



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL

CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Efecto quimioprotector de extractos de *M. parviflora*,
C. murale y *P. oleraceae* sobre el desarrollo de 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 ALIMENTOS

PRESENTA

ING. JOEL FERNÁNDEZ CORREA

DIRIGIDA POR

DRA. MINERVA RAMOS GÓMEZ

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. ENERO, 2009



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

Efecto quimioprotector de extractos de *M. parviflora*,
C. murale y *P. oleraceae* sobre el desarrollo de 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 ALIMENTOS

Presenta:

ING. JOEL FERNÁNDEZ CORREA

Dirigida por:

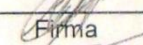
DRA. MINERVA RAMOS GÓMEZ

SINODALES

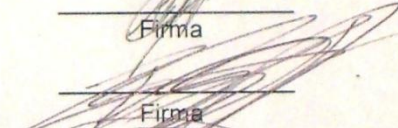
Dra. Minerva Ramos Gómez
Presidente


Firma

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Secretario


Firma

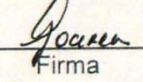
Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Vocal

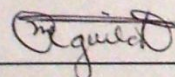

Firma

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz
Suplente

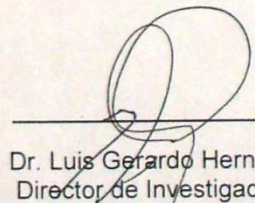

Firma

Dra. Ma. Guadalupe F. Loarca Piña
Suplente


Firma


Firma

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


Firma

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

A mi Madre y querida hermana
Un agradecimiento especial
a mí estimado hermano[†]

Gracias por su compañía y apoyo que
siempre me han proporcionado

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo para la realización de este proyecto de investigación.

A mi directora de tesis, Dra. Minerva Ramo Gómez, por su tiempo y entusiasmo para llevar a cabo este proyecto.

A los miembros de Comité Revisor: Dra. Minerva Ramos Gómez, Dra. Rosalía Reynoso Camacho, Dr. Ramón Gerardo Guevara González, Dra. Sandra O. Mendoza Díaz, Dra. Ma. Guadalupe F. Loarca Piña, gracias por apoyarme en el trabajo de laboratorio y comentarios de tesis.

A mis profesores del Posgrado en Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro por sus enseñanzas.

A Carmelita, Laura y Silvia, por su dedicación al posgrado para tener a tiempo este proyecto.

A mis compañeros de Posgrado en quienes siempre encontré tiempo y apoyo. En especial a Maricarmen, Raquel, Sergio, Néstor, Lupita.

Un agradecimiento especial a Hayde que siempre me apoyo y a quien debo mis mejores momentos en el posgrado.

RESUMEN

Con la finalidad de identificar especies vegetales con potencial quimioprotector, para esta investigación se utilizó *Malva parviflora*, *Chenopodium murale* y *Portulaca oleraceae* y se elaboraron los extractos acuosos, no encontrándose diferencias en el contenido de fenoles totales (46.7 ± 52.4 mg de ácido gálico/g extracto); sin embargo, *M. parviflora* presentó la mayor concentración de flavonoides (35.34 mg de catequina/g extracto), mientras que *C. murale* presentó la mayor capacidad antioxidante. Para evaluar el potencial quimioprotector, los extractos acuosos se administraron en la dieta a ratas macho Sprague-Dawley, a concentraciones de 100 y 400 mg/kg de peso corporal durante una semana, observándose en hígado un incremento significativo en el contenido de glutatión reducido en (GSH) con *C. murale* (20%, 100 mg/kg), de la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa (GST) con los tres extractos a la concentración de 100 mg/kg, y de la enzima quinona reductasa (NQO1) con *M. parviflora* (73%, 100 mg/kg) y con *P. oleraceae* (33%, 400 mg/kg). Además, la actividad de GST se incrementó significativamente tanto en colon proximal con *M. parviflora* (42%, 100 mg/kg) y *C. murale* (80%, 400 mg/kg), como en colon distal con *M. parviflora* (40%, 400 mg/kg). Similarmente, la actividad de NQO1 en colon distal aumentó significativamente con *C. murale* (29%, 100 mg/kg). En una segunda etapa del proyecto se implementó el modelo de cáncer colorrectal con el carcinógeno dimetilhidracina (DMH, 21 mg/kg, vía subcutánea, una vez por semana durante 8 semanas) y los extractos se administraron 1 semana antes, durante y 10 semanas después de carcinógeno, observándose que los grupos tratados con *M. parviflora* y *P. oleraceae* presentaron una sobrevivencia mayor (92 y 96%, respectivamente) que el grupo tratado únicamente con DMH (88%). Asimismo, en hígado hubo un aumento significativo en la concentración de GSH (21%) con *M. parviflora* y en la actividad de GST (5%) con *P. oleraceae*; en la actividad de GST (10%) con *P. oleraceae* en colon distal y, aunque no estadísticamente significativo, en la actividad de GST (5%) en colon proximal con *M. parviflora*, respecto al grupo tratado con DMH. En cuanto al desarrollo de cáncer de colon, los grupos tratados con *P. oleraceae* y *M. parviflora* muestran un número menor de tumores por rata y de multiplicidad (1.00 y 1.33, respectivamente), comparados con el grupo con DMH. Estos resultados confirman que la inducción de enzimas de fase 2 y de la concentración de GSH por la administración de extractos acuosos es un mecanismo efectivo para disminuir el desarrollo de cáncer de colon. Igualmente, los resultados sugieren que se pueden incrementar los parámetros relacionados con la prevención del cáncer mediante el consumo en la dieta de especies vegetales ricas en compuestos fenólicos (100 mg de extracto/kg de peso corporal equivalen a 350 g de planta fresca).

Palabras clave: propiedades nutraceuticas, *P. oleraceae*, *M. parviflora*, enzimas de fase 2, cáncer, quimiprotección.

ABSTRACT

Aiming to identify plants with chemopreventive potential we used for this research *Malva parviflora*, *Chenopodium murale* and *Portulaca oleraceae* and produced the aqueous extract, differences were not found in the content of total phenols (46.7 ± 52.4 mg of gallic acid/g extract), however *M. parviflora* had the highest concentration of flavonoids (35.34 mg of catechin/g extract), while *C. Murale* had the highest antioxidant capacity. To assess the potential chemopreventive, the aqueous extract were administered in the diet to male Sprague-Dawley rats at concentrations of 100 and 400 mg/kg body weight in a week, showing a significant increase in liver in the content of reduced glutathione in (GSH) with *C. Murale* (20%, 100 mg/kg) of the activity of the enzyme glutathione-S-transferase (GST) with the three extracts at the concentration of 100 mg/kg, and the enzyme quinone reductase (NQO1) with *M. parviflora* (73%, 100 mg/kg) and *P. oleraceae* (33%, 400 mg/kg). In addition, GST activity increased significantly in both proximal colon with *M. parviflora* (42%, 100 mg/kg) and *C. Murale* (80%, 400 mg/kg), as in the distal colon with *M. parviflora* (40%, 400 mg/kg). Similarly, the activity of NQO1 in the distal colon increased significantly with *C. Murale* (29%, 100 mg/kg). In a second stage of the project was implemented the model of colorectal cancer with the carcinogen dimethylhydrazine (DMH, 21 mg/kg, subcutaneously once a week for 8 weeks) and the extracts were administered 2 weeks before, during and after 10 weeks of carcinogen, noting that the groups treated with *M. parviflora* and *P. oleraceae* showed a higher survival (92% and 96, respectively) than the group treated only with DMH (88%). Also in the liver, there was a significant increased in the concentration of GSH (21%) with *M. parviflora* and the activity of GST (5%) with *P. oleraceae*; in the activity of GST (10%) with *P. oleraceae* in distal colon and, although not statistically significant, in the activity of GST (5%) in the proximal colon with *M. parviflora*, the group treated with DMH. Regarding the development of colon cancer, the groups treated with *P. oleraceae* and *M. parviflora* showed a smaller number of tumors per rat and multiplicity (1.00 and 1.33, respectively), compared with the group with DMH. These results confirm that the induction of phase 2 enzymes and the concentration of GSH by the administration of aqueous extract is an effective mechanism to decrease the development of colon cancer. Similarly, the results suggest that may increase the parameters relating to the prevention of cancer through the consumption of diet rich in plant phenolic compounds (100 mg extract/kg body weight equivalent to 350 grams of fresh plant).

Keywords: nutraceuticals property, *P. oleraceae*, *M. parviflora*, enzymes of phase 2, cancer, chemopreventive.

ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen	I
Abstract	II
Índice General	III
Índice de Cuadros	VII
Índice de Figuras	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Generalidades del cáncer	3
2.1.1 Definición de cáncer	3
2.1.2 Mortalidad	4
2.1.3 Causas del cáncer de colon	5
2.2 Desarrollo del cáncer de colon	6
2.1.1 Mutaciones en el cáncer de colon	7
2.3 Carcinógenos colónicos	9
2.3.1 Efectos carcinogénicos de la 1,2-dimetilhidracina	9
2.4 Estrategias de protección contra la carcinogénesis	12
2.4.1 Enzimas destoxicantes de fase 2	12
2.4.2 Factor de transcripción Nrf2 como mecanismo de quimioprotección	14
2.5 Alimentos nutraceuticos	17
2.6 Especies vegetales del Estado de Querétaro con potencial nutraceutico	18

2.6.1 <i>Malva parviflora</i>	19
2.6.2 <i>Chenopodium murale</i>	21
2.6.3 <i>Portulaca oleracea</i>	22
2.6.4 Potencial nutracéutico de especies vegetales bajo estudio	25
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo general	29
5.2 Objetivos específicos	29
VI. METODOLOGÍA	30
6.1 Materiales	30
6.1.1 Químicos	30
6.1.2 Biológicos	31
6.2 Métodos	32
6.2.1 Preparación de los extractos acuosos de las plantas	32
6.2.2 Cuantificación de compuestos fenólicos	33
6.2.3 Capacidad antioxidante de los extractos acuosos de las especies vegetales	34
6.2.4 Capacidad inductora de los extractos acuosos de las especies vegetales sobre enzimas de fase 2	35
6.2.5 Inducción de cáncer de colon y quimioprotección con las especies vegetales	36
6.2.6 Sacrificio de animales y obtención de órganos	37
6.2.7 Preparación de los extractos citosólicos de las muestras	38

6.2.8 Determinación de la concentración de glutatión reducido y de la actividad de enzimas de fase 2	38
6.2.9 Análisis Estadístico	41
VII. RESULTADOS	42
7.1 Rendimiento de los extractos acuosos de las especies vegetales	42
7.2 Cuantificación de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de los extractos acuosos	42
7.3 Capacidad inductora de los extractos acuosos sobre de la concentración glutatión reducido y la actividad de enzimas detoxificantes	46
7.3.1 Efecto de la administración de los extractos acuosos sobre la ganancia de peso	46
7.3.2 Efecto de los extractos acuosos sobre la concentración de glutatión reducido (GSH) en hígado	47
7.3.3 Efecto de los extractos acuosos sobre la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST)	49
7.3.4 Efecto de los extractos acuosos sobre la actividad enzimática de quinona reductasa (NQO1)	55
7.3.5 Selección de la concentración de extracto acuoso con mayor potencia inductora de GSH y enzimas detoxificantes	59
7.4 Efecto quimioprotector de los extractos acuosos de <i>M. parviflora</i> y <i>P. oleraceae</i> sobre el desarrollo de cáncer de colon inducido con DMH en ratas Sprague-Dawley	61
7.4.1 Ganancia de peso, consumo de alimento y sobrevivencia de ratas inducidas con DMH y tratadas con los extractos acuosos	61
7.4.2 Evaluación macroscópica del colon en ratas con cáncer inducido con DMH	63
7.4.3 Efecto de los extractos acuosos sobre la concentración de glutatión reducido (GSH) en hígado en las ratas tratadas con DMH	68
7.4.4 Efecto de los extractos acuosos sobre la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado en las ratas tratadas con DMH	70

