disección se procuró mantener vivo el animal el mayor tiempo posible así como húmeda la capa muscular mediante el uso de una gasa empapada en solución salina fría.

Para tener acceso a las vísceras abdominales se procedió a realizar una incisión sobre la línea alba del plano muscular a lo largo de todo el abdomen hasta unos centímetros por encima de los orificios genitales, a continuación se efectuaron cortes transversales hacia la derecha y hacia la izquierda a nivel de la caja torácica y de los miembros posteriores, tras separar las dos partes de la incisión se extirpó el intestino grueso desde ciego hasta recto (Figura 10).

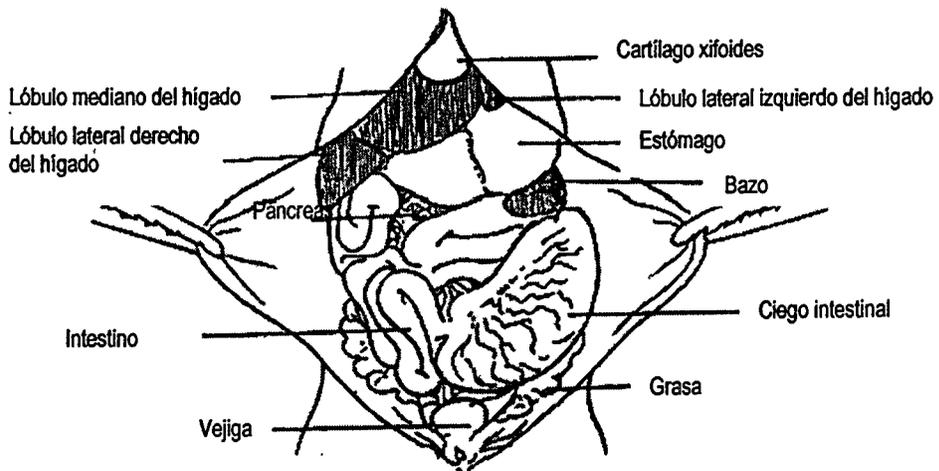
El intestino grueso se cortó longitudinalmente y se lavó con solución fisiológica salina fría para retirar algunos restos de heces que aún se encontraban, una vez limpio se extendió sobre corcho y se identificaron los tumores tomando en cuenta la zona donde se localizaban: colon proximal (en la que se encuentra el ciego), medio o distal (donde se incluye al recto).

Cada tumor fue cortado y congelado con nitrógeno líquido y se mantuvo a -70 °C hasta la extracción de DNA. De la misma forma se manejó el tejido de las ratas control.

Algunos de los tumores fueron fijados en una solución de formaldehído al 10 % durante 12 h para su posterior inmersión en parafina, microdisección y tinción con hematoxilina-eosina para el análisis histopatológico.



(a)



(b)

Figura 10. a - Apertura de la cavidad abdominal de la rata
b - Aparato digestivo de la rata

Las muestras de la primera y segunda etapas del proyecto se sometieron a los siguientes procesos y análisis.

5.6 Extracción y cuantificación de DNA

Se extrajo el DNA genómico de cada uno de los tumores y del tejido de las ratas control mediante las técnicas estándar de digestión con proteinasa K seguido de extracción con fenol-cloroformo y su posterior precipitación con etanol (Maniatis *et al.*, 1990, Ausubel *et al.*, 1992).

El intervalo de peso del tejido procesado se encontró entre 0.025 g y 0.050 g, éste se colocó en microtubos, se le adicionaron 750 µl de amortiguador de digestión (Apéndice 1) para poder homogeneizarlo mecánicamente con un émbolo de teflón y después se incubó durante 18 h en baño María a 50 °C. Posteriormente se le adicionaron 750 µl de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó por inversión 2 min, se centrifugó a 13000 g durante 10 min a 4 °C, se separó la fase acuosa, la cual se transfirió a un tubo nuevo, y se le repitió la extracción con fenol-cloroformo. Ya obtenida la fase acuosa se le agregaron dos volúmenes de alcohol etílico y un décimo de volumen de acetato de potasio 3 M, se invirtió suavemente hasta que se visualizó la formación de un agregado blancuzco y se centrifugó para precipitarlo a 12000 g durante 5 min a 4 °C. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70 % y finalmente se disolvió en 100 µl del amortiguador TE a pH 8.0 (Apéndice 2).

Se hizo una dilución del DNA obtenido en 1 ml de agua y se realizó una medición espectrofotométrica a 260 nm y 280 nm para saber la concentración y el grado de pureza del mismo mediante la relación A_{260}/A_{280} .

La concentración del DNA se obtuvo realizando la siguiente operación:

$$[\text{DNA}] \mu\text{g/ml} = (\text{D.O. } 260 \text{ nm}) (50) (\text{dilución})$$

donde el factor de 50 se debe a que una unidad de D.O. a 260 nm corresponden a 50 µg/ml de DNA de doble cadena.

De igual manera, para verificar la integridad del DNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.0 %, usando como amortiguador TAE 1X (Apéndice 3) a voltaje constante (60 V) durante 1.5 h. Se cargaron 100 ng de cada muestra por carril y se usaron marcadores de 1 Kb (Invitrogene). El DNA de los geles se visualizó con luz UV después de haber sido teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

5.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para determinar si en los tumores detectados se presentaban mutaciones en los genes de interés, *K-ras* y *β-catenina*, se amplificaron fragmentos de los mismos donde se han reportado transiciones de bases. En la amplificación de *K-ras* se incluyó a los codones 12 y 13 (Endo *et al.*, 2001), para *β-catenina* se amplificaron regiones correspondientes a los exones 2 y 3 que incluyen a los codones 1 a 57 (McLellan *et al.*, 1991; Dashwood *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2000). Las condiciones usadas para ambas reacciones de amplificación son descritas en el cuadro 6.

Para comprobar que se había obtenido el producto de PCR esperado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % a voltaje constante (50 V) durante 1 h. De cada muestra se cargaron 100 ng por carril, previa cuantificación a 260 nm; y se utilizó amortiguador TAE 1X pH 8.0. Para verificar la longitud se cargaron marcadores de 50 pb (Invitrogene).

Después de la tinción con bromuro de etidio 0.5 µg/ml el gel se expuso a luz UV para la visualización del producto.

La fotodocumentación de los geles de agarosa se realizó mediante el programa de análisis de imágenes de Kodak 1D versión 5.4 y la cámara digital EDAS 290.

5.8 Análisis del polimorfismo de cadena sencilla (SSCP)

De cada producto de PCR, tanto de los tumores como de los controles, se llevó a cabo el análisis de polimorfismo de cadena sencilla.

Cuadro 6. Condiciones para la amplificación de los fragmentos de los genes *K-ras* y *β-catenina* utilizando la técnica de PCR

<u><i>K-ras</i></u>			
<u>Oligonucleótidos:</u>			
Sentido 1AKforward			
5' -TAAGGCCTGCTGAAAATG- 3'			
Antisentido 1AKreverse			
5' -ATGACTGCCACCCTTTAC- 3'			
<u>Concentraciones:</u>		<u>Condiciones:</u>	
	[final]	Temperatura	Tiempo
Templado de DNA	50 ng	1 ciclo	
dNTP's	100 μM	95 ° C	5 min
Oligonucleótidos			
1AKforward	8 pmolas	30 ciclos	
1AKreverse	8 pmolas	94 ° C desnaturalización	1 min
Buffer PCR	1 X	57 ° C alineamiento	1 min
MgCl ₂	1.5 mM	72° C elongación	1 min
Taq polimerasa	0.5 U		
<u><i>β-catenina</i></u>			
<u>Oligonucleótidos:</u>			
Sentido bcatforward			
5' -GCTGACGTCGTA CT CAGGCA- 3'			
Antisentido bcatreverse			
5' -TCCACATCCTCTTCCTCAGG- 3'			
<u>Concentraciones:</u>		<u>Condiciones:</u>	
	[final]	Temperatura	Tiempo
Templado de DNA	50 ng	1 ciclo	
dNTP's	100 μM	94 ° C	5 min
Oligonucleótidos			
bcatforward	8 pmolas	30 ciclos	
Bcatreverse	8 pmolas	94 ° C desnaturalización	45 seg
Buffer PCR	1 X	57 ° C alineamiento	45 seg
MgCl ₂	1.5 mM	72 ° C elongación	2 min
Taq polimerasa	0.5 U		

La preparación de la muestra se realizó como lo describen Yamada y col. (2000): se colocaron por volúmenes iguales producto de PCR y amortiguador SSCP (Apéndice 4) y la mitad de este volumen del colorante de formamida (Apéndice 5). Dicha mezcla se agitó y se desnaturalizó calentando a 90 °C durante 3 min e inmediatamente se enfrió en hielo, posteriormente se cargó en un gel no desnaturalizante de acrilamida al 10 % el cual contenía 5 % de glicerol, éste se corrió a 100 V durante 9 h a 4 °C en buffer TBE 1X pH 8 (Apéndice 6). Después de la tinción con plata (Apéndice 7) se observó si había cambios en el patrón de bandeo de las muestras de tumor comparándolas con las muestras control.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El agrupamiento de las ratas se realizó aleatoriamente tanto en la primera como en la segunda parte de este trabajo.

Para el análisis de los datos se llevó a cabo una comparación de medias utilizando las pruebas estadísticas de Tukey o Dunnett.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Inducción de tumores en el colon de ratas Sprague-Dawley

Dentro de la investigación del cáncer es importante la implementación de modelos animales ya que éstos permiten probar y definir el papel de los factores exógenos y endógenos en el desarrollo y prevención de esta enfermedad crónico-degenerativa. Por ello, dentro de esta investigación fue un objetivo establecer un modelo animal de carcinogénesis de colon utilizando ratas Sprague-Dawley, así como determinar si la dosis de 21 mg/kg de 1,2-DMH era suficiente para el desarrollo de tumores en los diferentes tiempos probados.

A lo largo del experimento y hasta el término del mismo ninguna de las ratas presentó sangrado rectal o en heces así como tampoco una disminución de peso, esto parece presentarse sólo cuando las dosis de 1-2, DMH son mayores a la usada aquí (21 mg/kg). En un estudio realizado por Jackson y col. (1999) se observó una correlación inversa entre la sobrevivencia de los animales y la dosis (34, 68 y 136 mg/kg) siendo más afectadas aquellas ratas donde se administró la dosis más alta al mostrar sangrado rectal y quistes en el ano. En ningún otro reporte que se haya consultado en los que se usaron dosis iguales o menores (hasta 12 mg/kg) a las de este experimento se reportó muerte o señales patológicas.

El número de tumores por grupo se incrementó a tiempos más prolongados desde iniciado el experimento (Figura 11), siendo muy notable el cambio de la semana 16 a la 20 donde se alcanzó un máximo de 31 tumores manteniéndose igual hasta la semana 30. La misma tendencia fue observada en la incidencia, entendida como el número de ratas con tumores por grupo, ya que para la semana 16 el 60 % de las ratas presentaron tumores aumentando éstos a un 73 % para los otros dos tiempos restantes. Las ratas del grupo control negativo no presentaron ninguna alteración.