7.4.5 Efecto de los extractos acuosos sobre la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en colon proximal en las ratas tratadas con DMH	72
7.4.6 Efecto de los extractos acuosos sobre la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en el colon distal de ratas tratadas con DMH	73
VIII. CONCLUSIONES	78
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
X. ANEXOS	90
9.1. Preparación de 1,2-dimetilhidracina	90
9.2. Reactivos para la determinación de fenoles totales	90
9.3. Reactivos para la determinación de flavonoides totales	91
9.4. Reactivos para la preparación de extractos citosólicos	91
9.5. Reactivos para la determinación de capacidad antioxidante	91
9.6. Reactivos para la determinación de proteína	92
9.7. Reactivos para la determinación de glutatión reducido	92
9.8. Reactivos para la determinación de glutatión-S-transferasa	93
9.9. Reactivos para la determinación de quinona reductasa	93
9.10. Solución bloqueadora para quinona reductasa	94

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Distribución porcentual de los principales tipos de cáncer en México	5
2	Contenido de fenoles, flavonoides totales y uso de diversas especies vegetales	18
3	Grupos experimentales de ratas Sprague-Dawley tratadas con los diferentes extractos de plantas	36
4	Contenido de fenoles, flavonoides totales y capacidad antioxidante de los extractos acuosos de las especies vegetales.	43
5	Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado, colon proximal y distal de las ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuosos	55
6	Actividad enzimática de quinona reductasa (NQO1) en hígado y colon distal de las ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuosos	58
7	Concentración de GSH y actividad de enzimas destoxicantes en hígado y colon distal de las ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuosos	59
8	Coeficientes de correlación de Pearson de la actividad antioxidante de los extractos acuosos con la concentración de GSH y la actividad enzimática de GST y NQO1	60
9	Efecto de los extractos acuosos sobre el peso, el consumo de alimento y la sobrevivencia de ratas Sprague-Dawley inducidas con DMH	63
10	Porcentaje de incidencia, número promedio y multiplicidad de tumores de ratas tratadas con DMH y los extractos acuosos	65
11	Porcentaje de incidencia, número promedio y multiplicidad de placas de ratas tratadas con DMH y los extractos acuosos	66
12	Concentración de GSH y la actividad enzimática de GST hígado, colon proximal y distal de ratas inducidas con 21 mg/kg de DMH y alimentadas con extractos acuosos de <i>M. parviflora</i> y	75

P. oleraceae a concentraciones de 100 kg/kg

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Sucesión de mutaciones importantes presentes en el proceso de cáncer colorrectal	8
2	Biotransformación de la 1,2-dimetilhidracina	10
3	Tipos de tumores inducidos por 1,2-dimetilhidracina en roedores	11
4	Biotransformación de xenobióticos	13
5	Fam. Malvaceae, <i>Malva parviflora</i>	20
6	Fam. Chenopodiaceae, <i>Chenopodium murale</i>	21
7	Fam. Portulacaceae, <i>Portulaca oleracea</i>	23
8	Diagrama de la elaboración de los extractos a partir de las especies vegetales seleccionadas	32
9	Modelo experimental de cáncer colorrectal	36
10	Peso de las ratas tratadas con los extractos acuosos de <i>M. parviflora</i> , <i>C. murale</i> y <i>P. oleracea</i> a concentraciones de 100 y 400 mg/kg	47
11	Concentración de glutatión reducido (GSH) de hígado en ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuosos a concentraciones de 100 y 400 mg/kg	49
12	Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado de ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuosos a las concentraciones de 100 y 400 mg/kg	51
13	Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en colon proximal y distal de las ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuosos a las concentraciones de 100 y 400 mg/kg	53
14	Actividad enzimática de quinona reductasa (NQO1) en hígado y colon distal de las ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuosos de <i>M. parviflora</i> , <i>C. murale</i> y <i>P. oleraceae</i> .	57
15	Peso de las ratas tratadas con los extractos acuosos de <i>M. parviflora</i> y <i>P. oleracea</i> , e inducidas con 21 mg/kg de DMH	62
16	Lesiones encontradas en la zona distal del colon de ratas inducidas químicamente con DMH.	63
17	Lesiones encontradas en la zona proximal del colon de ratas	64

	inducidas químicamente con DMH	
18	Distribución de placas y tumores en el colon de cada uno los grupos tratados con 21 mg/kg de DMH y los extractos acuosos de <i>M. parviflora</i> y <i>P. oleraceae</i>	68
19	Concentración de GSH en hígado de ratas inducidas con 21 mg/kg de DMH y alimentadas con extractos acuosos de <i>M. parviflora</i> y <i>P. oleraceae</i> a concentraciones de 100 kg/kg	69
20	Actividad enzimática de GST en hígado de ratas inducidas con 21 mg/kg de DMH y alimentadas con extractos acuosos de <i>M. parviflora</i> y <i>P. oleraceae</i> a concentraciones de 100 kg/kg	71
21	Actividad enzimática de GST en colon proximal de ratas inducidas con 21 mg/kg de DMH y alimentadas con extractos acuosos de <i>M. parviflora</i> y <i>P. oleraceae</i> a concentraciones de 100 kg/kg	72
22	Actividad enzimática de GST en colon distal de ratas inducidas con 21 mg/kg de DMH y alimentadas con extractos acuosos de <i>M. parviflora</i> y <i>P. oleraceae</i> a concentraciones de 100 kg/kg	74

I. INTRODUCCIÓN

En México, las enfermedades crónico-degenerativas son un problema de salud pública, siendo el cáncer la segunda causa de muerte entre la población. Por lo que es necesario llevar a cabo diversos estudios que aporten estrategias preventivas que ayuden a disminuir el desarrollo de cáncer en la población.

Los cánceres mas comunes son el de pulmón, estómago, hígado, mama y, relacionado directamente con el consumo de alimentos, el cáncer de colon. Para el cáncer de colon se tiene el mismo porcentaje de mortalidad en México, tanto en hombres como en mujeres (INEGI, 2007). Malos hábitos alimenticios, la contaminación ambiental, así como la exposición a agentes carcinogénicos como el tabaco y el alcohol, son reconocidos como un factor importante en el desarrollo de este padecimiento. Por el contrario, el consumo de frutas y verduras contribuye notablemente en la prevención de esta enfermedad.

La forma en que el organismo se libera de los compuestos carcinogénicos endógenos y exógenos (xenobióticos) es por medio de las enzimas de biotransformación de fase 1 y fase 2. Diversos estudios muestran que los fitoquímicos presentes en frutas y verduras inducen preferentemente una mayor actividad de enzimas de fase 2 y, por tanto, una desintoxicación más rápida del organismo de sustancias carcinogénicas. Por ello, el empleo de especies vegetales con capacidad para inducir enzimas destoxicantes de fase 2 se utiliza como una estrategia preventiva contra el desarrollo del cáncer. Lo anterior se basa en las siguientes razones: Primero, numerosos estudios epidemiológicos sugieren que un consumo de vegetales con alto contenido de compuestos fenólicos, entre los cuales se incluyen los flavonoides, reduce el riesgo de desarrollo de cáncer en diversos órganos, debido a las propiedades antioxidantes de estos compuestos. Segundo, evidencias bien fundamentadas establecen que la alimentación con ciertos vegetales induce enzimas de fase 2 en el organismo. Tercero, la vasta flora mexicana ofrece la oportunidad de obtener una amplia gama de metabolitos secundarios, que pueden formar parte de las diferentes estrategias en la prevención del cáncer. Todo esto permite llevar a cabo una prevención primaria como la estrategia más efectiva para evitar desde sus primeras etapas el desarrollo del cáncer.

Los conocimientos actuales sobre las causas del cáncer y las acciones preventivas y terapéuticas son muy amplios, pero en su conjunto no son aún efectivos. Por lo que es posible establecer el uso de nuevos recursos para prevenir enfermedades crónico-degenerativas utilizando vegetales con potencial quimioprotector, lo que justifica el estudio científico sobre diversas plantas para brindar una mejor alimentación y calidad de vida de las personas.

Debido a la relación directa entre la alimentación y la prevención del cáncer, se requiere entender los beneficios a la salud que pueden brindar los alimentos y generar las bases para desarrollar alimentos nutraceuticos. Considerado que la dieta actual está limitada a unas pocas especies vegetales respecto a la riqueza de la naturaleza, el presente protocolo se enfoca en la capacidad quimioprotectora que brindan las especies vegetales *Malva parviflora*, *Chenopodium murale* y *Portulaca oleraceae*, las cuales pueden utilizarse con fines productivos para la industria alimentaria y farmacéutica.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del cáncer

De acuerdo a estadísticas mundiales, el cáncer y los problemas cardíacos son las principales causas de muerte a comienzos del siglo XXI. El cáncer puede desarrollarse cuando una persona se expone, por alguna vía, a un carcinógeno o a un factor de carcinogénesis, como son los rayos ultravioleta y algunos virus, teniendo ésta cierto grado de susceptibilidad. Como consecuencia se desarrolla algún tipo de cáncer, padecimiento que engloba una gran diversidad de tumores malignos, dependiendo el tejido en el cual se desarrolle. Para que se desarrolle el cáncer, por lo general, se tiene presente algún carcinógeno, un agente promotor de cáncer y algún otro factor como son el estilo de vida y la contaminación ambiental, esto da como resultado la posible generación de una neoplasia (DeVita y col., 2004).

2.1.1 Definición de cáncer

El cáncer es una enfermedad en la cual clones de células mutantes empiezan a prosperar a expensas de sus células vecinas, destruyendo finalmente toda organización celular, ya que comienzan a reproducirse sin restricciones colonizando otros tejidos. Cuando las células neoplásicas permanecen agrupadas en tejido conjuntivo fibroso en una masa única, se dice que se tiene un tumor benigno, el cual puede extraerse quirúrgicamente; cuando las células del tumor invaden tejido circundante, se tiene un tumor maligno. Un tumor epitelial benigno se denomina adenoma y si es maligno se denomina adenocarcinoma. Al desarrollarse el cáncer a partir de una expansión clonal se acepta que la mayoría de los tumores se originan a partir de una célula mutada, Ciclos repetidos de mutaciones, competición y selección natural, que actúan dentro de una población de células somáticas, pueden provocar un rápido desarrollo del cáncer (Alberts y col., 2004).

Jacoby y col. (1991) exponen que el cáncer es un crecimiento tisular patológico originado por una proliferación celular continua con capacidad de

expansión local e invasión, ya que se trata de una acumulación de alteraciones genéticas en una serie de genes que tienen como consecuencia anomalías en el crecimiento y diferenciación celular. En la actualidad se reconoce la naturaleza fundamentalmente genética del cáncer y se han identificado varios de los genes mutados que intervienen en ella.

2.1.2 Mortalidad

En el 2005, 58 millones de personas murieron de cáncer en el mundo. Mas del 70% de los casos de cáncer ocurrieron en países en desarrollo, donde los recursos para su tratamiento y su prevención son pocos, limitados o no existen. Como consecuencia de ello, el cáncer ocupa un 13% de las muertes en el mundo y un 5% muere a causa del cáncer de colon (Organización Mundial de la Salud, 2005). El cuadro 1 muestra los diferentes porcentajes de casos de cáncer que ocurren en México, de acuerdo a datos recopilados del año 1997 al 2006 (INEGI, 2006), donde el cáncer afecta a un 12.5% de la población y el cáncer de colon representa un 4.4% de los principales tipos de cáncer, tanto en hombres como en mujeres, dato relevante que nos muestra que en México es indistinto el género en este padecimiento. De acuerdo a datos del INEGI la presencia de tumores malignos ha aumentado un 1.7% durante los últimos 15 años en la población mexicana. La mayoría de las personas desarrolla esta enfermedad a partir de los 40 años, pero esto no significa que las primeras etapas no se encuentren presentes antes de una edad mayor.