Un resultado muy similar al de este trabajo es el reportado por Corpet y Taché (2002b), en el cual se obtuvo un promedio de incidencia de 74 % de doce estudios

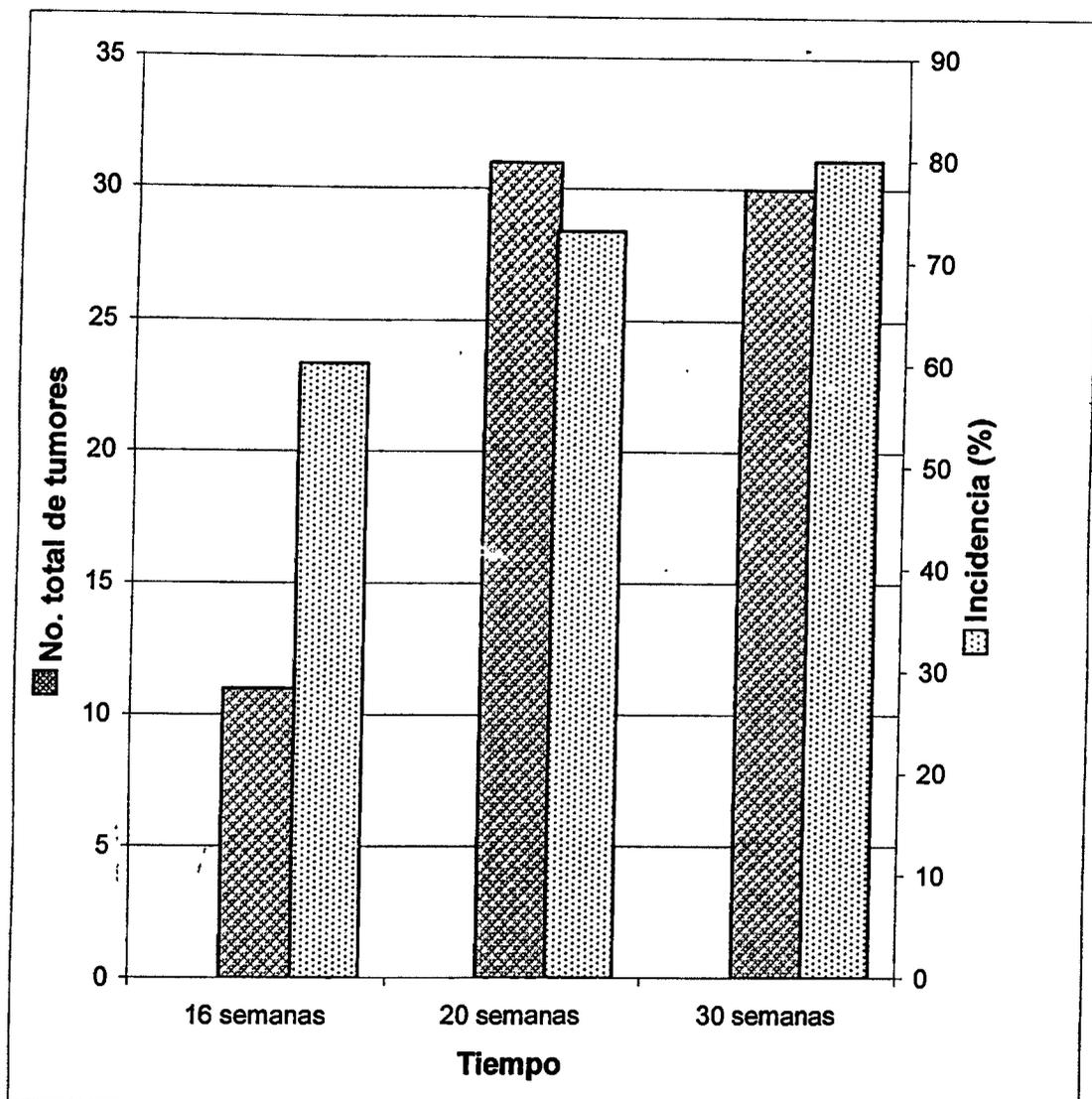


Figura 11. Incidencia y número total de tumores en el colon de las ratas tratadas con 1,2-DMH y sacrificadas a diferentes tiempos de iniciado el experimento.

en ratas F344 en los que se usaron dosis acumulativas de 1,2-DMH de 160 a 400 mg/kg administradas en una o 20 inyecciones y haciendo el sacrificio 44 semanas después de iniciado el tratamiento. Cabe mencionar que Viñas-Salas y col. (1992) usando una dosis de 21 mg/kg (1,2-DMH), sobre ratas Sprague-Dawley, durante 19 semanas vía subcutánea (s.c.) encontraron un 77 % de incidencia al analizar el colon de las ratas 5 semanas después de haber dado término a las administraciones. De igual forma Cameron y col. (1996) obtuvieron un 79 % de incidencia al inducir cáncer en ratas de la misma especie inyectando 12 mg/kg del carcinógeno (s.c.) por 8 semanas y realizando el sacrificio 32 semanas después.

Con la finalidad de definir el tiempo de sacrificio conveniente para llevar a cabo la segunda parte del estudio (evaluación de la quimioprotección de luteína), teniendo en cuenta el número de tumores como factor de medición, se realizó un análisis un poco más detallado de la incidencia. En la figura 12 se aprecia que a las 16 semanas el 80 % de las ratas presentó cero o un tumor, no así para las semanas 20 y 30 donde el 66 % tuvieron entre dos y cuatro tumores indicando con esto que era recomendable tener por término del experimento alguno de estos dos tiempos. No obstante para elegir cuál de ellos era el más adecuado se hizo una comparación de medias (Cuadro 7), el resultado mostró diferencia significativa entre la semana 20 y la 30. Por lo que se decidió tomar las primeras 20 semanas como suficientes para el desarrollo de tumores.

Es importante considerar que en estudios anteriormente realizados la inducción de cáncer de colon contemplaban entre 30 y 60 semanas con una tasa tumoral de 75-90 % (Kanazawa *et al.*, 1975; Davies y Rumsby, 1998; Endo *et al.*, 2001; Corpet y Taché, 2002b), sin embargo, en este proyecto en 20 semanas se tiene un porcentaje de tumores aceptable para establecer que la dosis de 21 mg/kg de 1,2-DMH es óptima para inducir cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley, definiendo con ello un modelo de carcinogénesis de colon del cual se obtiene un número suficiente de tumores (muestra) a través de los cuales es posible realizar diversas determinaciones relacionadas con el desarrollo y prevención de esta patología.

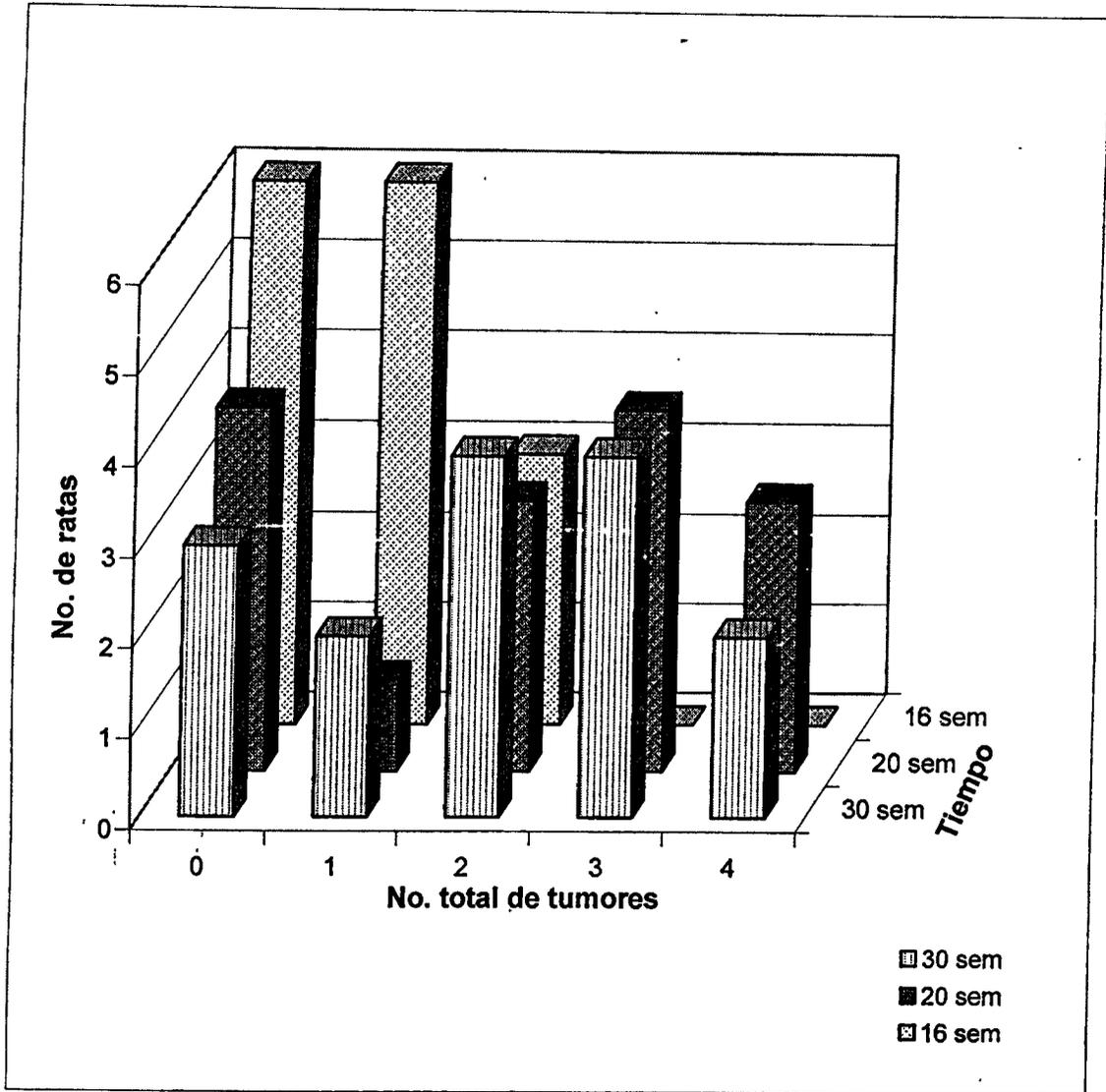


Figura 12. Número de tumores desarrollados por rata tratadas con 1,2-DMH a los diferentes tiempos de sacrificio

Cuadro 7. Incidencia y número total de tumores desarrollados en el colon de ratas tratadas con 1,2-DMH y sacrificadas a diferentes tiempos

Semana de sacrificio	Número de tumores *	Número de ratas con tumor Incidencia (%)
16	0.80±0.20 ^a	9/15 (60)
20	2.06±0.74	11/15 (73)
30	2.00±0.85 ^b	12/15 (80)

* Cada valor representa la media ± la desviación estándar (DE) de los tumores encontrados en 15 ratas tratadas con 1,2-DMH

Letras diferentes expresan diferencia estadística significativa con $\alpha = 0.05$ utilizando la prueba estadística de Tukey

7.2 Distribución de los tumores y características histológicas de las zonas del colon

Las regiones en el colon de ratas no se definen tan fácilmente como ocurre en el de los humanos: colon ascendente (proximal), medio y descendente (distal). El colon proximal de la rata fue tomado como la región poco estriada de aproximadamente 5.5-6.5 cm a partir del ciego, esta parte es seguida por una zona media donde el epitelio se presenta ondulado y el distal como la última parte del colon 1 cm antes de llegar al ano.

En un reporte de Jackson y col. (1999) informaron que el 79 % de los tumores inducidos en el colon de ratas Sprague-Dawley con 1,2-DMH se localizaron en la parte distal. Sin embargo, algunos se observan en la parte media (21 %) no presentándose en la parte proximal. Lo anterior es muy similar a lo obtenido por Cameron y col. (1996) al encontrar que cerca de la mitad de la población de ratas tratadas con 1,2-DMH desarrollaron tumores en la parte distal y sólo un porcentaje pequeño en la parte proximal (18.3 %). Tales investigaciones apoyan lo encontrado en nuestro trabajo como se muestra en la figura 13 en donde es apreciable que el número de tumores asciende de la zona proximal a la distal. Y es en esta última donde existe una cifra mayor entre las semanas 16 y 20, no así para la semana 30 en la que hay un ligero incremento en el número de tumores en la parte media. No obstante, el análisis histopatológico realizado en los diferentes tiempos de sacrificio a segmentos de epitelio de las tres zonas que macroscópicamente se describía como sano mostró resultados diferentes. Reveló que para la parte media en los dos primeros tiempos (16 y 20 semanas) la mayoría de las muestras tuvieron una displasia leve habiendo una notable transición del 34 % de ellas a una displasia alta (Cuadro 8) lo que de alguna manera justifica el aumento de tumores en esta zona durante el tiempo más prolongado de sacrificio.