Cuadro 1. Distribución porcentual de los principales tipos de cáncer en México.

Cáncer en hombres	Porcentaje	Cáncer en mujeres	Porcentaje
Encéfalo	3.0	Encéfalo	2.4
Tráquea y pulmón	15.6	Tráquea y pulmón	6.9
Estómago	9.1	Mama	13.1
Hígado	7.5	Estómago	7.8
Páncreas	4.9	Hígado	7.9
Vías urinarias	3.0	Páncreas	5.2
Próstata	15.5	Ovarios	4.6
		Cuello uterino	13.3
Colon	4.4	Colon	4.4
Leucemia	6.3	Leucemia	5.5
Linfoma no Hodking	3.6	Linfoma no Hodking	2.6
Otros	27.1	Otros	26.3

INEGI, 2006.

2.1.3 Causas del cáncer de colon

Diversos estudios epidemiológicos indican que aproximadamente el 80% de los cánceres humanos son causados por la exposición a carcinógenos presentes en la dieta, en el humo del tabaco y en el lugar de trabajo (Kazerouni y col., 2001). Conjuntamente, la dieta con un bajo consumo de frutas y verduras es la causa más probable de un 35% de los diferentes cánceres en la población y particularmente es la causa de un 80% de los casos de cáncer de colon (Doll y Peto, 1981). El alto consumo de carne roja, de colesterol y grasa saturada está directamente implicado en el cáncer de colon, así como consumos bajos de fibra (DeVita y col., 2004). Cuando se tiene una dieta inadecuada y, además se tiene el hábito del consumo de alcohol y tabaco, el porcentaje de cualquier tipo de cáncer se incrementa en un 60%, permitiendo que el riesgo de padecer cáncer asociado a contaminación ambiental se incremente (Reddy y col., 2003).

Demark-Wahnefried y col. (2008) señalan que el factor crítico más importante que puede modificar el riesgo de padecer cualquier tipo de cáncer es evitar el consumo de tabaco, seguido de un control de peso, una dieta adecuada basada en

frutas y verduras, y actividad física constante de por lo menos 30 minutos al día. Se tiene evidencia de que un aumento de la actividad física, de hasta 60 minutos al día de ejercicio al día, reduce el riesgo de cánceres colorrectal y de vejiga.

Factores genéticos (susceptibilidad genética) se han identificado como determinantes importantes en el proceso de carcinogénesis, además de los factores hereditarios, así como la contaminación presente en la agricultura y generada por la industria (Reddy y col., 2003). Condiciones fisiopatológicas como son la colitis y la inflamación de Chron son también factores de riesgo de desarrollo de cáncer de colon (Suzuki, 2004).

2.2 Desarrollo del cáncer de colon

Al desarrollarse el cáncer a partir de una célula que ha experimentado una mutación, ésta requiere, para que se transforme en célula cancerosa, sufrir cambios genéticos posteriores, los cuales requieren de varias mutaciones adicionales ocasionadas por factores exógenos y endógenos. Por ello, el desarrollo del cáncer requiere de la presencia de mutaciones causadas por un factor que predisponga al desarrollo del cáncer (iniciación), y de un proceso de selección clonal. Este proceso consiste en que las mutaciones confieren a la célula una ligera ventaja de proliferación sobre las otras células. Una célula proveniente de la progenie mutada sufre subsecuentes mutaciones, lo que permitirá a sus descendientes proliferar de forma más descontrolada y formar un pequeño tumor benigno (promoción) al aumentar la tasa de crecimiento celular en las células mutadas. La presencia de mas mutaciones, más de 10, en este tumor permitirá formar una masa de células o tumor maligno (progresión), que a su vez podrán emigrar y formar colonias hijas en otros sitios del organismo (metástasis). Durante esta etapa de implantación se da la liberación de células tumorales desde el tumor primario y su anidación en otras superficies (Lodish y col., 2003). La progresión es la última etapa del cáncer, donde un grupo de células en expansión clonal se replican con mayor rapidez para dar lugar a un tumor, lo que da lugar a importantes eventos fisiológicos que se dan forma progresiva como es la angiogénesis y daño en la respuesta inmune. La angiogénesis es la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos

preexistentes con lo que facilita una rápida metástasis del tumor en todo el organismo, al proporcionar una vía fácil para que las células metastásicas escapen hacia otros lugares. Por ello, las neoplasias benignas vascularizadas tienen a crecer más rápido que los tumores benignos con menos irrigación sanguínea. La proliferación y supervivencia de las células depende de características de independencia como son la invasión a otros tejidos y una alta tasa de crecimiento, por eso el cáncer se define como un conjunto de células que toman el control de su crecimiento, es decir, autocontrol (Casarett y col., 2001; Finley, 2005).

De manera similar, la teoría de la carcinogénesis colónica sugiere una progresión ordenada en el desarrollo del tumor (DeVita y col., 2004):

1. Mucosa normal en el colon
2. Mucosa hiperproliferativa con presencia de inflamación
3. Pólipos pequeños con bajo potencial maligno
4. Pólipos de mayor tamaño y con displasia
5. Células transformadas pero no invasivas (carcinoma)
6. Tumores invasivos pero no metastásicos
7. Tumores con metástasis

Esta progresión del cáncer nos muestra las diversas etapas que se presentan en este padecimiento, que en términos generales se refiere a la formación de adenomas y posterior formación de adenocarcinomas. Además, en el cáncer de colon este proceso puede llevarse a cabo durante muchos años.

2.2.1 Mutaciones en el cáncer de colon

Una mutación puede proporcionar a una célula una ventaja selectiva, permitiendo que se reproduzca más vigorosamente que sus vecinas y convirtiéndose en la fundadora de una clona mutante en crecimiento. Ciclos repetidos de mutaciones, competición y selección natural que actúan dentro de una población de células somáticas provocarán problemas que darán lugar al cáncer; los modelos animales confirman que se requieren quizá diez o más mutaciones en una célula. En

las células neoplásicas cada barrera física y fisiológica que se presente al tumor se supera por medio de mutaciones adicionales; además, se pierde la capacidad de llevar a cabo la apoptosis, y se supera el proceso de “senescencia replicativa”, de forma que la inmortalización de las células cancerosas es un efecto con el cual se pierden los controles del ciclo celular (Alberts y col., 2004).

Diversos genes supresores de tumores codifican proteínas que inhiben la progresión del ciclo celular. La mayoría de las células de una neoplasia colónica contienen una o dos mutaciones iguales del gen de supresión tumoral poliposis adenomatosa colónica (APC), que conducen a su pérdida o inactivación; en consecuencia, son clones de las células en las que tuvieron lugar las mutaciones originales. En este punto se forma un pólipo pequeño en la pared del colon. Mutaciones posteriores, como es la activación del oncogén *k-ras*, mutado en un 50% de los adenocarcinomas, la pérdida de los genes de supresión tumoral *DCC* y *p53*, que no se expresa en un 75% de los carcinomas colorrectales, generan una célula maligna portadora de al menos cuatro mutaciones. Mutaciones adicionales inducen la salida de las células tumorales al torrente sanguíneo y su proliferación en sitios distantes. Por lo general, el DNA de distintos carcinomas de colon humano contiene mutaciones en todos estos genes (Lodish y col., 2003, DeVita y col., 2004). La figura 1 muestra la sucesión de mutaciones presentes en el proceso de carcinogénesis de acuerdo a Itzkowitz y Yio (2004).

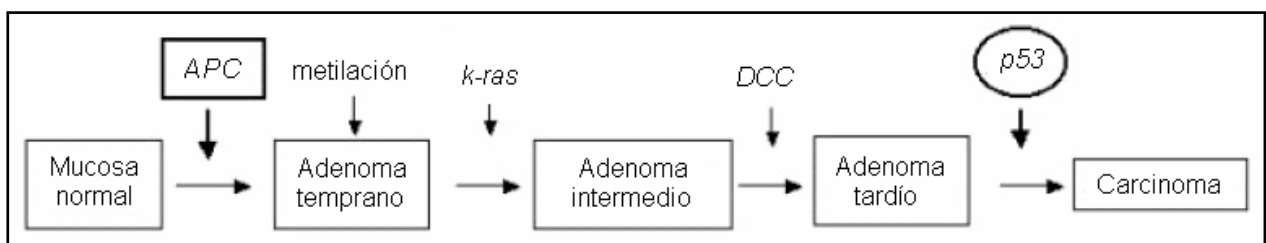


Figura 1. Sucesión de mutaciones importantes presentes en el proceso de cáncer colorrectal (Itzkowitz y Yio, 2004).

La frecuencia de la alteración o mutación de estos genes en el desarrollo de cáncer de colon sugiere que pueden utilizarse como biomarcadores moleculares y con ello poder detectar el cáncer en distintas etapas.

2.3 Carcinógenos colónicos

Un carcinógeno es un agente que cuando se administra a los animales sin tratamiento, o bien, en condiciones normales, incrementa significativamente la incidencia de neoplasias de uno o más tipos histogénéticos, comparado con la incidencia en animales sin tratamiento o controles (Casarett y col., 2001). Un elemento importante para entender los eventos iniciales de la carcinogénesis es la activación metabólica de los carcinógenos químicos (denominados procarcinógenos) para transformarse en reactivos electrófilos, los cuales interactúan con el DNA para que tenga lugar una mutación (Ramos-Gómez y col., 2001).

2.3.1 Efectos carcinogénicos de la 1,2-dimetilhidracina (DMH)

La 1,2-dimetilhidracina (DMH) es una sustancia tóxica que se ha reportado como un procarcinógeno específico al colon. Los estudios llevados a cabo en animales muestran que la DMH ocasiona tumores colorrectales de origen epitelial con similar histología, morfología y anatomía que los tumores colorrectales de pacientes con cáncer de colon. Este procarcinógeno proporciona un modelo adecuado para el estudio del cáncer colorrectal. Sin embargo, se requieren tratamientos prolongados con esta sustancia (20-40 mg/kg _{PC}) para inducir neoplasias en el colon distal (Wang y col., 2004).

Después de la biotransformación por enzimas de fase 1, la DMH da como resultado productos electrofílicos que se generan principalmente en hígado y riñones como el ion diazonio, el cual se conoce genera estrés oxidativo. Diversos estudios sugieren que los compuestos fenólicos actúan como agentes quimioprotectores, contrarrestando el estrés oxidativo inducido por carcinógenos como la DMH.

En la figura 2 se muestra la biotransformación de la DMH *in vivo*. Las enzimas de fase 1, principalmente las enzimas flavin-monooxigenasas, forman metilazoximetanol a partir de la DMH en el hígado, así como en diversos tejidos del organismo, al cual se le adiciona o conjuga ácido glucorónido por la enzima de fase 2 UDP-glucoronosil transferasa (GST), para ser excretado posteriormente por la

bilis. En el colon, la flora intestinal facilita la hidrólisis del conjugado a través de la enzima β -glucoronidasa, liberando el metilazoximetanol lo que da lugar al ión carbonio (CH^{3+}); el radical formado genera aductos en el DNA (Nagaswa y col., 1972).