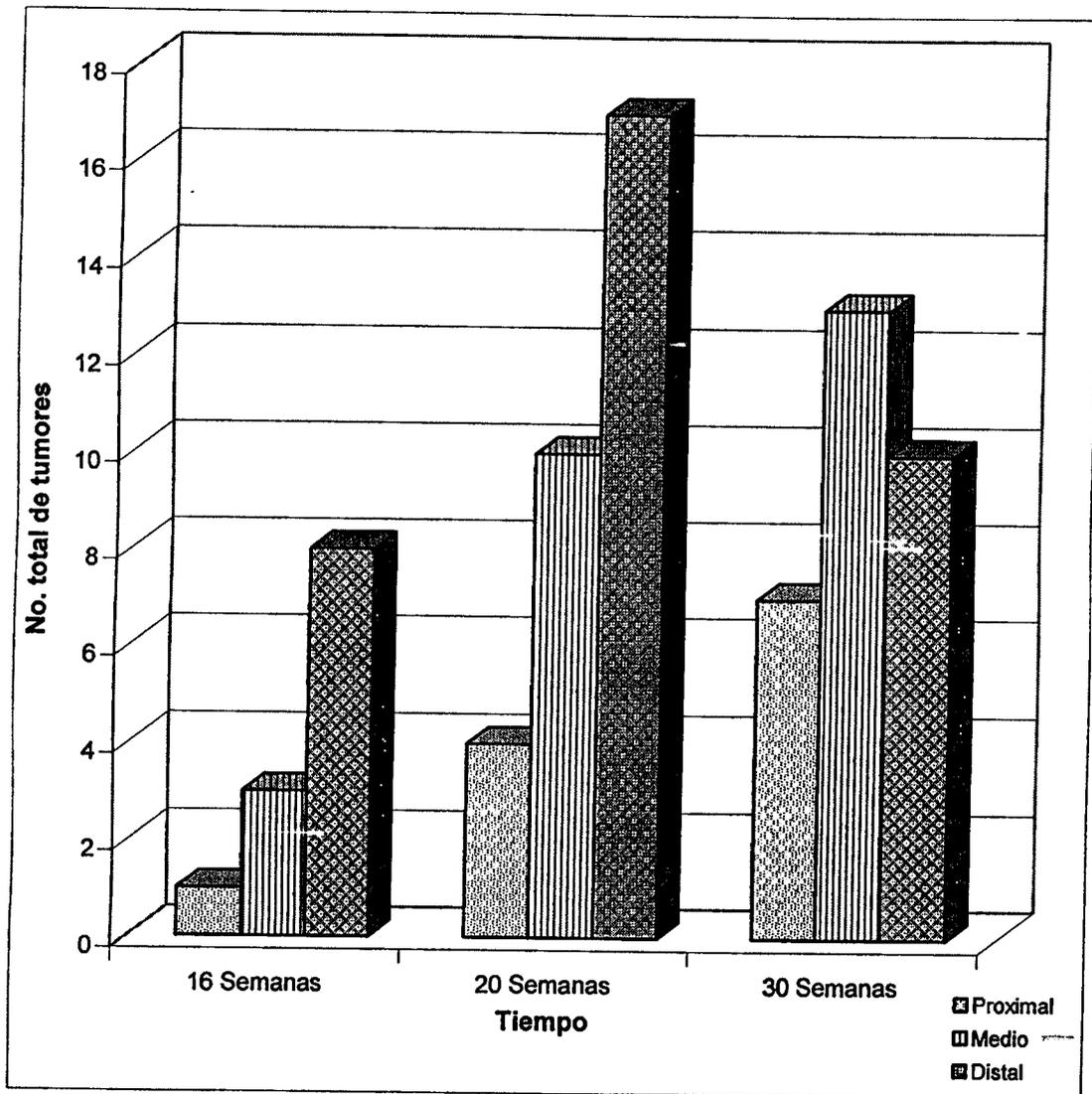


Figura 13. Número de tumores en las diferentes regiones del colon de ratas tratadas con 1,2-DMH y sacrificadas a diferentes tiempos de sacrificio.

Cuadro 8. Grado de displasia presentado en el epitelio en las tres regiones del colon de las ratas tratadas con 1,2-DMH en los diferentes tiempos de sacrificio

Semana de sacrificio	Región	Grado de displasia	
		Incidencia (%)	
		Leve	Alta
16	Proximal	6/15 (40)	1/15 (7)
	Medio	6/15 (40)	0/15 (0)
	Distal	7/15 (47)	1/15 (7)
20	Proximal	10/15 (67)	4/15 (27)
	Medio	15/15 (100)	0/15 (0)
	Distal	9/15 (60)	2/15 (13)
30	Proximal	7/15 (47)	7/15 (47)
	Medio	10/15 (67)	5/15 (33)
	Distal	8/15 (53)	4/15 (27)

Es evidente, por lo anterior que las células encontradas en la zona media-distal del colon son más susceptibles a las ubicadas en la zona proximal. Una de las razones por lo que esto sucede puede deberse a que bajo condiciones normales del tejido la proliferación de las células del colon ascendente es más lenta a la que presentan las células del colon descendente permitiendo que esta zona del intestino grueso sea más vulnerable a los agentes mutagénicos. Dicha proliferación se ve incrementada, tanto en las células del colon distal como del proximal de ratas cuando se administra 1,2-DMH vía subcutánea a estos roedores (Ma *et al.*, 2002).

Teniendo el antecedente acerca de las mutaciones que causa la 1,2-DMH sobre genes relacionados con proliferación y muerte celular programada puede decirse que el equilibrio de recambio que se mantiene en las criptas del colon se ve alterado, ya que las células mutadas debido a su capacidad de ignorar señales que promueven diferenciación y a la evasión de apoptosis no sufren un desprendimiento por lo que la acumulación de las mismas, en el epitelio mucoso del colon, forman pólipos adenomatosos que bien pueden transformarse en carcinomas mediante la alteración de otros genes.

Otro punto a considerar es el de los conjugados glucorónicos producidos del metabolismo de la 1,2-DMH en el hígado, que vía entero-hepática llegan al colon y son reactivados, por β -glucoronidasas, en carcinógenos últimos a este respecto se sabe que en el colon izquierdo (distal) hay mayor cantidad de esta enzima que en el colon derecho (ciego) por lo tanto un aumento en el metabolismo del glucorónido (Celik *et al.*, 1983).

Similares observaciones, respecto a la distribución de tumores a lo largo del colon, fueron hechas por Davies y Rumsby (1998) al estudiar la distribución de FCAs ya que éstas no se distribuyen al azar en el colon sino lo hacen en grupos y en áreas específicas, principalmente en la distal. Existen otros reportes (Barkla *et al.*, 1977; Viñas-Salas, 1992; Bird y Good, 2000) en los que se exponen resultados muy parecidos.

Algunos autores mencionan que no existen una correlación directa entre la localización y número de FCA y la ocurrencia de adenocarcinomas. Si no que más bien esto es debido a la presencia de agregados de nódulos linfoides (ANL) que son característicos en el colon de ratas que no han sido expuesta a carcinógenos y que son encontrados consistentemente en tres sitios específicos entre la parte media y distal del colon de ratas Sprague-Dawley (Shimamoto y Vollmer, 1987, Carter *et al.*, 1994, Cameron *et al.*, 1996).

En la figura 14a se puede observar la arquitectura tubular que guardan las fosas cripticas que conforman la mucosa normal de ratas. Cuando se presenta grado de displasia leve (Figura 14b) las criptas pierden su organización y disposición tubular, y una vez que se alcanza un grado de displasia elevada se presentan núcleos hipercromáticos (mayor contenido de DNA y por tanto se tiñen más). Además de que el tamaño del núcleo es desproporcionado al tamaño de la célula (coeficiente núcleo:citoplasma 1:4 a 1:6 en lugar de 1:1) (Figura 14c).

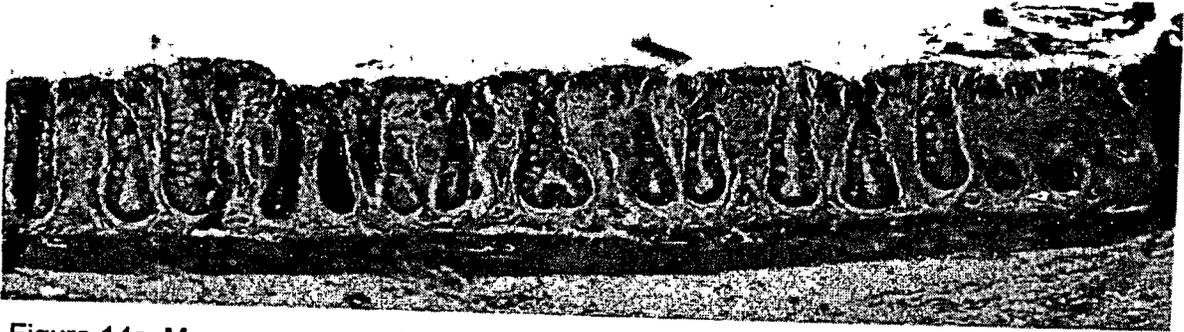


Figura 14a. Mucosa normal del colon de rata del grupo control

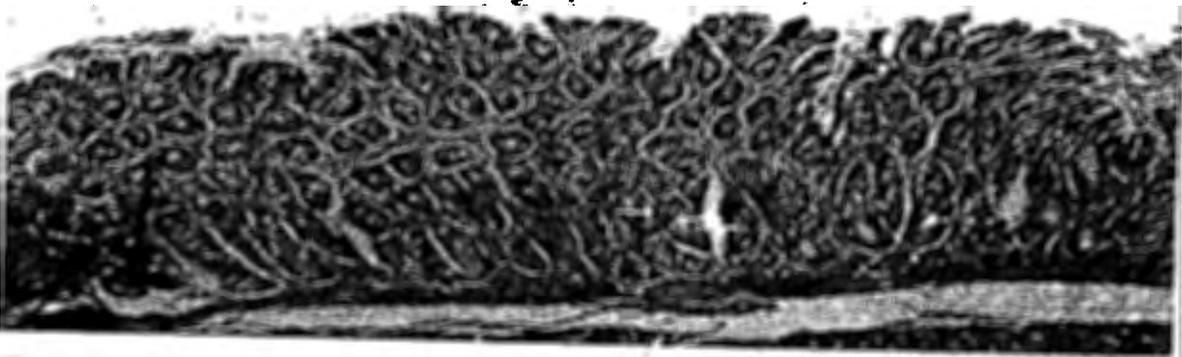


Figura 14b. Mucosa del colon de rata tratada con 1,2-DMH que presenta displasia leve



Figura 14c. Mucosa del colon de rata tratada con 1,2-DMH que presenta displasia elevada

Fotomicrografías del colon de ratas sacrificadas a las 20 semanas de iniciado el tratamiento con 1,2-DMH. La tinción realizada fue hematoxilina-eosina y las fotomicrografías se tomaron con una amplificación de 100 X.

*Las flechas señalan núcleos hiper cromáticos y desproporcionados al tamaño de las células que los contienen.

7.3 Detección de mutaciones en el proceso de carcinogénesis mediante SSCP

El análisis de polimorfismo de cadena sencilla (SSCP) es una de las técnicas más ampliamente usada en la búsqueda de mutaciones que pueden presentarse en un segmento amplificado de DNA que va desde los 175 a 250 pb. El principio de esta técnica se encuentra basado en el hecho de que la movilidad electroforética de las cadenas simples de DNA, bajo condiciones no desnaturizantes, adoptan diversas conformaciones dependiendo de las asociaciones intramoleculares que en ellas se den debido a las áreas de autocomplementariedad en la misma cadena; por lo que cualquier cambio en la secuencia que modifique las regiones de autocomplementariedad es probable que altere la configuración y produzca un cambio detectable en la movilidad.

El DNA se aisló tanto de los tumores como del epitelio de colon de ratas control (figura 15). Se amplificó por PCR las regiones de interés y se obtuvieron dos productos correspondientes a los segmentos de los genes *K-ras* (175 pb) y *β-catenina* (211pb) (Figura 16).

La detección de las posibles mutaciones se llevó a cabo mediante el análisis de SSCP de los productos de PCR de ambos genes para los tumores encontrados en las tres regiones del colon de las ratas tratadas con 1,2-DMH.

En la figura 17 se muestra uno de los geles que presenta el patrón de bandeo obtenido para *K-ras*, en que se observan claramente dos bandas correspondientes a las cadenas complementarias de ADN (señaladas con la letra *a*) tanto para las muestras control como para las de tumores, una tercer banda (*b*) se presenta para estos últimos lo que hace suponer la presencia de mutación. Esta posible mutación se halló en alrededor del 50 % de los tumores tanto de la región proximal, como media y distal (Cuadro 9). Investigaciones acerca de cáncer de colon en ratas, inducido con azoximetano (AOM) o 1,2-DMH, demostraron que las mutaciones en *K-ras* fueron tan frecuentes como en los tumores de colon en humanos, entre 40 y 50 % (Bos, 1989; Erdman *et al.*, 1997; Endo *et al.*, 2001). Jacoby y col. (1991) reportan haber encontrado que un 43 % de

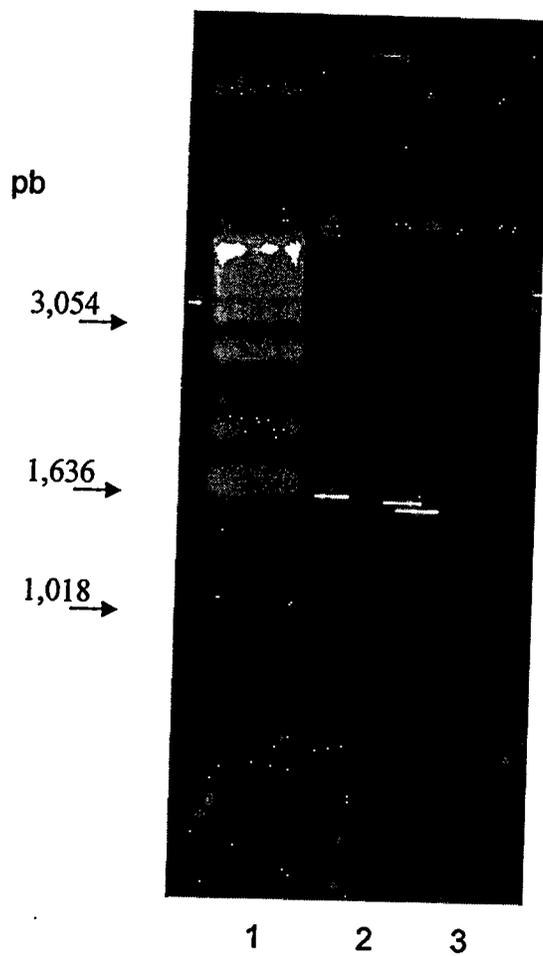


Figura 15. DNA de muestras de colon de rata. 1. Marcadores de 1 Kb, 2. DNA de epitelio normal de colon, 3. DNA de tumor de colon

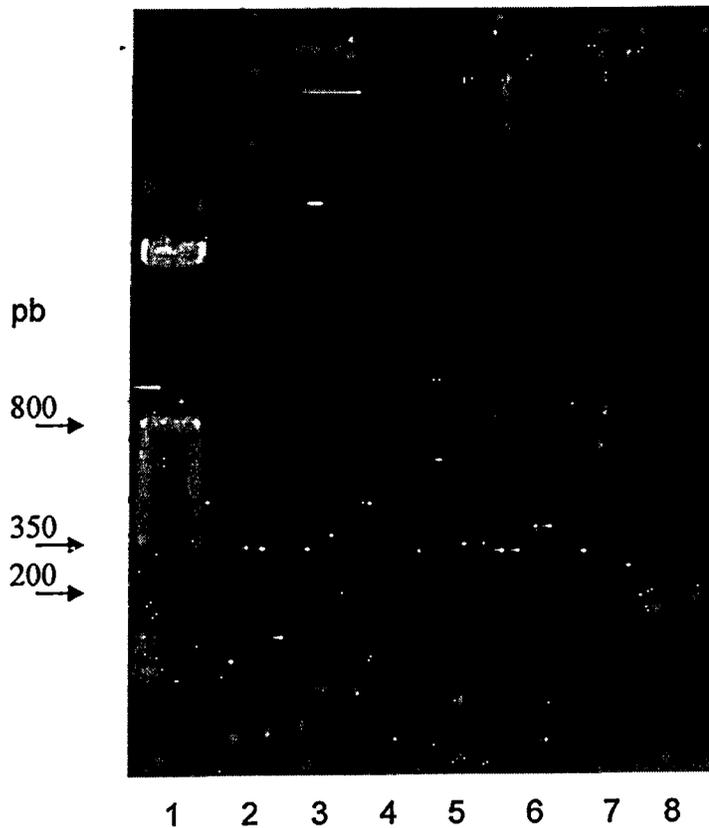


Figura 16. Productos de PCR para fragmentos de genes *K-ras* y *β-catenina*.

1. Marcadores de 50 pb, 2. Control negativo para *β-catenina*. 3 y 4. Producto *β-catenina* de 211 pb, 5. Control negativo para *K-ras*, 6-8. Producto para *K-ras* de 175 pb.

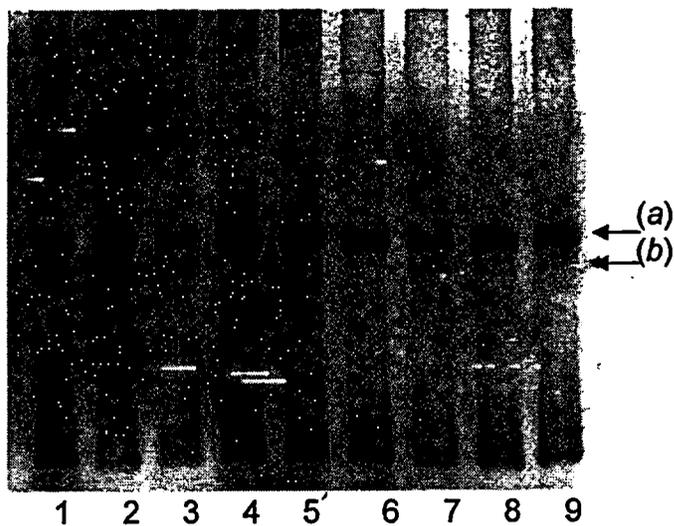


Figura 17. PCR-SSCP para el segmento amplificado del gen *K-ras*. 1-3. Control, 4-9. Muestras de colon de ratas tratadas con 1,2-DMH
 a – Bandas correspondientes a las cadenas complementarias de DNA del fragmento de *K-ras* amplificado
 b – Banda correspondiente a una posible mutación

Cuadro 9. Frecuencia de los cambios que se presentan en el patrón de bandeo en los genes *K-ras* y β -*catenina* según el análisis SSCP

Zonas	<i>K-ras</i> (%) <i>b</i>	β - <i>catenina</i> (%) <i>a</i>
Proximal	5/9 (55)	4/11 (37)
Medio	3/6 (50)	2/7 (29)
Distal	6/11 (54)	3/6 (50)

Los números en el paréntesis corresponden al porcentaje, basado en el número de muestras analizadas, en que se presentaron las bandas *b* (en el caso de *K-ras*) y *a* (para el caso de β -*catenina*) como posibles mutaciones

los tumores del colon proximal y 70 % de la distal tuvieron mutación en el gen, en ratas, mientras que en humanos no existe una diferencia significativa en los porcentajes presentados para estas dos regiones ya que son 41 % y 54 % respectivamente (Law *et al.*, 1989).

Es conocido que las mutaciones en este gen se dan en etapas tempranas de la formación de adenomas y que, además se presentan en mucosa histopatológicamente normal. Por otra parte, se ha comprobado que las mutaciones en el gen *K-ras*, debidas a la 1,2-DMH, son exclusivamente transiciones de G → A de los codones 12 ó 13 en el segundo nucleótido siendo diferente para los tumores de colon esporádicos en humanos pues las mutaciones en *K-ras* exhiben sustituciones por A, T o C ya sea en el primer o segundo nucleótido del codón 12 únicamente. La naturaleza selectiva de esta mutación puede ser debida a las diferencias en accesibilidad de los residuos de guanina a la 1,2-DMH, como se ha visto para otros agentes que causan metilación en el oncogen *ras* (Mitra *et al.*, 1989). O alternativamente, a la diferencia en la velocidad de reparación de estos aductos así como también a otros probables efectos (Topal, 1988).

Respecto al análisis de SSCP para β -*catenina* (Figura 18 y Cuadro 9) se visualizó solamente cambio de movilidad en una de las bandas (a) indicativo de posible mutación. La frecuencia de movilidad fue del 37 y 50 %, para los tumores de la parte proximal y distal respectivamente y sólo del 19 % para la zona media. Es conocido que en los humanos el 50 % de los tumores de colon presentan mutación en β -*catenina*. El porcentaje de tumores, reportados en la literatura, que muestran mutaciones para β -*catenina* es muy variable. En un estudio similar al aquí presentado, el 36 % de los tumores dió lugar a una mutación puntual (C → T) en el exón 3, la gran mayoría de éstas (99 %) en el codon 41 (Koesters *et al.*, 2001). En una investigación presentada por Yamada y col. (2003) 56.8 % de los tumores dieron lugar a la mutación, y en este caso se observó en los codones 32-34, 37, 41 y 45 no mostrando preferencia por ninguno de ellos. Blum y col. (2001) encontraron cambios en los mismos codones, lo que provoca la sustitución de un



Figura 18. PCR-SSCP para el segmento amplificado del gen β -*catenina*. 1-2. Control, 3-7. Muestras de colon de ratas tratadas con 1,2-DMH.
a – Banda correspondiente a una posible mutación

residuo de serina por uno de treonina dentro de los sitios reguladores de fosforilación de la proteína.

Algo interesante es lo que informan Samowitz y col. (1999) acerca de la presencia de mutaciones de β -catenina en pequeños adenomas, al igual que los cambios en APC, pueden ser tempranas y tal vez iniciar los eventos neoplásicos en el colon. El hecho de que las mutaciones en β -catenina se den en pequeños adenomas más que en adenocarcinomas sugiere que los adenomas iniciados por cambio en este gen no son tan agresivos biológicamente como los iniciados por mutaciones en APC y que este gen no sólo pudiera participar en la degradación de β -catenina.