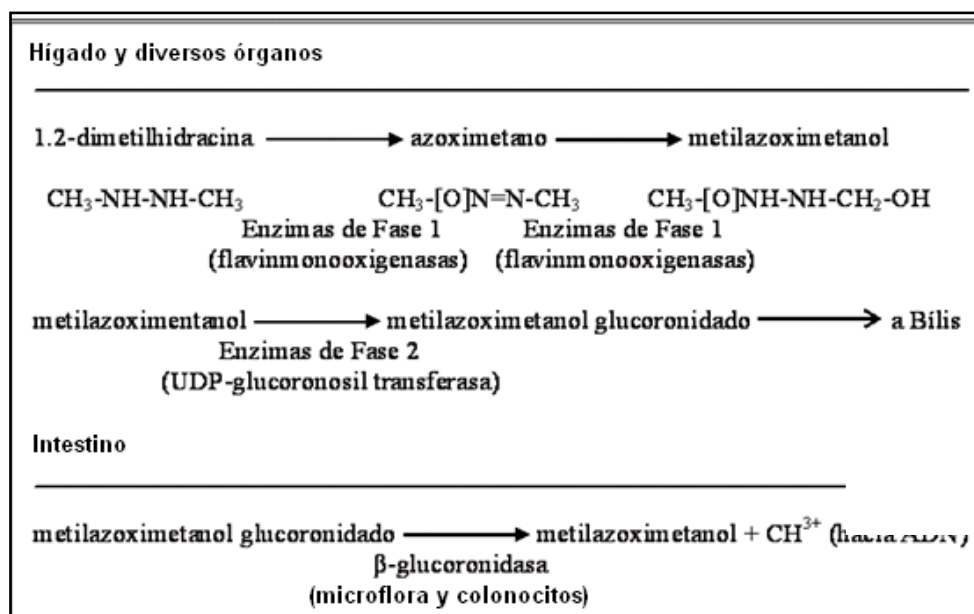


Figura 2. Biotransformación de la 1,2-dimetilhidracina.

El carcinógeno final generado por el organismo a partir de la DMH es el ión carbonio (CH^{3+}). Colussi y col. (2001) reportan que el DNA interactúa con el ión carbonio formando los aductos O^6 -metilguanina ($\text{O}^6\text{-MeG}$), los cuales ocasionan daños en el DNA que son reparados por el mecanismo de reparación de recombinación homóloga de cadenas. A pesar de no estar presente algún carcinógeno es común encontrar los aductos $\text{O}^6\text{-MeG}$ en el colon sano, lo que sugiere que las metilaciones son persistentes y no llegan a ser reparadas por los mecanismos de reparación del genoma. El mecanismo de reparación de recombinación homóloga de cadenas existe en todo el aparato digestivo, pero es poco eficiente en el colon frente a las metilaciones de la DMH. La enzima encargada de arreglar el exceso de metilaciones en el genoma, causadas por diversos agentes, en el organismo es la metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT); una baja actividad de esta enzima se asocia con un riesgo alto de padecer cáncer de colon. Con respecto a ello, los niveles de MGMT son bajos en colon, por lo que se tiene un riesgo constante al cáncer (Jackson y col., 2003). Estudios con animales muestran

que después de 15 semanas de tratamiento con la DMH (21 mg/kg de peso corporal por semana), se detectan mutaciones en el gen *k-ras* en el colon de ratas macho albino Sherman. En el codón 12 del gen *k-ras* se presenta un cambio de las bases nitrogenadas de la secuencia GGT por GAT en un 45% de las mutaciones, mientras que en el codón 13 se presenta un cambio de GGC por GAC en un 18% de las mutaciones. El cambio de guanina por adenina es ocasionado por las metilaciones y fallos en el sistema de reparación del genoma (Jacoby y col., 1991).

De acuerdo a la literatura, los tumores intestinales inducidos con la DMH se agrupan de acuerdo a las siguientes categorías macroscópicas (Figura 3):

Tumores sesiles (A): masas que brotan sobre la superficie mucosa y con un diámetro máximo mayor que el de su unión a la mucosa y muy cercanos a la misma.

Tumores pedunculados (B): pólipos con un tallo claramente visible.

Tumores exofíticos (C): tumores usualmente polipoides emergiendo hacia la luz intestinal; presentan un margen elevado con una cavidad central y una masa subyacente lobulada que generalmente, distiende la serosa subyacente.

Tumores endofíticos (D): tumores en forma de meseta o ulcerativos con tendencia ligera o nula a abultar hacia la luz. Por lo regular son tumores constrictivos, denominados también tumores fungoides.

Placas (E): lesiones con una superficie relativamente plana, ligeramente por encima del nivel de la mucosa.

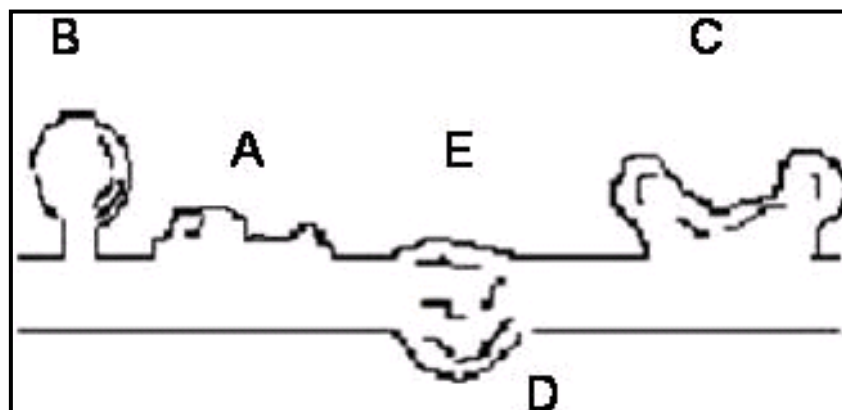


Figura 3. Tipos de tumores inducidos por 1,2-dimetilhidracina en roedores (Adaptado de Piñols, 1998).

2.4 Estrategias de protección contra la carcinogénesis

Debido a que la mayoría de los carcinógenos presentes en los alimentos, en el humo del tabaco y en el lugar de trabajo son indirectos, es decir, requieren de una activación metabólica por medio de sistemas enzimáticos endógenos para ejercer su efecto tóxico biológico, se ha propuesto a la modulación de la activación metabólica de estos procarcinógenos a las especies intermediarias mutagénicas como un mecanismo de quimioprotección (Prester y col., 1993). Así mismo, la activación metabólica de estos procarcinógenos puede generar la producción de radicales libres y de especies reactivas del oxígeno generando daño oxidativo al DNA e induciendo mutaciones en los sitios de guanina y citosina (G-C) de genes supresores de tumores, las cuales pueden conducir a citotoxicidad y genotoxicidad. Por ello, antioxidantes y enzimas destoxificantes pueden bloquear la carcinogénesis por acción inhibitoria de los procarcinógenos del medio ambiente y el atrapamiento de radicales libres. Por lo tanto, el incremento de la actividad de estas enzimas de forma natural o por compuestos sintéticos, pueden disminuir la toxicidad inducida por carcinógenos e inhibir la tumorigénesis en otros órganos.

2.4.1 Enzimas destoxificantes de fase 2

La bioactivación de los carcinógenos generalmente involucra dos etapas, a las cuales se les ha denominado como reacciones de fase 1 y fase 2. Las reacciones de fase 1 son llevadas a cabo principalmente por el sistema enzimático de mono-oxigenasas del citocromo P450 e involucra la introducción o exposición de grupos funcionales en la molécula del carcinógeno. Generalmente, las reacciones de fase 1 dan como resultado la bioactivación de procarcinógenos a sus metabolitos reactivos, siendo el objetivo de las reacciones de fase 1 permitir que la sustancia sea más hidrofílica, lo que favorece su excreción, sin importar si le hace más electrofílica.

Por otro lado, las reacciones de fase 2 incluyen reacciones de conjugación catalizadas por las enzimas glutatión-S-transferasas (GSTs) y UDP-glucuronosil transferasas (UGTs); reacciones de reducción catalizadas por la enzima NAD(P)H:

quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), y reacciones de hidrólisis catalizadas por la enzima époxido hidrolasa (EH), las cuales en la mayoría de los casos conducen a la desintoxicación de los carcinógenos del organismo (Casarett y col., 2001). Por lo tanto, la cantidad del carcinógeno final disponible para interactuar con el DNA representa, en parte, un balance competitivo entre las reacciones de bioactivación (fase 1) y de desintoxicación (fase 2). En la figura 4 se muestra la biotransformación de xenobióticos.

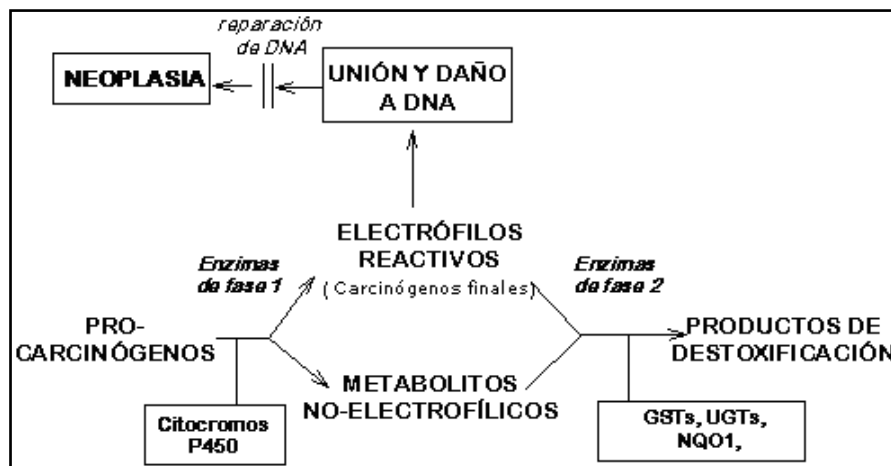


Figura 4. Biotransformación de xenobióticos
(Adaptado de Talalay, 2000).

En base a la capacidad de inducción de sistemas enzimáticos para diferentes componentes de la dieta, Prochaska y Talalay (1988) definieron a los inductores monofuncionales como aquellos compuestos electrofílicos que selectivamente inducen enzimas destoxicantes de fase 2, sin ocasionar efecto alguno en la inducción de enzimas de fase 1. Por otro lado, los inductores bifuncionales tiene la capacidad de elevar la actividad de enzimas de fase 2, así como de enzimas de fase 1. En el área de quimioprotección de cáncer, aquellos compuestos que inducen preferentemente enzimas de fase 2 son considerados generalmente como benéficos ya que estimulan la desintoxicación de carcinógenos de organismo. La desintoxicación celular es crucial para el mantenimiento de la salud y contra la exposición diaria a varios xenobióticos como las drogas y los agentes contaminantes.

Varios elementos de respuesta que confieren sensibilidad a los diversos grupos de inductores se han identificado en las regiones promotoras o regulatorias de los genes que codifican para las enzimas de fase 1 y fase 2. El Elemento de Respuesta a Antioxidantes (ARE, 5'-GTGACNNGC-3'), también denominado Elemento de Respuesta a Electrófilos (EpRE), se identificó originalmente en la región promotora de los genes de fase 2 *Gst Ya* y *Nqo1* de la rata (Rushmore y col., 1991) y responde preferentemente a inductores monofuncionales.

Diversos estudios muestran que al incrementar la actividad en las enzimas de fase 2 se disminuyen los electrófilos reactivos que producen daño y mutaciones al DNA. Con respecto a las plantas comestibles existentes en nuestro país y, más específicamente en el Estado de Querétaro, existen pocos reportes científicos acerca del posible efecto del consumo de estas especies vegetales sobre la prevención y/o modulación del proceso de carcinogénesis, por lo que es necesario establecer bases más sólidas para sugerir con fundamento científico el uso de materiales comestibles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades crónico-degenerativas.