En las figuras 17 y 18 que representan el análisis de SSCP tanto de *K-ras* como de β -catenina es posible apreciar otras bandas débilmente teñidas en la parte superior de las ya señaladas como a o b tanto en las muestras control como la de tumores estas podrían tratarse de artefactos propios de la técnica. Pues, de manera general, un segmento de DNA no mutado presenta dos bandas (correspondientes a las cadenas complementarias); similarmente un mutante homocigoto generará dos bandas sólo que éstas migrarán de forma diferente a las que no presentan mutación. En caso de tratarse de un mutante heterocigoto, cuatro bandas serán las observadas: dos que tendrán una movilidad igual al del ADN no mutado y otras dos con movilidad diferente. También es posible el que se presenten tres bandas, esto debido a que una de las cadenas habrá sufrido mutación no así la complementaria.

Son varios los factores que influyen dentro de la técnica de SSCP que pueden afectar la movilidad de las cadenas, entre ellos se encuentran: la relación de entrecruzamiento de la matriz formada en el gel, el amortiguador utilizado, la inclusión de aditivos en la matriz del gel como el glicerol y sacarosa, y el más importante de todos, la temperatura. Es este último factor el que parece regir la conformación que adoptan las cadenas en el momento de realizar un análisis mediante SSCP, prueba de ello es lo reportado por Orita y col. (1989) que al correr geles a diferentes temperaturas de una misma muestras de DNA, de líneas

celulares de melanoma, obtienen patrones de bandeo diferentes en los que se visualizaron dos bandas para algunos geles y en otros tres bandas, donde la de mayor y menor movilidad resultaron ser la misma hebra de DNA sugiriendo con ello que éstas al menos pueden tomar dos diferentes conformaciones moleculares lo que afecta su movilidad y por tanto el patrón de bandeo.

Otros autores (Hongyo *et al.*, 1993; Kucharczyk *et al.*, 2001) sugieren que es necesario optimizar la temperatura para cada segmento que se analiza mediante SSCP, dada la importancia de este factor, esto con el fin de evitar falsos positivos o falsos negativos.

En este punto es preciso hacer hincapié que dado el intervalo de tiempo en el que se efectuó la investigación aquí presentada y a que no fue un objetivo del estudio, no se llevó a cabo la optimización de las condiciones bajo las que se realizaron los análisis de SSCP para cada uno de los segmentos de *K-ras* y β -*catenina*. Además es importante hacer la observación de que los geles aquí presentados son sólo una muestra de varias repeticiones en las que siempre se obtuvieron las bandas que se visualizan en la imagen, ya que al realizar esta técnica se hizo bajo las mismas condiciones de temperatura.

Otra observación que es importante comentar es que se contó con un control negativo en el que no se presentan las bandas *a* y *b* señaladas como indicios de posibles mutaciones en β -*catenina* y *K-ras*, respectivamente.

7.4 Evaluación de la quimioprotección de la luteína

La cantidad de luteína adicionada a la dieta basal de las ratas se eligió de acuerdo a los antecedentes que se tienen de estudios en donde se ha visto que el carotenoide ha presentado efecto quimioprotector. Uno de ellos es el reportado por Kim y col. (1998) en el que se utilizaron 0.05 % para evadir la aparición de FCAs en ratas tratadas con 1,2-DMH. Sin embargo, y tomando en cuenta que una rata de 350 g en promedio consume diariamente de 14 a 17 g de alimento los miligramos de luteína corresponderían a 2.4 mg/kg (mg de luteína por kg de peso corporal), lo que parece demasiado ya que productos que son recomendados para el tratamiento de la degeneración de la mácula a base de luteína se consumen en 0.85 mg/kg. Por lo que se decidió solo adicionar 0.002 % de luteína a la dieta lo cual corresponde a 0.97 mg/kg esto con base a un estudio realizado en cáncer de mama donde se observó que tal cantidad del carotenoide fue la más adecuada para la disminución de tumores en la población de ratas donde se indujeron tales alteraciones (Park *et al.*, 1998).

En la figura 19 es apreciable que el número de tumores para los grupos en que la luteína se adicionó antes y después del tratamiento con 1,2-DMH es menor hasta en aproximadamente 50 % comparado con el grupo control positivo. Mientras que, para el grupo en donde la luteína se adicionó a la dieta al mismo tiempo que se realizó el tratamiento con el carcinógeno, no se obtuvo ninguna quimioprotección ya que el porcentaje de disminución de tumores fue menor al 40 % no existiendo una diferencia estadística significativamente en el número de tumores (Cuadro 10).

Los datos anteriores concuerdan con la investigación realizada por Narisawa y col. (1996) donde obtuvieron un 43 % de disminución de FCAs en ratas a las que se les dieron 0.24 mg de luteína por intubación gástrica después de haber sido tratadas con metilnitrosourea (MNU). Cabe señalar que en el estudio citado fueron probadas dosis mayores de luteína, 6 mg y 1.2 mg, en las cuales sí hubo una quimioprotección pero no tan evidente como con la de 0.24 mg. Otro reporte en

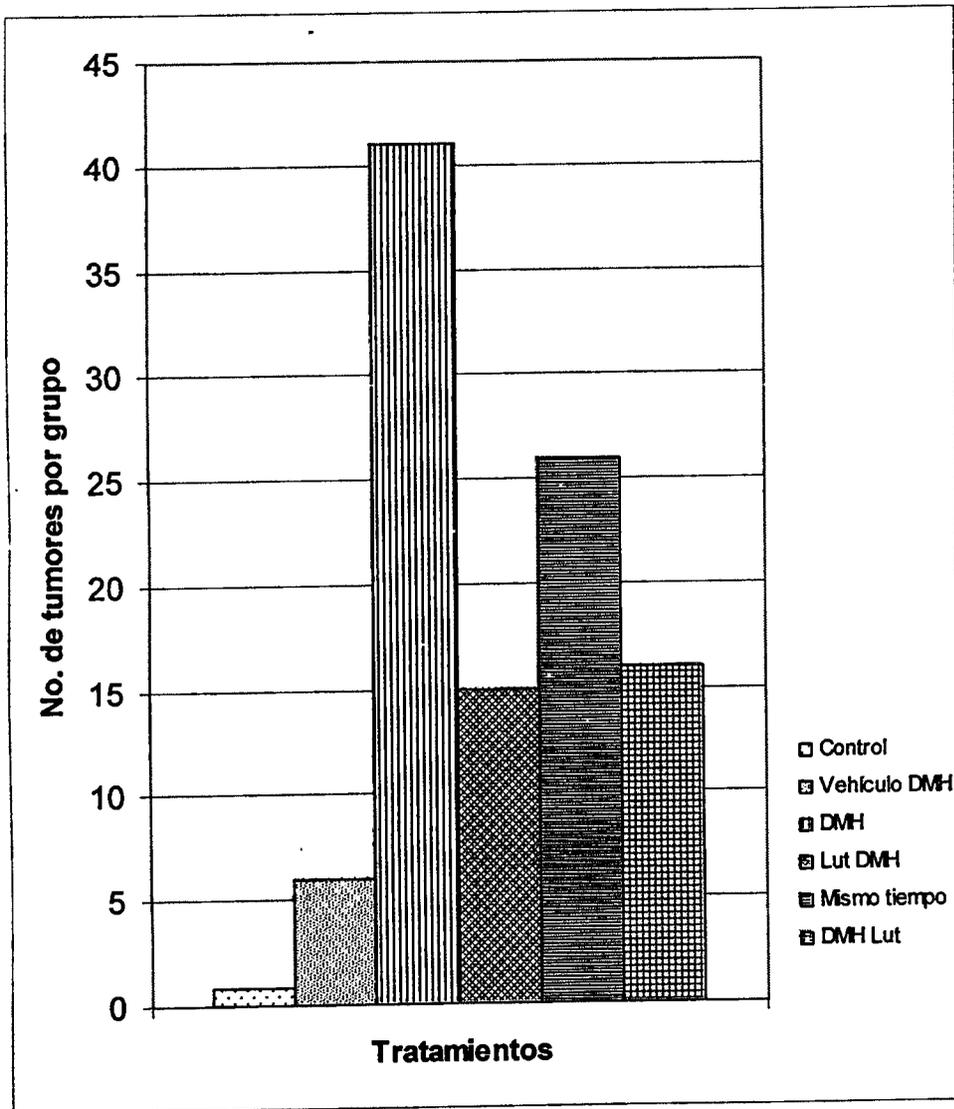


Figura 19. Número de tumores desarrollados en los grupos de ratas sometidos a diferentes tratamientos con luteína

Cuadro 10. Efecto de la luteína sobre el número de tumores en el colon de ratas tratadas con 1,2-DMH

Tratamiento	Número de tumores
Control (aceite)	0.08 ± 0.10
Vehículo 1,2-DMH	0.30 ± 0.47
1,2-DMH (control positivo)	1.34 ± 0.83 ^a
Luteína 8 sem antes de 1,2-DMH	0.64 ± 0.49 ^b
Luteína y 1,2-DMH al mismo tiempo	1.04 ± 0.65 ^a
Luteína 8 sem después de 1,2-DMH	0.72 ± 0.45 ^b

* Cada valor representa la media ± la desviación estándar (DE) de los tumores encontrados en los distintos grupos de tratamiento
 Letras diferentes expresan diferencia estadística significativa con $\alpha = 0.05$ utilizando la prueba estadística de Dunnett

donde se observa que la luteína fue capaz de reducir en 32 % el número de FCAs es el de Kim y col. (1998), al adicionar 0.05 % de luteína en la dieta. Como ya se había mencionado anteriormente, también existe evidencias de que la luteína adicionada a la dieta en concentración del 0.002 % disminuyó en 43 % la incidencia de tumores de mama que se indujeron en ratones, en esta misma investigación dosis de 0.02 % y 0.2 % se adicionaron, no obstante no tuvieron el efecto sobre el número de tumores (Park *et al.*, 1998). Resultados que llevan a sugerir que es más conveniente el uso de bajas cantidades de luteína ya que es en donde se observa una mejor quimioprotección.

Es evidente que la luteína también tuvo efecto sobre la incidencia de tumores ya que la mayoría de las ratas que fueron tratadas con 1,2-DMH antes y después del carotenoide sólo desarrollaron un tumor, no así las del grupo control positivo (Figura 20). Es importante también observar que al dar en conjunto el tratamiento con 1,2-DMH y luteína el número de tumores y la incidencia no disminuyen como fuera esperado. Tal parece que el agente quimioprotector probado bajo esta circunstancia no lleva a cabo de forma efectiva su actividad. Al respecto De Flora y Ramel (1988) comentan que la diferencia entre un efecto inhibitorio y uno perjudicial está influido por las condiciones en que ocurra la quimioprotección, ya sea la ruta de administración, dosis, etc.

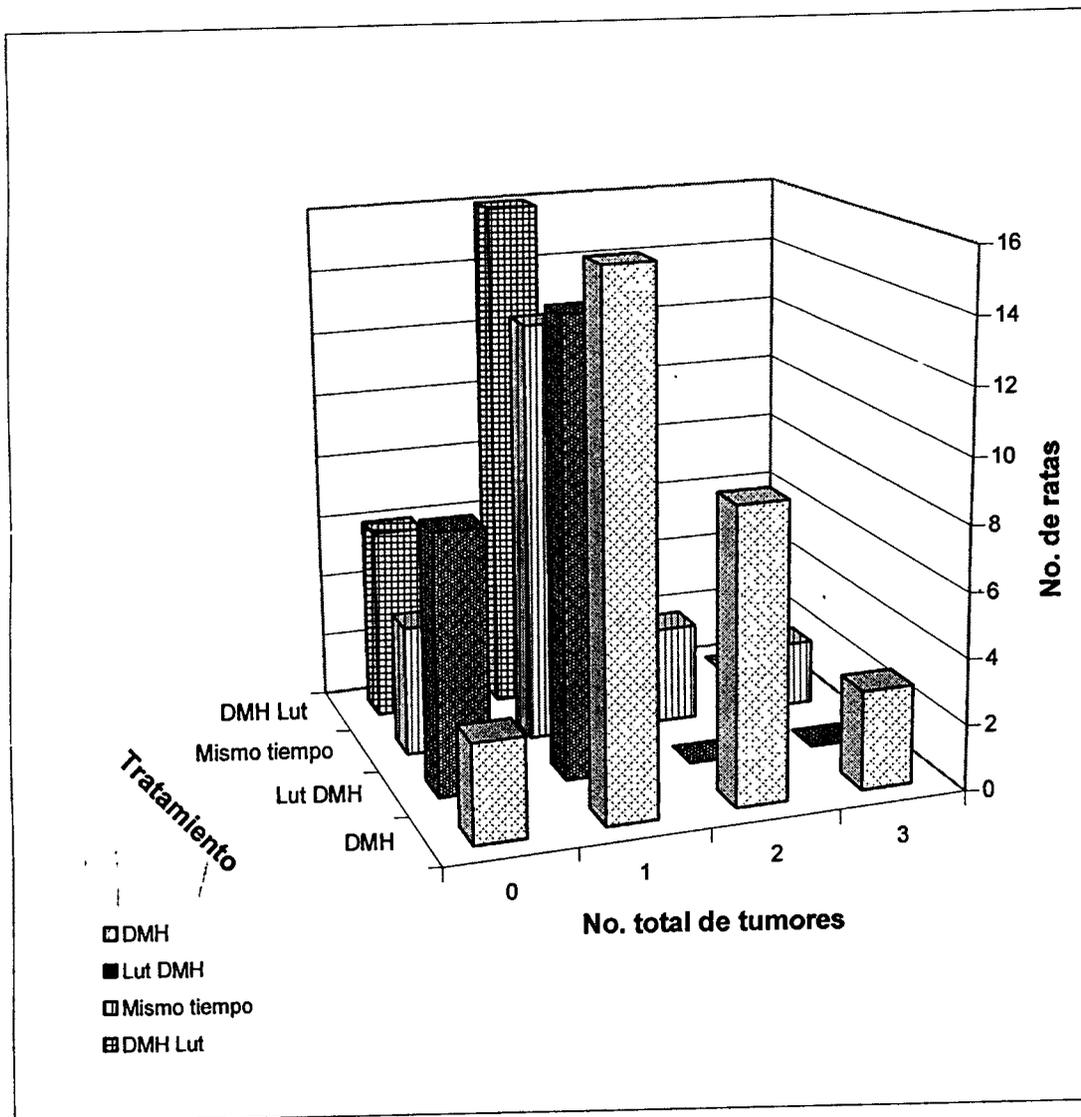


Figura 20. Número de tumores desarrollados por rata en los diferentes tratamientos de quimioprotección realizados

7.5 Efecto de la luteína sobre el patrón de bandeo de los genes *K-ras* y β -*catenina*

Se analizaron, mediante SSCP, los fragmentos de los genes *K-ras* y β -*catenina* para los grupos: control (aceite), control positivo (1,2-DMH) y el grupo al que se le adicionó la luteína después de haberle administrado 1,2-DMH. Este último grupo se seleccionó debido a que fue uno en los que mostró mejor capacidad de quimioprotección, además de que puede dar información sobre el uso de la luteína como posible tratamiento para el cáncer de colon.

Para *K-ras*, los tumores provenientes de los animales tratados con 1,2-DMH y después luteína presentan bandas en común a las que aparecen para las muestras de aquellos tumores de ratas del grupo control positivo. Como puede observarse en la figura 21, se encuentran las bandas complementarias de ADN (a), la banda (b) que era también visualizada en el patrón de bandeo de los tumores analizados durante la implementación del modelo de carcinogénesis y, además, una nueva banda es observada (c). Sin embargo el número de muestras que presentan las bandas b y c es mayor en el grupo al que se le administró luteína después del tratamiento con 1,2-DMH (Cuadro 11).

En el patrón de bandeo para β -*catenina* (Figura 22), un bajo porcentaje de los tumores del grupo que sólo se les administró 1,2-DMH presentó una banda diferente (a) a las encontradas en las muestras del grupo control negativo. El número de muestras que presentó tal banda fue aún menor en las muestras de las ratas a las que se les adicionó luteína (Cuadro 11). Algo interesante observado en el patrón de bandeo de estas últimas muestras es que en ninguno de los casos se presentan las bandas superiores que aparecen en la de los tumores provenientes del grupo control positivo (banda b, Figura 22), lo que sugiere alguna acción de la luteína sobre el gen β -*catenina* que pudo haber influido en la disminución de tumores en el colon de las ratas que fueron tratadas después del carcinógeno con luteína.

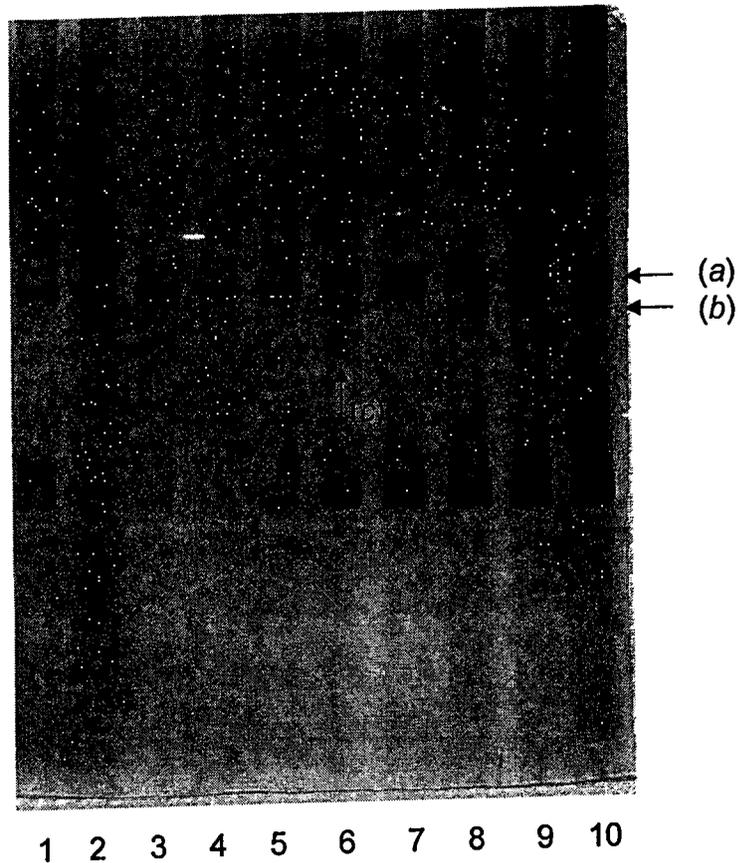


Figura 21. PCR-SSCP para el segmento amplificado del gen *K-ras* en la evaluación de la luteína como agente quimioprotector. 1-3. Control (aceite), 4-6. Muestras de colon de ratas tratadas con 1,2-DMH, 7-10. Muestras de tumores de ratas a las que se les adicionó luteína en la dieta después del tratamiento con 1,2-DMH

Cuadro 11. Frecuencia de los cambios en el patrón de bandeo en los genes *K-ras* y *β-catenina* en la quimioprotección con luteína según el análisis SSCP

<i>K-ras</i> (%)				<i>β-catenina</i> (%)	
DMH		DMH-Luteína		DMH	DMH-Luteína
<i>b</i>	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
2/18 (11)	1/18 (6)	13/24 (54)	4/24 (17)	3/18 (17)	1/18 (5)

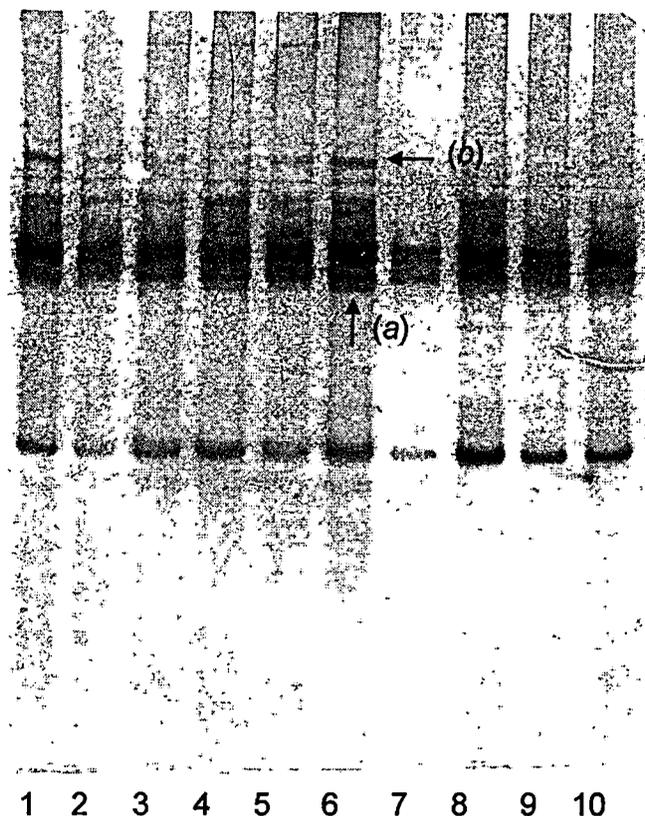


Figura 22. PCR-SSCP para el segmento amplificado del gen β -*catenina* en la evaluación de la luteína como agente quimioprotector. 1-3. Control (aceite), 4-6. Muestras de colon de ratas tratadas con 1,2-DMH, 7-10. Muestras de tumores de ratas a las que se les adicionó luteína en la dieta después del tratamiento con 1,2-DMH

Slattery y col. (2000b) reportaron que niveles bajos de luteína, ingeridos en la dieta, están asociados con una disminución en el riesgo de sufrir mutaciones en genes como *K-ras*. Por otro lado Blum y col. (2001) observaron cambios en el patrón de bandeo del gen β -*catenina* de las muestras de colon de aquellos animales que habían sido tratados con indol-3-carbinol o clorofilina después de haber recibido el compuesto carcinogénico (1,2-DMH). Dichos cambios representaban mutaciones adicionales a las presentadas en el grupo que sólo fue tratado con 1,2-DMH. Sugiriendo que el compuesto quimioprotector le confiere características adicionales a las células mutadas de la mucosa del colon a través de controlar genes que participan en la proliferación celular y apoptosis, lo que trae como consecuencia una disminución en la progresión del cáncer.

Lo anterior correlaciona con los resultados de este estudio donde la adición de la luteína posterior al tratamiento con el carcinógeno produce un cambio en el patrón de bandeo en el análisis de SSCP para aquellas muestras de ratas que fueron tratadas con el carotenoide. Sin embargo, cabe mencionar que se requiere secuenciar para confirmar si dichas bandas representan mutaciones de estos genes.

De los diversos reportes consultados acerca de la luteína como agente quimioprotector, en ninguno de ellos se establece algún modo de acción específico, sólo se especula sobre el mismo. Entre los varios mecanismos que se exponen se encuentran los siguientes: inhibición de la promoción y proliferación de células mutadas debido a su propiedades antioxidantes (Park *et al.*, 1998; Narisawa *et al.*, 1996), la regulación de la comunicación celular mediante las uniones gap (Zhang *et al.*, 1991), y la más aplicable a este estudio por los resultados ya expuestos, es la alteración de la secuencia de los protooncogenes (Okai *et al.*, 1996). Esto sugiere que posiblemente exista una interacción importante entre la dieta y los genes que participan en los eventos que dan lugar al cáncer de colon.