Aunque un mecanismo no puede explicar todas las formas de quimioprotección, está claro que la inducción de enzimas de fase 2 es un mecanismo importante de protección contra agentes tóxicos y los efectos neoplásicos de carcinógenos químicos (Prochaska y Talalay, 1988).

2.4.2 Factor de transcripción Nrf2 como mecanismo de quimioprotección

La quimioprotección se puede definir como una estrategia para reducir el desarrollo del cáncer a través de la prevención, el retraso y la reversión de la misma enfermedad, por la ingesta dietética o farmacológica de agentes capaces de modular la carcinogénesis, e impedir el desarrollo del cáncer invasivo. La premisa de la quimioprotección humana es que se puede intervenir alguno de los diferentes pasos de la carcinogénesis (DeVita y col., 2004).

El factor de transcripción Nrf2 (por sus siglas en inglés, NF-E2-related factor 2) pertenece a la familia de proteínas de cremallera de leucina, tiene un peso molecular de 66 kDa y la porción amino terminal es rica en ácido glutámico y aspártico (Moi y col., 1994). Esta proteína se expresa principalmente en músculo, hígado, pulmón y tracto digestivo (fetos), así como en músculo e hígado (adulto); aunque se encuentra en cualquier tejido, Nrf2 tiene una mayor expresión en aquellos tejidos que están expuestos continuamente a la contaminación ambiental. Así mismo, Nrf2 se expresa en diversos tejidos en los mismos sitios de expresión de enzimas de fase 2 y de proteínas detoxificantes, las cuales se activan por xenobióticos y antioxidantes presentes en el organismo. Se ha reportado que ratones sin el gen *nrf2* presentan alteraciones en el equilibrio de enzimas de fase 2 (bajos niveles basales e inducibles) (Ramos-Gómez y col., 2001). Además, ratones con mutaciones en la región promotora del gen *nrf2* tienen una mayor predisposición a padecer enfermedades respiratorias y cáncer al presentarse deficiencias en el sistema de desintoxicación celular (Chan y col., 1999). Por ello la identificación de alimentos que aumenten la expresión de Nrf2 proporciona información de inductores de enzimas y, por lo tanto, de agentes quimioprotectores.

Diversos estudios *in vivo* han demostrado que una gran variedad de compuestos de la dieta o sus metabolitos pueden inducir la activación de sistemas detoxificantes tales como las enzimas de fase 2 glutatión-S-transferasa (GST) y quinona reductasa (NQO1), lo que pudiera estar regulado por el factor Nrf2 (Clapper y col., 1997).

Mediante el análisis de la estructura y de los dominios funcionales del factor de transcripción Nrf2, Itoh y col. (2003) demostraron que Nrf2 es regulado mediante compartimentalización subcelular, directamente y de manera negativa, por una proteína citoplasmática denominada Keap1. En ausencia de un estímulo o estrés externo, Keap 1 mantiene secuestrado a Nrf2 en el citoplasma. La adición de agentes electrofílicos, especies reactivas del oxígeno o agentes inductores monofuncionales, causa la disociación de Nrf2 de su supresor citoplasmático Keap1. Una vez disociado, Nrf2 transloca del citoplasma al núcleo donde heterodimeriza principalmente con miembros de la familia de proteínas pequeñas Maf para unirse al ARE presente en la región promotora de los genes que codifican para enzimas

destoxificantes y antioxidantes. Así mismo, varios estudios han confirmado la participación del complejo Nrf2-Keap1 en la respuesta de “contra ataque” a agentes electrofílicos y especies reactivas de oxígeno (Ishii y col., 2000).

Nrf2 regula la expresión de genes a través de ARE, ya que un incremento en los niveles de Nrf2 en núcleo está relacionado con el aumento de la actividad transcripcional de los genes que codifican para enzimas destoxificantes de fase 2, corroborando la participación del factor de transcripción Nrf2 en la expresión de enzimas de fase 2 como GST y NQO1 (Ramos-Gómez y col., 2001; Kwak y col., 2002). Estudios posteriores han confirmado que la región ARE también participa en la activación transcripcional de otras enzimas y proteínas antioxidantes, tales como la catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, o de la gama-glutamil cistín sintasa que participa en la síntesis del glutatión reducido (GSH), que forman parte del sistema de defensa celular contra el estrés ambiental y que responde principalmente a inductores monofuncionales, permitiendo una desintoxicación de los carcinógenos ambientales, proporcionando así un mecanismo que impide la formación de tumores.

El papel de las enzimas de fase 2 contra el proceso de carcinogénesis es importante ya que enzimas como la GST y NQO1, cuando se encuentran elevadas en el hígado de ratas como consecuencia de la administración de compuestos antioxidantes, como los polifenoles y flavonoides, forman parte de un mecanismo que protege contra la formación de neoplasias y la toxicidad (Ramos-Gómez y col., 2001). Por lo tanto, la inducción de enzimas de fase 2, las cuales neutralizan electrófilos reactivos y actúan indirectamente como antioxidantes, es un importante mecanismo de protección contra la carcinogénesis.

Con respecto a los polifenoles y flavonoides, se han estudiado varias de sus funciones biológicas, entre ellas la actividad antioxidante, así como los efectos antimutagénicos y anticarcinógenos por la capacidad que tiene de donar electrones, inhibir la acción de peróxidos. En las plantas, estos compuestos tienen la capacidad de absorber a radiación ultravioleta. Se sabe que los polifenoles pueden ejercer sus efectos antimutagénicos a través de la inducción de enzimas de fase 2, el bloqueo de la activación del carcinógeno final, la inhibición de la unión covalente del

carcinógeno con el DNA y la inducción de apoptosis. Esto confirma el amplio espectro de acción de los polifenoles en la prevención y tratamiento del cáncer. Las especies nutraceuticas seleccionadas en este estudio representan una fuente potencial importante para llevar a cabo la evaluación *in vivo* de los extractos sobre la inducción de enzimas de fase 2 y posteriormente determinar su posible potencial quimioprotector en un modelo de cáncer de colon.

2.5 Alimentos nutraceuticos

Los agentes nutraceuticos son compuestos quimicos que brindan beneficios a la salud, generalmente son derivados naturales usualmente fitoquimicos o compuestos bioactivos presentes en las plantas. Los agentes nutraceuticos son sustancias o compuestos que pueden presentarse como suplementos de la dieta y alimentos funcionales, estos últimos alimentos se conocen también como alimentos fortificados, ya que son enriquecidos con compuestos bioactivos. Todo producto nutraceutico, que no es conocido a nivel comercial, requiere información agricola, proporciones de los ingredientes, aspectos de manufactura y distribución. Estos alimentos resaltan un nuevo énfasis en la calidad de un producto alimenticio: una reducción de la patogénesis de las enfermedades crónicas, una asociación con los costos a la salud y, finalmente, una mejor calidad de vida, así como nuevas características en los alimentos y la diferenciación de productos (Mark y col., 2006).

Para llevar a cabo la obtención de un producto nutraceutico se requiere la caracterización del extracto con los componentes antioxidantes de la planta que se estudia, la identificación de los compuestos bioactivos, la estandarización de un extracto, el estudio de toxicidad en animales y llevar a cabo controles clínicos para el éxito y seguridad del nuevo producto. Finalmente, todo producto nutraceutico requiere que se examine la biodisponibilidad de las diversas sustancias quimicas que contiene, por lo que es importante conocer los ingredientes activos, para finalmente definir la calidad del producto. Esto es importante para que el consumidor obtenga los beneficios clínicos que otorgan estos alimentos (Ho y Zheng, 2001).

El consumo de frutas y verduras aporta protección contra el cáncer por medio de “compuestos bioactivos” que inducen una gran variedad de funciones fisiológicas y actúan indirectamente o directamente como antioxidantes, regulando enzimas de fase 2 (GST y NQO1) y antioxidantes (catalasa y superóxido dismutasa), así como controlando la apoptosis y la modulación del ciclo celular. Entre los compuestos bioactivos, que son comunes en los vegetales, se tiene los carotenoides, glucosinolatos, polifenoles, selenocompuestos los cuales son generalmente fitoquímicos que proporcionan mejor sabor, aroma y color a las frutas y verduras. Los compuestos bioactivos de frutas y verduras disminuyen el riesgo de cáncer colorrectar, de faringe, vejiga, pulmón e hígado (Finley, 2005).

La mayoría de los polifenoles en las plantas son fenoles y flavonoides (flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavonas, flavonoles y antocianinas). En la actualidad se conocen cerca de 3000 compuestos de flavonoides, varios de los cuales tienen una toxicidad baja en mamíferos y algunos de ellos son utilizados ampliamente en la medicina (Finley, 2005). Se ha sugerido que los flavonoides y otros compuestos fenólicos desempeñan un papel preventivo en el desarrollo de cáncer, inhibiendo *in vitro* el crecimiento de varias líneas celulares transformadas y reduciendo el desarrollo de tumores en experimentos con animales (Narayana y col., 2001).

2.6 Especies vegetales del Estado de Querétaro con potencial nutracéutico

Existe una gran variedad de plantas con propiedades antimicrobianas, antioxidantes, alimenticias y medicinales que mejoran significativamente algunos aspectos de la salud y nutrición. Estudios epidemiológicos han demostrado que especies vegetales con alto contenido de metabolitos de naturaleza fenólica previenen el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas. Por lo que en este estudio se trabajó con extractos acuosos de especies vegetales comestibles en el Estado de Querétaro tales como malva de quesitos (*Malva parviflora*), quelite (*Chenopodium murale*) y verdolaga (*Portulaca oleraceae*), ya que en estas especies vegetales se ha reportado un alto contenido de fenoles y flavonoides respecto a otras especies vegetales (González, 2007). El cuadro 2 muestra el uso tradicional de

diversas especies vegetales entre las cuales se encuentran las del presente estudio (Suárez y col., 2004), así como su contenido de fenoles y flavonoides totales, sobre los cuales se comentará más adelante.

Cuadro 2. Contenido de fenoles, flavonoides totales y uso de diversas especies vegetales.

Especie en estudio	Usos	Fenoles (mg equivalentes ácido gálico/g extracto acuoso) *	Flavonoides (mg equivalentes catequina/g extracto acuoso) *
<i>Melampodium perfoliatum</i>	Comestible	52.88 ± 0.67	51.83 ± 0.10
<i>Amaranthus hybridus</i>	Comestible, forrajero y medicinal	52.32 ± 0.75	49.82 ± 1.18
<i>Porophyllum tagetoides</i>	Comestible	47.29 ± 0.92	44.76 ± 0.33
<i>Malva parviflora</i>	Comestible, forrajero y medicinal	34.39 ± 0.30	26.98 ± 1.46
<i>Chenopodium murale</i>	Comestible, forrajero	30.82 ± 1.06	20.27 ± 0.90
<i>Nasturtium officinale</i>	Comestible y medicinal	30.62 ± 0.91	15.83 ± 0.12
<i>Brassica rapa</i>	Comestible, forrajero y medicinal	25.91 ± 0.31	13.46 ± 0.21
<i>Portulaca oleraceae</i>	Comestible	25.48 ± 0.32	12.17 ± 0.47

Suárez y col., 2004; *González 2007.

2.6.1 *Malva parviflora*

Nombre común: Malva o Malva de quesitos; Familia: Malvaceae

Malva parviflora es una planta herbácea, rastrera o ascendente, de usualmente 50 centímetros de alto; con tallo casi glabro y con hojas orbiculares de 2.5 cm de largo por 6 cm de ancho (Figura 5). Las flores se presentan durante todo el año y se encuentran de 1 a 4 flores en las axilas de las hojas, de 8 a 12 mm de diámetro, éstas pueden ser de color lila o blanco. El fruto es un esquizocarpio de 5 a 10 mm de diámetro (Frixell, 1993).