8. CONCLUSIONES

- La semana número 20 después de iniciado el tratamiento con 1,2-dimetilhidrazina es óptima para obtener un número de tumores suficiente para estudios posteriores.
- El número de tumores en las zonas media y distal es mayor que el número de tumores observados en la región proximal.
- Mediante la técnica SSCP fue posible visualizar un cambio en el patrón de bandeo en los genes *K-ras* y *β-catenina* en muestras de tumores pertenecientes a ratas tratadas con 1,2-DMH, sin embargo es preciso realizar una secuenciación de los mismos para confirmar si se trata de una mutación.
- La luteína disminuyó en 50 % el número de tumores en los grupos donde se administró antes y después del tratamiento con el carcinógeno.
- En los genes *K-ras* y *β-catenina* se observó una diferencia en el patrón de bandeo entre las muestras de tumores provenientes del grupo control positivo con aquellos provenientes del grupo tratado con luteína, por lo que se cree que este carotenoide influye sobre los cambios estructurales que pudieran sufrir estos genes durante el desarrollo de carcinogénesis.

9. BIBLIOGRAFÍA

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R. 1997. β -Catenin is a target for the ubiquitin-proteosome pathway. *EMBO J.* **16**: 3797-3804

Alabaster, O., Tang, Z., Frost, A. and Shivapurkar, N. 1995. Effect of β -carotene and wheat bran fiber on colonic aberrant crypt and tumor formation in rats exposed to azoxymethane an high dietary fiber. *Carcinogenesis.* **16**: 127-132

Albanes, D., Heinonen, O. P., Huttunen, J. K., Taylor, P. R., Virtman, J., Edwards, B. K., Haapakoski, J., Rautulahti, M., Hartman, A. M. Palmgren, J. and Greenwald, P. 1995. Effects of α -tocopherol and β -carotene cancer prevention study. *Am J Clin Nutr.* **62**: 1427S-1430S

Alberts, B., Bran, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson J. D. 1994. Molecular biology of the cell. Garland Ed. Cap. 12 pp. 1255-1294

Ames, B. N. 1995. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci.* **92**: 5258-5265

Anuario Estadístico Querétaro de Arteaga, 2001. INEGI

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1992. Short Protocols in Molecular Biology. Ed. John Wiley and Sons. New York. pp. 2.8-2.10

Barbacid, M. 1987. Ras genes. *Annu Rev Biochem.* **56**: 779-827

Barkla, D. H. and Tutton, P. J. 1977. Surface Changes in the descending colon of rats treated with dimethylhydrazine. *Cancer Res.* **37**: 262-271

- Berenblum, I. A. 1954. Speculative review: The probable nature of promoting action and its significance in the understanding of the mechanism of carcinogenesis. *Cancer Res.* **14**: 471-477
- Bird, R. P. 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* **37**: 147-151
- Bird, R. P. and Good, C. K. 2000. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicology Letters.* **112-113**: 395-402
- Bishop, J. M. 1991. Molecular themes in oncogenesis. *Cell.* **74**: 235-248
- Bland, P. W., and Britton, D. C. 1981. Colonic lymphoid tissue and its influence on tumor induction in dimethylhydrazine-treated rats. *Br. J. Cancer.* **44**: 275-276
- Blum, C., Xu, M., Orner, A., Fong, T., Bailey, G., Stoner, D., Horio, T. and Dashwood, R. 2001. β -catenin mutation in rat colon tumors initiated by 1,2-dimethylhydrazine and 2-amino-3-methylimidazol [4,5-*f*]quinoline, and the effect of post-initiation treatment with chlorophyllin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis.* **22**: 315-320
- Boguski, M. S. and McCormick, F. 1993. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature.* **366**: 643-654
- Bos, J. L. 1989. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**: 4682-4689

Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* **9**: 1551-1558

Burton, G. W. and Ingold, K. U. 1984. β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science.* **224**: 569-573

Cameron, I. L., Garza, J. and Hardman, W. E. 1996. Distribution of lymphoid nodules, aberrant crypt foci and tumors in the colon of carcinogen-treated rats. *Brit. J. Cancer* **73**: 893-898

Carter, J. W., Lancaster, H. K., Hardman, W. E. and Cameron I. L. 1994. Distribution on intestine-associated lymphoid-tissue, aberrant crypt foci and tumors in the large bowel of 1,2-dimethylhydrazine-treated mice. *Cancer Res.* **54**: 4304-4307.

Celik, C., Lewis, D. A., and Mittleman, A. 1983. Induction of colon mucosal beta-glucuronidase production as a mechanism for 1,2-dimethylhydrazine colon carcinogenesis. *J Surg Oncol.* **24**: 209-211

Chemical Abstracts Service. 1999. 1,2-Dimethylhydrazine. <http://www.193.51.164.11/htdocs/monographs/vol71/036-dimhydr.html>

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

Corpet, D. E. and Taché, S. 2002(b). Systematic review of preclinical rodent's studies: Database of effective agents and diets ranked by potency. <http://www.inra.fr/reseau-nacre/sci-memb/corpet/map.html>

- Cotran, R. S., Kumar, V. and Collins, T. 2000. Patología estructural y funcional. McGraw Hill-Interamericana. México. **8**: 277-347
- Cummings, J. H. and Bingham, S. A. 1998. Fortnightly review-diet and the prevention of cancer. *Br Med J.* **317**: 1636-1640
- Dashwood, R., Suzui, M., Nakagama, H., Sugimura, T. and Nagao, M. 1998. High frequency of β -catenin (*ctnnb1*) mutations in the colon tumors induced by two heterocyclic amines in the F344 rat. *Cancer Res.* **58**: 1127-1129
- Davies, M. J. and Rumsby, P. C. 1998. Long-term analysis of colonic aberrant crypt formation after treatment of Sprague-dawley rats with azoxymethane. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis.* **18**: 183-197
- Deasy, J. M., Steele, G., Ross, D. S., Lahery, S. J., Wilson, R. E. and Madara, J. 1983. Gut-associated lymphoid tissue and dimethylhydrazine-induced colorectal carcinoma en the Wistar/Furth rat. *J. Surg. Oncol.* **24**: 36-40
- De Flora, S. and Ramel, C. 1988. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis classification and overview. *Mutation Research.* **202**: 285-306
- Doll, R. and Peto, R. 1987. Epidemiology of cancer. En: Weatherall, D. J., ledingham, J. G. y Warell W. A. (Eds) Oxford textbook of medicine. Oxford, U. K. pp. 4.95-4.123
- Endo, T. Ookawa, K., Tanaka, M., Nakaji, S., Tsuchida, S., and Sugawara, K. 2001. Differences in carcinogenesis by the length of carcinogen exposure period in rat colon. *Digestive Disease and Science.* **46**: 109-117

- Erdman, S. H., Wu, D. H., Hixson, L. J., Ahnen, D., and Gerner, E. W. 1997. Assessment of mutations in Ki-ras and p53 in colon cancers from azoxymethane- and dimethylhydrazine- treated rats. *Molecular carcinogenesis*. **19**: 137-144
- Fearon, E. R. and Volgestein, B. A. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. **61**: 759-767
- Fiala, E. S., Kulakis, C., Christiansen, G. and Weisburger, J. H. 1978. Inhibition of the metabolism of the colon carcinogen, azoxymethane, by pyrazole. *Cancer Res*. **38**: 4515-1521
- González de Mejía, E., Loarca-Piña, G. and Ramos-Gómez, M. 1997(a). Antimutagenicity of xanthophylls present in Aztec marigold (*Tagetes erecta*) against 1-nitropyrene. *Mutat. Res.* **389**: 219-226
- González de Mejía, E., Ramos-Gómez, M. and Loarca-Piña, G. 1997(b). Antimutagenic activity of natural xanthophylls against aflatoxin B1 in *Salmonella typhimurium*. *Environ Mol Mutagen*. **30**: 346-353
- Gregory, G. K., Chen, T. S. and Phillip, T. 1986. Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci*. **51**: 1093-1094
- Gross, J. 1987. Carotenoids. En: Pigments in fruits. Ed. Academic press. U. K. pp. 87-186
- Gross, J. 1991. Carotenoids. En: Pigments in vegetables. Chlorophylls and carotenoids. Avi. Book, New York. pp. 175-270
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2000. The hallmark of cancer. *Cell*. **100**: 57-70

- Harris, H. 1986. The genetic analysis of malignancy. *J Cell Sci.* 4: 431-444
- Hecht, A. y Kemler, R. 2000 Curbing the nuclear activities of β -catenin: control over Wnt target gene expression. *EMBO Rep.* 1: 24-28
- Hennekens, C. H., Buring, J. E., Manson, J. E., Stampfer, M., Rosener, B., Cook, N. R., Belanger, C., Lamotte, F., Gaziano, J. M., Ridker, P. M., Willett, W. and Peto, R. 1996. Lack of effect of long-term supplementation with betacarotene on the incidence of malignant neoplasm and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 334: 1145-1149
- Hongyo, T., Buzard, G. S., Clavert, R. J., and Weghorst, C. M. 1993. "Cold SSCP": a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Research.* 21: 3637-3642
- Hunter, T. 1997. Oncoprotein networks. *Cell.* 88: 333-346
- INEGI 2001. Estadísticas del Sector Salud y Seguridad Social. Cuaderno No. 17 pp. 29-67, 143-164
- Jacoby, R. F., Llord, X., Teng, B., Davidson, N. O. and Brasitus, T. A. 1991. Mutations in the K-ras oncogene induced by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. *J. Clin. Invest.* 87: 624-630
- Jackson, P. E., Cooper, D. P., O'Connor, P. J. and Povey, A. C. 1999. The relationship between 1,2-dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumors. Tumor development in female SWR mice does not require a K-ras mutational event. *Carcinogenesis.* 20: 509-513

Kanazawa, K., Yamamoto, T. and Sato, S. 1975. Experimental induction of colonic carcinomas in rats. Analysis of factors influencing upon the incidence. *Jpn J Exp Med.* **45**: 439-456.