La malva se encuentra distribuida en altitudes de entre 2,250 a 2,950 metros sobre el nivel del mar y es originaria de Europa y adventicia en América. En el estado de Querétaro, esta planta se encuentra en los municipios de Amealco, Cadereyta, Colón, Corregidora, El Marqués, Ezequiel Montes, Huimilpan, Pedro Escobedo, Peñamiller, Pinal de Amoles, Querétaro de Arteaga, Tolimán y Tequisquiapan.

En el municipio de Pedro Escobedo, la malva se utiliza como alimento en estado tierno. En los municipios de Huimilpan, Pedro Escobedo y Corregidora se utiliza como planta medicinal para golpes y en Tolimán para curar heridas. En Amealco, la malva se usa como planta medicinal para combatir la tos, hervida con canela. La malva actúa principalmente como desinflamatoria, también para bajar la fiebre, así como para lesiones en la piel (Suárez y col., 2004).

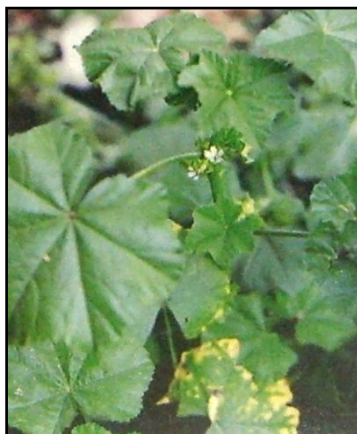


Figura 5. Fam. Malvaceae, *Malva parviflora*.

Los extractos de *M. parviflora* inhiben el crecimiento de *Micobacterium tuberculosis* (Jiménez-Arellanes y col., 2003), presentan actividad antiinflamatoria y antibacterial (Shale y col., 2005). Así mismo, las semillas de la planta de *M. parviflora* exhiben un efecto antifúngico (Wang, 2001). Adicionalmente, esta planta es una fuente importante de tiamina (Meyer, 1989).

González (2007) reporta un contenido de fenoles totales de 30.82 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto acuoso y de flavonoides totales de 20.27 mg equivalentes de catequina/g de extracto acuoso. Por otro lado, Miranda (2005)

reporta un contenido de fenoles totales de 298 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto metanólico y de flavonoides totales de 10.9 mg equivalentes de catequina/g de extracto.

2.6.2 *Chenopodium murale*

Nombre común: Quelite o Quelite de pollo; Familia: Chenopodiaceae

Chenopodium murale es una planta herbácea, erecta de 20 hasta 50 cm de alto, su tallo es profundamente ramificado desde la base y farinoso. Las flores son de color verde y pequeñas, agrupadas en panículas (Figura 6); las hojas son rómbico ovaladas de 2 a 8 cm de largo. Las inflorescencias están en forma de pequeños glomérulos, en cimas o panículas axilares o terminales, más bien cortas, y los frutos presentan pericarpios de color negro (Rzedowski, 1979).

Esta planta es originaria de Eurasia y naturalizada ampliamente en América; habita en climas templados entre los 2,100 y 2,200 metros sobre el nivel del mar, además habitando en climas semiseco y templado. La planta se localiza en los municipios de Amealco, Cadereyta y Peñamiller (Suárez y col., 2004). El quelite se cultiva como ornamental; las raíces se utilizan en medicina casera, principalmente para infecciones en la piel, padecimientos renales y para controlar el vomito. En Cadereyta, esta planta como alimento (Suárez y col., 2004).



Figura 6. Fam. Chenopodiaceae, *Chenopodium murale*.

Se ha reportado el aislamiento de triglicósidos de kaemferol (flavonoides glicosilados), flavonoides y aceites esenciales del extracto metanólico de esta planta

(Gohar y col., 2000), así como una cumarina y tres agliconas nuevas a partir de los extractos de una variedad *C. murale*, cuyas hojas se utilizan en ensaladas y las semillas en panes, fermentos de bebidas y también como alimento para animales (El-Sayed y col., 1999). Así mismo, la planta ha mostrado actividad citotóxica contra células amnióticas de epitelio (Awadh y col., 2001). La especie presenta actividad hipotensora (disminución de la presión arterial) e inducción de la actividad de la enzima quinona reductasa (NQO1) en rata y conejo (Gohar y Elmanzar, 1997).

González (2007) reporta para el extracto acuoso de *C. murale* un contenido de fenoles totales de 30.62 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto y de flavonoides totales de 15.83 mg equivalentes de catequina/g de extracto acuoso. Así mismo, Miranda (2005) reporta un contenido de fenoles totales 363 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto y de flavonoides totales de 13.8 mg equivalentes de catequina/g de extracto metanólico.

2.6.3 *Portulaca oleraceae*

Nombre común: Verdolaga; Familia: Portulacaceae

La verdolaga es una hierba anual, suculenta (contiene alrededor del 90% de agua); con tallo glabro postrado o ascendente, de color rojizo o verde, generalmente muy ramificado en la base; posee ramas extendidas en forma radial desde la base de la planta, de 20 a 40 cm de largo. Las hojas son espatuladas y aplanadas, alternas a menudo esparcidas en aglomeraciones sobrepuestas. La inflorescencia generalmente terminal es pequeña, con racimos de 2 a 6 flores amarillas agrupadas en panículas, las cuales se abren en las mañanas (Figura 7). La verdolaga posee numerosas semillas, pardo oscuras a negro o azuladas y el fruto es un pixidio, oblongo transversalmente dehiscente de color café claro (Donna y col., 1986; Rashed y col., 2003). La verdolaga es una planta de rápido crecimiento, compatible con otros cultivos y produce una gran cantidad de semillas con una alta viabilidad (Liu y col., 2000).



Figura 7. Fam. Portulacaceae, *Portulaca oleracea*.

Esta planta es originaria de la India y actualmente se encuentra distribuida en todo el mundo, además es muy frecuente encontrarla en los cultivos, en jardines como planta ornamental y en algunas áreas se destina a la producción agrícola. En las regiones templadas y tropicales del mundo, la verdolaga posee una gran distribución ya que es una planta cosmopolita. Entre los usos que se le dan es una planta comestible, se utiliza como verdura cocida, a menudo los tallos y las hojas se comen en ensaladas. En el estado de Querétaro, la *Portulaca oleracea* se encuentra en forma silvestre en los municipios de Amealco, Colón, Cadereyta, El Marqués, Ezequiel Montes, Pedro Escobedo, Peñamiller y Tequisquiapan. Así mismo, en los cultivos la verdolaga se encuentra en las condiciones ideales para su crecimiento, por lo que es posible encontrarla como maleza (Suárez y col., 2004).

Portulaca oleracea se utiliza en la medicina tradicional como diurético, antiséptico, antiespasmódico, febrífugo y vermífugo, para aliviar el dolor y la inflamación. En la península arábiga, la verdolaga se corta usualmente en pequeños trozos tanto hojas como semilla, se cocinan o se usan tópicamente para infecciones en la piel. El jugo de las hojas en compresa se aplica en la sien para evitar el exceso de calor, la infusión de las hojas se utiliza como diurético. Esta planta se ha estudiado exhaustivamente en Nigeria y Escocia principalmente por su actividad como relajante muscular. Por otro lado, la administración intravenosa de 200 mg/kg de verdolaga produce convulsiones en ratones por el alto contenido de potasio de esta planta (Radhakrishnan y col., 2001). En México, la verdolaga se utiliza también

en usos medicinales relacionados con problemas digestivos, tales como infecciones intestinales, estreñimiento y parásitos.

Se han encontrado diversas propiedades farmacológicas en estudios científicos, Zhang y col. (2002) encontraron propiedades antibacteriales; Chan y col. (2000) atribuyen capacidades analgésicas y antiinflamatorias; Okwuasaba y col. (1986) descubrieron el mecanismo por el cual actúa como relajante del músculo esquelético, también observaron que es una planta utilizada para calmar el dolor; Radhakrishnan y col. (2001) demuestran la capacidad antiespasmódica al relajar la actividad locomotora del sistema nervioso central o del músculo esquelético.

En cuanto a la composición, esta planta presenta lípidos ricos en ácidos grasos esenciales poliinsaturados y se ha demostrado que tienen un papel importante en enfermedades del corazón. Se ha reportado la verdolaga como un vegetal rico en ácido α -linoleico y β -caroteno, 100 g de las hojas contienen 200 mg de ácidos grasos de cadena corta y 2.5 g de β -caroteno, además de presentar un 50% de ácido α -linolénico en el total de ácidos grasos (Liu y col., 2000; Palaniswamy y col., 2001).

Portulaca oleraceae es una planta que puede utilizarse en un futuro por su alto contenido nutricional y propiedades antioxidantes. Además, la verdolaga es un excelente recurso de antioxidantes como son vitamina A, C y E, que tienen la habilidad de neutralizar radicales libres, con lo que se tiene el potencial de prevenir el cáncer, los padecimientos cardiovasculares y enfermedades infecciosas (Liu y col., 2000). *Portulaca oleracea* contiene betalaínas, así como antocianinas. Las betalaínas son hidrosolubles y consisten tanto en betacianinas, que dan un color rojo-violeta, como en betaxantinas, que dan un color amarillo. De las hojas se han aislado compuestos del grupo de las betacianinas, oleraceinas I y II (Xiang y col., 2005).

2.6.4 Potencial nutracéutico de especies vegetales bajo estudio

Diversos estudios se han realizado por el grupo de trabajo para determinar el potencial nutracéutico de las especies vegetales bajo estudio. Por ejemplo, González (2007) determinó el contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos acuosos de *M. parviflora*, *C. murale* y *P. oleraceae* encontrado para fenoles totales valores entre 30-35 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto acuoso y para flavonoides totales valores entre 15-27 mg equivalentes de catequina/g de extracto. En este estudio también se determinó la capacidad antioxidante por el método DPPH, el cual consiste en medir la decoloración del reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) tomando como referencia el Trolox como antioxidante, encontrándose que de acuerdo a la CE_{50} (concentración a la cual se observa el 50% de la actividad antirradical), la mayor capacidad antioxidante fue para el extracto de *M. parviflora* (270.14 μ g equivalentes de Trolox/ml de extracto), seguido de *P. oleraceae* y *C. murale* con una actividad de 1496.3 y 3981.0 μ g equivalentes de Trolox/ml de extracto, respectivamente. Por otro lado, Miranda (2005) reporta para *P. oleraceae* un contenido de fenoles totales de 808 mg equivalentes de ácido gálico/g y de flavonoides de 61.2 mg de equivalentes de catequina/g de extracto metanólico.

Gutiérrez (2006) determinó la capacidad inductora de los extractos acuosos de *M. parviflora* y *C. murale* sobre la actividad de enzimas de fase 2 (GST y NQO1) en hígado de rata Sprague-Dawley, encontrando un aumento significativo de la actividad de GST (1.2 veces) con las dosis de 100 y 200 mg/kg de *C. murale* y en la actividad de NQO1 con 100 mg/kg de *M. parviflora*, ambas respecto al grupo control. Estos resultados demuestran la capacidad de estos vegetales para inducir enzimas de fase 2. Similarmente, Piña-Zentella (2007) determinó la capacidad inductora del extracto acuoso de *P. oleraceae* sobre la actividad de las enzimas GST y NQO1 en hígado de ratas Fisher 344, administrando dosis de 50, 100 y 200 mg/kg vía intragástrica, observando un aumento significativo (39% y 46%) en ambas enzimas a las dosis de 100 mg/kg y 200 mg/kg, con respecto al grupo control. Posteriores estudios realizados en un modelo de inflamación-cáncer de colon inducido con dextrán sulfato de sodio (DSS) y DMH indican que la administración de 100 mg/kg del extracto acuoso de *P. oleraceae* vía intragástrica induce significativamente la

actividad hepática de NQO1 en todos los grupos tratados y la actividad de NQO1 en colon en el grupo extracto/DMH/DSS. De manera importante se encontró que el tratamiento con el extracto acuoso de verdolaga disminuye en un 7.3% el número de fosas crípticas aberrantes, así como el grado de inflamación, confirmando la actividad anti-inflamatoria de la verdolaga. Estos resultados indican que el extracto de verdolaga protege contra el desarrollo de cáncer de colon asociado a inflamación en ratas, posiblemente a través de la inducción de enzimas de fase 2.

Por otro lado, Miranda (2005) determinó la capacidad antiproliferativa de los extractos metanólicos de *M. parviflora*, *C. murale* y *P. oleraceae* en cultivo de células de cáncer de mama MDA-MB-231, midiendo el porcentaje de incorporación de timidina a las células tratadas con 100 y 200 µg/ml de los extractos por 48 horas, encontrando una menor incorporación de la timidina en las células tratadas con concentraciones de 200 µg/ml. El porcentaje de incorporación de timidina fue de 45, 90 y 50 % para *C. murale*, *M. parviflora* y *P. oleraceae*, respectivamente, lo cual nos indica la capacidad de estas plantas para disminuir la proliferación de células transformadas.

En general, los resultados previamente descritos indican que la verdolaga, el quelite y la malva son vegetales comestibles con efectos farmacológicos, con un alto contenido de fenoles y flavonoides y con capacidad inductora, por lo que resulta atractivo evaluar el efecto quimioprotector de extractos de esta planta en un modelo de carcinogénesis. Estas especies vegetales pueden constituir una nueva alternativa para el cuidado de la salud.

III. JUSTIFICACIÓN

En nuestra sociedad, la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas debido a una mala alimentación y contaminación ambiental han incrementado significativamente en los últimos años, por ello es importante la búsqueda de alternativas para el tratamiento de estos padecimientos. En lo que respecta al cáncer, existe una relación directa entre el riesgo a padecer esta patología y la falta de consumo de frutas y verduras. La falta de hábitos alimenticios apropiados da como resultado a largo plazo el cáncer colorrectal y diversos padecimientos gastrointestinales que conllevan al desarrollo del cáncer. Por otro lado, el empleo de vegetales en el tratamiento de diversos padecimientos forma parte de la medicina tradicional de nuestra cultura gracias a la gran diversidad biológica del entorno. Además, se tiene suficiente evidencia de la capacidad antioxidante, antiproliferativa e inductora de enzimas de fase 2, así como la información en el uso directo de las plantas en la dieta, lo cual promueve la realización de estudios sobre el potencial de los fitoquímicos presentes en estas plantas en un modelo de cáncer de colon para reducir el riesgo de padecer esta enfermedad, así como encontrar nuevas fuentes de alimentos quimioprotectores naturales que puedan ser usados en la industria alimentaria.

IV. HIPÓTESIS

La amplia variedad de fitoquímicos de las especies vegetales comestibles *Portulaca oleracea*, *Malva parviflora* y *Chenopodium murale* con capacidad antioxidante, antiproliferativa y de inducción de enzimas de fase 2 presentan un efecto quimioprotector contra el cáncer de colon inducido con 1,2-dimetilhidracina en ratas Sprague-Dawley.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto quimioprotector de extractos acuosos de *Portulaca oleraceae*, *Malva parviflora* y *Chenopodium murale* sobre el desarrollo de cáncer de colon inducido con 1,2-dimetilhidracina en ratas Sprague-Dawley.

5.2 Objetivos específicos

- I. Cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides totales, así como determinar la capacidad antioxidante en el extracto acuoso de las especies vegetales bajo estudio
- II. Determinar *in vivo* la capacidad inductora sobre el contenido de glutatión reducido y la actividad de las enzimas de fase 2, glutatión-S-transferasa y quinona reductasa, en hígado y colon de ratas Sprague-Dawley sanas tratadas con los extractos acuosos de las especies vegetales bajo estudio.
- III. Evaluar *in vivo* el efecto quimioprotector de los extractos acuosos de las especies vegetales en un modelo de cáncer de colon inducido con 1,2-dimetilhidracina.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Materiales

6.1.1. Químicos

El carcinógeno 1,2-dimetilhidracina (DMH), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), así como los reactivos para las determinaciones enzimáticas y no enzimáticas tales como la albúmina bovina (BSA), dicumarol, flavín-adenin nicotinamida (FAD), glucosa-6-fosfato (G6P), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de levadura (G6Pdh), azul de tetrazolium (MTT), nicotín-adenín-difosfato (NADP), 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), Tween, 5,5'-ditiol-2- ácido nitrobenzoico (DTNB) y glutatión reducido (GSH) se adquirieron de la marca Sigma (St. Louis, MI, EUA).

La determinación de proteínas se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA) con un kit de trabajo marca Pierce (Rockford, IL). Las microplacas utilizadas fueron marca Corning.

Los reactivos para la determinación de fenoles y flavonoides totales como Folin Ciocalteu, carbonato de sodio, ácido gálico, nitrato de sodio, cloruro de aluminio, hidróxido de sodio y catequina fueron de la marca Sigma. Los reactivos para la determinación de la capacidad antioxidante como el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) y el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico) (ABTS) fueron también de la marca Sigma.

Los solventes acetonitrilo, etanol, y los reactivos para la preparación de soluciones amortiguadoras (fosfato de sodio, Tris-HCl) fueron adquiridos de JT Baker (Edo. de México).

6.1.2 Biológicos

Plantas

Para el presente estudio se emplearon las plantas *Malva parviflora* (malva de quesitos), *Chenopodium murale* L. (quelite) y *Portulaca oleraceae* (verdolaga). La verdolaga se adquirió en el mes de agosto en la central de abastos de Santiago de Querétaro, proveniente de planta cultivada en el poblado de Amazcala. Las plantas de *Malva parviflora* y *Chenopodium murale* fueron proporcionadas por la Maestra en Ciencias Valentina Serrano Cárdenas del Herbario de Querétaro (QMEX) Dr. Jerzy Rzedowski. Para la preparación de cada uno de los extractos acuosos de las plantas se emplearon las hojas y tallos en estado tierno.

Animales

Para este estudio se emplearon ratas macho Sprague-Dawley de 80-90 gramos de peso y 4 semanas de edad, las cuales se adquirieron del bioterio Rismart S.A. de C.V. Se utilizaron 22 ratas en la primera etapa de experimento, la cual consistió en medir la capacidad inductora de enzimas de fase 2 de las especies vegetales. Un total de 88 ratas macho Sprague-Dawley de 80-90 gramos de peso y 5 semanas de edad se utilizaron para la segunda etapa del experimento, las cuales también se adquirieron en Rismart S.A. de C.V. En ambos experimentos, las ratas se alojaron en jaulas (5-6 ratas por caja), bajo condiciones controladas de humedad ($50 \pm 10\%$), ciclos día/noche de 12/12 horas y temperatura adecuada (23 ± 2 °C). Se aclimataron durante siete días y posteriormente se dividieron aleatoriamente en los grupos experimentales. A las ratas se les proporcionó agua y al alimento *ad libitum* durante el periodo experimental.

6.2 Métodos

6.2.1 Preparación de los extractos acuosos de las plantas

Para la elaboración de los extractos acuosos se realizó una infusión de las especies vegetales de acuerdo al siguiente procedimiento. El material vegetal se desecó en una estufa a 39 °C y posteriormente se pulverizó manualmente. Para la preparación del extracto acuoso (Figura 8), a cada una de las plantas pulverizadas, se les agregó agua hirviendo y se filtró continuamente hasta obtener agua incolora. Posteriormente, el agua filtrada se eliminó a 34 °C en un rotaevaporador Büchi R-205 de alto vacío, hasta evaporar un 70% de agua. El concentrado obtenido se refrigeró, se liofilizó y se almacenó en un vial en refrigeración a 4 °C, protegidos de la luz hasta su uso (Piña-Zentella, 2007).

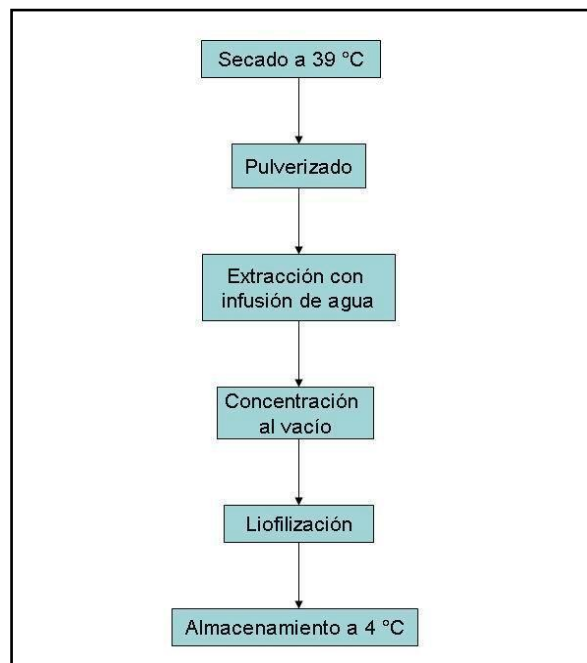


Figura 8. Diagrama de la elaboración de los extractos acuosos mediante infusión.

6.2.2 Cuantificación de compuestos fenólicos

A partir de los extractos anteriores, se determinó el contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos acuosos de cada una de las especies vegetales bajo estudio.

Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó usando el método de Folin-Ciocalteu (Nurmi y col., 1996). La cuantificación se realizó utilizando una curva estándar de ácido gálico (AG, 0-35 $\mu\text{g/ml}$). Para este fin, la curva se realizó a diferentes concentraciones de AG a partir de una solución estándar de 0.1 mg/ml (de 20 a 160 μl). Los volúmenes se completaron a 0.5 ml con la cantidad correspondiente de agua destilada. Para la reacción colorida se agregaron 250 μl del reactivo de Folin Ciocalteu 1 N y se agitó durante 5 minutos en un baño sonicador. Finalmente, se añadieron 1250 μl de una solución de carbonato de sodio al 20% y se dejó reposar por 2 horas. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm (ver anexo 9.2).

Para las muestras vegetales se pesaron 10 mg de cada extracto liofilizado y se disolvieron por sonicación durante 15 minutos en 10 ml de agua. De esta solución se tomó 1 ml para llevarlo a un volumen de 10, para obtener una concentración final de 0.1 mg/ml. Posteriormente, se tomaron 100 μl de la muestra del extracto, se completó el volumen a 0.5 ml con la cantidad correspondiente de agua destilada y se mezcló con 250 μl de reactivo de Folin (1 N). Después de 5 minutos de agitación en un baño sonicador se adicionó 1250 μl de Na_2CO_3 al 20% y se dejó reposar en la oscuridad por 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se leyó la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro. El valor obtenido de la muestra se interpoló con la curva estándar de AG previamente realizada. El contenido de fenoles totales se expresó en miligramos equivalentes de AG por gramo de extracto liofilizado (mg equivalentes AG/g extracto liofilizado). Todos los solventes fueron grado reactivo y se adquirieron de Sigma Aldrich y Fisher.

Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación se realizó usando una curva estándar de catequina (CAT, 0-35 µg/ml). Para este fin, la curva se realizó a diferentes diluciones de CAT desde 20 a 100 µl. A cada una de las cantidades de solución estándar de catequina se adicionaron 1250 µl de agua destilada y 75 µl de NaNO₂ al 5%, se dejó reposar por 6 minutos. Posteriormente, se adicionaron 150 µl de AlCl₃ 6H₂O al 10% y se dejaron reposar durante 5 minutos. Finalmente, se agregaron 500 µl de NaOH 1 M y se llevó a un volumen de 2500 µl de con agua destilada; las muestras se mezclaron y la absorbancia se leyó inmediatamente a 510 nm contra el blanco en un espectrofotómetro (ver anexo 9.3).