Kennedy, S. G., Kandel, E. S., Cross, T. K. and Hay, N. 1999. Akt/protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol.* **19**: 5800-5810

Kim, J. M., Araki S., Kim D. J., Park, C. B., Takasuka, N., Baba-Toriyama, H., Ota, T., Nir, Z., Khachik, F., Shimidzu, N., Tanaka, Y., Osawa, T., Uraji, T., Murakoshi, M., Nishino, H. and Tsuda, H. 1998. Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. *Carcinogenesis.* **19**: 81-5

Kitaeva, M. N., Grogan, L., Williamsk, J. P., Dimond, E., Nakahara, K., Hausner, P., DeNobile, J. W., Soballe, P. W. and Kirsch, I. R. 1997. Mutations in beta-catenin are uncommon in colonrectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res.* **57**: 4478-4481

Koesters, R., Ridder, R., Kopp-Schneider, A., Betts, D., Adams, kV., Niggli., F., Briner, J. and von Knebel Doeberitz, M. 1999. Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Res.* **59**: 3880-3882

Koesters, R., Hans, A. H., Benner, A., Prosst, R., Boehm, J., Gahler, J., von Knebel D. and Doeberitz, M. 2001. Predominant mutation of codon 41 of the β -catenin proto-oncogene in rat colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine using a complete carcinogenic protocol. *Carcinogenesis.* **22**: 1885-1890

- Korinek, V., Barker, N., Willert, K., Molenaar, M., Roose, J., Wagenaar, G., Markmen, M., Lamers, W., Destree, O. and Clevers, H. 1998. Two members of the Tcf family implicated in Wnt/ β -catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol.* **18**: 1248-1256
- Krinsky, N. I. and Deneke, S. M. 1982. Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *J Natl Cancer Inst.* **69**: 205-210
- Krinsky, N. I. 1990. Carotenoids in medicine. En: Carotenoids: Chemistry and biology. Plenum press. New York. pp. 279-289
- Kucharczyk, K., Trzeciak, L. and Kaczanowski, R. 2001. Multitemperature single strand conformation polymorphism. <http://hgm2001.hgu.mrc.ac.uk/Abstracts>
- Kushi, L. H., Free, R. M., Sellers, T. A., Zheng, W. and Folsom, A. R. 1996. Intake of vitamins A, C and E and postmenopausal breast cancer. *Am J Epidemiol.* **144**: 165-174
- Landis, S H., Murray, T. and Bolden, S. 1998. Cancer statistics. *Cancer J Clin.* **48**: 6-29
- Law, Y., Remvikos, X., Sastre, S., Olschwang, T., Melot, R. J., Validire, S. and Thomas, G. 1989. Multiple genetic alterations in distal and proximal colonrectal cancer. *Lancet.* **ii**: 353-355
- Le Marchand, L., Franke, A. A., Custer, L., Wilkens, L. R. and Cooney, R. V. 1997. Lifestyle and nutritional correlates of cytochrome CYP1A2 activity; inverse associations with plasma lutein and alpha-tocopherol. *Pharmacogenetics.* **7**: 11-19

- Liu, C., Kato, Y., Zhang, Z., Do, V. M., Yankner, B. A. and He, X. 1999. β -Trcp couples β -catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**: 6273-6278
- Ma, Q-Y., Williamson, K. E. and Rowlands, B. J. 2002. Variability of cell proliferation in the proximal and distal colon of normal rats with dimethylhydrazine induced carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. **8**: 847-852
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1990. Molecular Cloning. A laboratory manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 9.14
- Mares-Perlman, J. A., Fisher, A., Klein, R., Palta, M., Block, G., Millen, A. E. and Wright, J. D. 2001. Lutein and zeaxanthin in the diet and serum and their relation to age-related maculopathy in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol*. **153**: 424-432
- Marx, J. 1993. New colon cancer gene discovered. *Science*. **260**: 751-752
- Maskens, A.P. 1976. Histogenesis and growth pattern of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon adenocarcinoma. *Cancer Res*. **36**: 1585-1592
- McLellan, E., Medline, A., and Bird, R. 1991. Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions. *Cancer Res*. **58**: 5270-5274
- Mitra, G., Pauly, kT., Kumar, G. K., Pei, S. H., Hughes, R. C., Moshcel, T. and Barbacid, M. 1989. Molecular analysis of O⁶-substituted guanine-induced mutagenesis of *ras* oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8650-8654

Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B. and Kinzker, K. W. 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. **275**: 1787-1790

Morrissey, B. 2002. Foreword. Functional foods. Biochemical and Processing Aspects. En: Shi, J., Mazza G. y Le Maguer (Eds). CRC-Press. U.S.A. Vol. 2. pp : v

Narisawa, T., Fukaura, Y., Hasebe, M., Ito, M., Aizawa, R., Murakoshi, M., Uemur, S., Khachik, F. and Nishino, H. 1996. Inhibitory effects of natural carotenoids, α -carotene, β -carotene, lycopene and lutein, on colonic aberrant crypt foci formation in rats. *Cancer Letters*. **107**: 137-142

Novak, A. and Dedhar, S. 1999. Signaling through β -catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci*. **56**: 523-537

Okai, Y., Higashi-Okai, K., Yano, Y. and Otani, S. 1996. Identification of antimutagenic substances in an extract of edible red alga, *Porphyra tenera* (asakunori). *Cancer Lett*. **100**: 235-240.

Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornqvist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, P. J., Meyskens, F. L., Valanis B., Williams, J. H., Barnhart, S. and Hammar, S. 1996. Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. **334**: 1150-1155

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. **86**: 2766-2770.

- Park, J. S., Chew, B. P. and Wong, T. S. 1998. Dietary lutein from marigold extract inhibits mammary tumor development in BALB/c mice. *J Nutr.* **128**: 1650-1656
- Parkinson, A. 1996. Biotransformation of xenobiotics. En: Klaassen, C. D. (Eds). Casarett and Doull's Toxicology The basic science of poisons. Mc. Graw-Hill. New York. Cap. 6 pp.113-186
- *Peto, J. 2001. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature.* **411**: 390-395
- Polakis, P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* **14**: 1837-1851
- Ponder, B. 2001. Cancer genetics. *Nature.* **411**: 336-341
- Potter, J. D. and Steinmetz, K. 1996. Vegetables, fruit and phytoestrogen as preventive agents. *Int Agency Res Cancer Sci Publ.* **139**: 61-90
- Reddy, A. L. and Fialkow, P. J. 1988. Influence of dose of initiator of two-stage skin carcinogenesis in BALB/c mice with cellular mosaicism. *Carcinogenesis.* **9**: 751-754
- Robbins, P. F., El Gamil, M., Li, Y. F., Kawakami, Y., Loftus, D., Apella, E. and Rosenberg, S. A. 1996. A meted beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med.* **183**: 1185-1192
- Samowitz, W., Powers, D., Spirio, L., Nollet, F., van Roy, R. and Slaterry, M. 1999. β -catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinoma. *Cancer Res.* **59**: 1442-1444

- Santana, C. y García-Carrancá, A. 1996. Los genes *ras*, el ciclo celular y el desarrollo de tumores. *BEB*. **16**: 86-91
- Shimamoto, F. and Vollmer, E. 1987. Changes in intestinal mucosa above lymph follicles during carcinogenesis in ratas. *J. Cancer. Res. Clin. Onco.* **113**: 41-50
- Slattery, M., Benson, J., Curtin, K., Khe-Ni, Ma., Schaffer, D. and Potter, J. D. 2000(a). Carotenoids and colon cancer. *Am J Clin Nutr.* **71**: 575-582
- Slattery, M., Curtin, K., Anderson, K., Ma, K., Leppert, M., Potter, J., Schaffer, D. and Samowitz, W. 2000(b). Associations between dietary intake and Ki-ras mutations in colon tumors: a population-based study. *Cancer Res.* **60**: 6935-6941
- Sparks, A. B., Morin, P. J., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. 1998. Mutational analysis of the APC/ β -Catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* **58**: 1130-1134
- Sporn, M. B. 1976. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res.* **36**: 2699-2702
- Su, L. K., Vogelstein, B. and Kinzler, K. 1993. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science.* **262**: 1734-1737
- Temple, N. J. and Basu, T. 1987. Protective effect of β -carotene against colon tumors in mice. *J Natl Cancer Inst.* **78**: 1211-1214
- Topal, M. D. 1988. DNA repair, oncogenes and carcinogenesis. *Carcinogenesis (Lond)* **9**: 691-696.

- Toroella, M. y Villa-Treviño, S. 1998. Bases genéticas del cáncer. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. pp. 9-41
- Verhoeven, D. T. H., Assen, N., Goldbohm, R. A., Dorant, E., van't Veer, P., Sturmans, F., Hermus, R. J. J. and von den Brandt, P. A. 1997. Vitamins C and E, retinol, beta-carotene and dietary fiber in relation to breast cancer risk: a prospective cohort study. *Brit J Cancer*. **75**: 149-155
- Viñas-Salas, J., Fortuny, J. C., Panades, J., Piñol, C. Prim, M., Fermiñan, A., Corbella, G., Calderó, J. and Egido, R. 1992. Appearance of ear tumors in Sprague-Dawley rats treated with 1,2-dimethylhydrazine when used as a model for colonic carcinogenesis. *Carcinogenesis*. **13**: 493-495
- Wattenberg, L. W. 1985. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res*. **45**: 1-8
- Weinberg, RA. 1996. How cancer arises. *Sci Am*. **275**:62-70
- Yamada, Y., Yoshimi, N., Sugie, S., Suzui, M., Kawabata, K., Matsunaga, K., Hara, A. and Mori, H. 1999. β -catenin (*Ctnnb1*) gene mutations in diethylnitrosamine (DEN)- induced liver tumors in male F344 rats. *Jpn J Cancer Res*. **90**: 824-828
- Yamada, Y., Yoshimi, N., Hirose, Y., Kawabata, K., Matsunaga, K., Shimizu, M., Hara, A. and Mori, H. 2000. Frequent β -catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res*. **60**: 3323-3327
- Yamada, Y., Oyama, T., Hirose, Y., Hara, A., Sugie, S., Yoshida, K., Yoshimi, N. and Mori H. 2003. β -catenin mutations is selected during malignant transformation in colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. **24**: 91-97

- Zhang, L. X., Cooney, R. V. and Bertram, J. S. 1991 Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their chemopreventive. *Carcinogenesis*. **12**: 2109-2114
- Zhou, H., Li. X. M., Meinkoth, J. and Pittman, R. N. 2000. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol.* **151**: 483-494
- Zurawel, R. H., Chiappa, S. A., Allen, C., and Raffel, C. 1998. Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations. *Cancer Res.* **58**: 896-899

10. APÉNDICES

Apéndice 1.

Amortiguador de digestión para extracción de DNA

5 ml de Tris (1 M, pH 8.0)

5 ml de EDTA (500 mM, pH 8.0)

6.25 ml de NaCl (4 M)

3.3 ml de SDS (20 %)

Aforar a 50 ml con agua HPLC estéril

0.1 mg/ml de proteinasa K, ésta se agrega hasta usar el amortiguador

Apéndice 2.

Amortiguador TE

100 µl de Tris-Cl (10 mM, pH 8.0)

24 µl de EDTA (1 mM, pH 8.0)

Aforar a 10 ml con agua HPLC

Apéndice 3.

Amortiguador TAE 50 X pH 8.0

242 g de Tris base

57.1 ml de ácido acético

100 ml de EDTA (0.5 M, pH 8.0)

Aforar a 1 L con agua HPLC

Apéndice 4.

Amortiguador SSCP

SDS 0.1 %

EDTA 10 mM

Apéndice 5.

Colorante de formamida

10 mg de xilencianol

10 mg de azul de bromofenol

10 mM EDTA

Disolver en 10 ml de formamida

Apéndice 6.

Amortiguador TBE 10 X pH 8.0

108 g de Tris base

55 g de ácido bórico

40 ml de EDTA (0.5 M, pH 8.0)

Aforar a 1 L con agua HPLC

Apéndice 7.

Tinción con plata

Soluciones

Solución de ácido acético

10 ml de ácido acético

Aforar a 100 ml con agua bidestilada

Solución de nitrato de plata (1 g/L)

0.1 g de AgNO_3

100 μl de formaldehído al 37 %

Aforar a 100 ml con agua bidestilada

Solución carbonato de sodio

2.5 g de Na_2CO_3

0.0002 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

100 μ l de formaldehído al 37 %
Aforar a 100ml con agua bidestilada

Solución glicina-EDTA

2 % (p/v) glicina

0.5 % (p/v) EDTA disódico

Aforar a 100 ml con agua bidestilada

Solución de glicerol

5 % (v/v) glicerol

Aforar a 100 ml con agua bidestilada

Para llevar a cabo la tinción del gel, las soluciones anteriores se agregan en el siguiente orden

Etapa	Tiempo	Solución
Fijación	30 min	Solución de ácido acético
Enjuague	3 veces	Agua bidestilada
	2 min c/u	
Impregnación 1	20-30 min	Solución de nitrato de plata
Enjuague	20 seg	Agua bidestilada
Revelado	2-5 min	Solución de carbonato de sodio
	hasta aparición de bandas	
Detener revelado	10 min	Solución glicina-EDTA
Impregnación 2	10 min	Solución de glicerol