Para las muestras, el procedimiento consistió en mezclar 100 µl de muestra de extracto acuoso (0.1 mg/ml), blanco (H₂O) o solución estándar, 1250 µl de agua destilada y 75 µl de NaNO₂ (5%) y se dejó reposar por 6 minutos. Posteriormente, se adicionaron 150 µl de AlCl₃ 6H₂O (10%) a la mezcla y se dejó reposar durante 5 minutos. Finalmente, se agregaron 500 µl de NaOH (1 M) y 275 µl de agua, se mezclaron bien y la absorbancia se leyó inmediatamente a 510 nm contra el blanco en un espectrofotómetro. El valor obtenido de la muestra se interpoló en la curva de calibración estándar. El contenido de flavonoides totales se expresó como miligramos equivalentes de (+)-catequina (CAT) por gramo de extracto liofilizado (mg equivalentes (+)-CAT/g extracto liofilizado).

6.2.3 Capacidad antioxidante de los extractos acuosos de las especies vegetales

La capacidad antioxidante se determinó mediante el método ABTS en el cual los valores obtenidos se expresan en equivalentes Trolox. Este ensayo se realizó utilizando un lector de microplaca a 734 nm con agitación de 5 segundos antes de la lectura y se analizó con el software SoftMax Pro. La solución ABTS se preparó poniendo a reaccionar 5 ml de una solución acuosa de ABTS 7 mM con 88 µl de persulfato de potasio 140 µM, almacenándose en oscuridad durante 16 horas. El extracto acuoso se preparó con 0.2 g de extracto liofilizado y 10 ml de agua

destilada, se agitó por 24 horas para posteriormente centrifugarse a 5000 *g* durante 10 minutos y 22 °C. A continuación se realizaron diluciones con PBS para obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.1 . El ensayo se realizó en microplaca donde el blanco incluyó 230 μ l de etanol y 20 μ l de metanol, el control consistió de 20 μ l de metanol y 230 μ l de solución ABTS y la muestra de 230 μ l de ABTS y 20 μ l de muestra. Las lecturas se realizaron a 734 nm pasado 1 minuto de añadir el reactivo ABTS (ver anexo 9.5). La curva estándar se obtuvo con Trolox y los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox/gramo de extracto (Soong y Barlow, 2004).

6.2.4 Capacidad inductora de los extractos acuosos de las especies vegetales sobre enzimas de fase 2

Para determinar la capacidad inductora de las especies vegetales sobre las enzimas de fase 2, se utilizaron 22 ratas macho Sprague-Dawley las cuales se aclimataron y se dividieron en 7 grupos, con 3 ratas por grupo, tal como se muestra en el cuadro 3. Los extractos de cada una de las especies vegetales se administraron durante una semana en el alimento molido a las concentraciones de 100 y 400 mg de extracto por kg de peso corporal, proporcionándose diariamente. Una concentración de 100 mg de extracto en la dieta de las ratas equivale al consumo de 233.3 g de vegetal fresco en una persona de 70 kg de peso, y una concentración de 400 mg equivale a un consumo de 933.3 g de vegetal consumido en un día. Un consumo de 100 mg/kg equivale a un consumo de 12 kg de verdura al año y una concentración de 400 mg/kg equivale a un consumo per cápita de 50 kg de verdura al año.

El grupo considerado como control incluyó cuatro ratas y recibió únicamente agua y alimento *ad libitum*.

Cuadro 3. Grupos experimentales de ratas Sprague-Dawley tratadas con los diferentes extractos de plantas.

Grupo	n	Tratamiento	Concentración
1	4	Control	-----
2	3	Extracto acuoso de <i>Malva parviflora</i>	100 mg/Kg
3	3	Extracto acuoso de <i>Malva parviflora</i>	400 mg/Kg
4	3	Extracto acuoso de <i>Chenopodium murale L.</i>	100 mg/Kg
5	3	Extracto acuoso de <i>Chenopodium murale L.</i>	400 mg/Kg
6	3	Extracto acuoso de <i>Portulaca oleraceae</i>	100 mg/Kg
7	3	Extracto acuoso de <i>Portulaca oleraceae</i>	400 mg/Kg

6.2.5 Inducción de cáncer de colon y quimioprotección con las especies vegetales

Una vez aclimatadas durante una semana, las ratas macho Sprague-Dawley se dividieron en 5 grupos experimentales con 22 animales cada grupo y con 10 animales el grupo control, como se muestra en la figura 9. En esta fase experimental los extractos se administraron en el alimento molido diariamente a una concentración de 100 mg/kg una semana antes de la administración de la DMH y a lo largo del experimento. A los grupos 1, 2 y 3 se les indujo cáncer con 8 inyecciones subcutáneas de DMH a una concentración de 21 mg/kg de peso corporal administrada semanalmente. La DMH se disolvió en agua destilada con 0.37 mg/mg de EDTA y NaCl al 0.9% (ver anexo 9.1).

Al grupo tratado únicamente con DMH (control positivo) y al grupo control negativo se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*. La figura 9 muestra los grupos que se implementaron en esta etapa experimental.

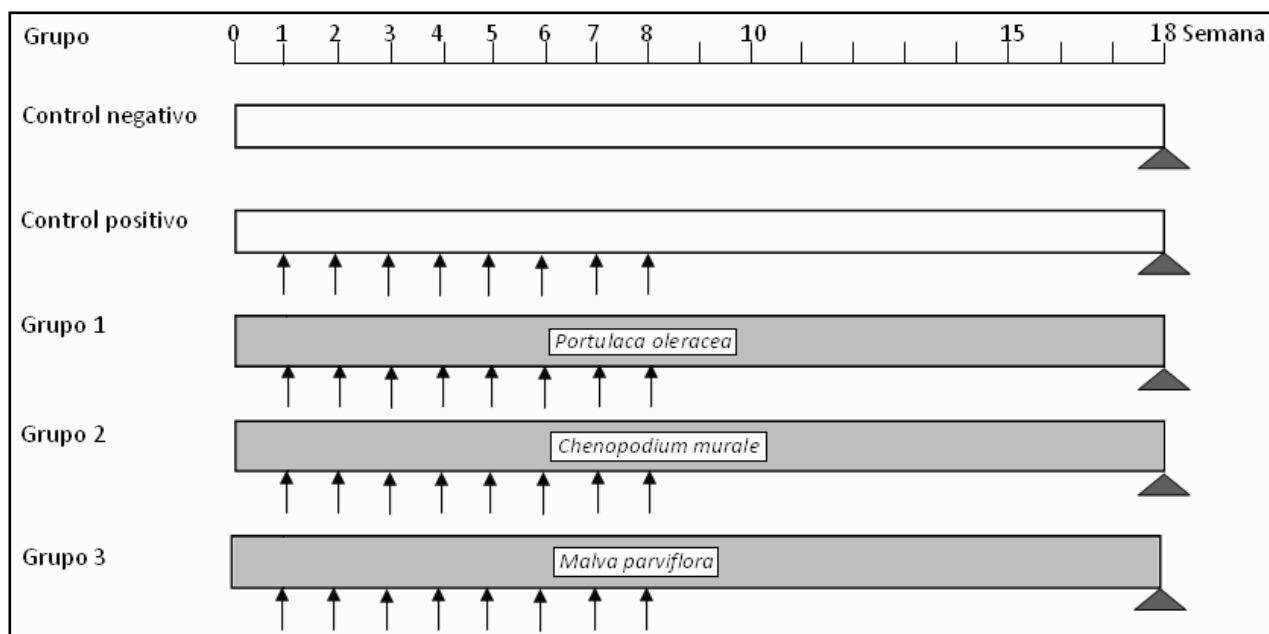


Figura 9. Diseño del modelo experimental de cáncer colorrectal: ↑ 21 mg/kg_{PC} de 1,2-dimetilhidracina, inyección subcutánea; ▲ sacrificio (N = 22).

El sacrificio de los animales se llevó a cabo a las 18 semanas a partir de la primera inyección de DHM con la finalidad de evaluar la inducción de enzimas de fase 2 en hígado y colon, y las lesiones de la región proximal y distal del colon.

6.2.6 Sacrificio de animales y obtención de órganos

El sacrificio de los animales se llevó a cabo utilizando una cámara de sacrificio con éter etílico para la asfixia de los animales y posterior incisión vertical desde el tórax hasta el ano, separando la piel y el músculo para tener acceso a las vísceras abdominales; se llevó a cabo el corte de la vena porta para asegurar la muerte clínica. El intestino fue extraído y abierto longitudinalmente, lavado con solución fisiológica estéril fría, y dividido en sección proximal y sección distal; el hígado también fue extraído y lavado con solución fisiológica estéril. Todas las muestras obtenidas se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C.

6.2.7 Preparación de los extractos citosólicos de las muestras

Con la finalidad de llevar a cabo las determinaciones enzimáticas y no enzimáticas, se tomaron 750 mg de hígado y colon (proximal y distal) y se colocaron en tubos cónicos en donde se adicionaron 3 ml de solución amortiguadora Tris/Sacarosa (ver anexo 9.4) con un pH 7.0 a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, las muestras se homogeneizaron con la ayuda de un Polytron (Kinematica, Suiza) hasta que no fue visible ningún grumo de tejido; ya homogeneizados se transfirieron a tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron por 15 minutos a 10,000 g en una centrífuga Universal 32 R (Andreas Hettich GMBH & Co. KG, Alemania) a una temperatura de 4 °C. Al término, el sobrenadante se transfirió a tubos para ultracentrífuga, los cuales se pesaron con un margen de error de 0.01 g y se balancearon adicionando solución amortiguadora. Se centrifugaron por una hora a 100,000 g o 35,000 rpm a 4 °C en una ultracentrífuga Beckmann Optima L-90K (Beckmann, EUA). Finalmente, el sobrenadante se removió con una pipeta Pasteur y se almacenó en tubos Eppendorf a -70 °C hasta su análisis (Ramos-Gómez y col., 2001).

6.2.8 Determinación de la concentración de glutatión reducido y de la actividad de enzimas de fase 2

Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína de los extractos citosólicos se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA), utilizando albúmina bovina como estándar. Se realizaron diluciones 1:80 y 1:20 de los extractos citosólicos de hígado y colon (distal y proximal), respectivamente, en solución amortiguadora de fosfatos (ver anexo 9.6). Posteriormente, se colocaron 50 µl de la dilución de cada una de las muestras en microplacas de 96 pozos (tres pozos por muestra), y se agregaron 250 µl de la solución de trabajo del kit BCA en cada pozo. Se dejaron reposar las microplacas durante un tiempo de 30 minutos a 37 °C. Finalmente, las muestras se leyeron en el lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Microplate Reader (Molecular Devices Co., Sunnyvale, EUA) a una longitud de onda de 562 nm, y los resultados

se analizaron con el software Pro Ver.4.7.1 (Molecular Devices Co., Sunnyvale, EUA).

Determinación del contenido de glutatión reducido (GSH)

La determinación de glutatión reducido (GSH) se llevó a cabo con 5,5'-ditiol-2-ácido nitrobenzoico (DTNB) en microplaca, de acuerdo al método de Ellman (1959). La cuantificación se realizó interpolando las absorbancias obtenidas con una curva estándar de GSH, con un intervalo de concentraciones de 20 a 200 μM a partir de una solución estándar. Para realizar esta curva, a cada pozo se adicionó 150 μl de solución amortiguadora Tris-EDTA (ver anexo 9.7) y a continuación se completaron con un volumen de 130 μl de metanol puro. Finalmente, se adicionaron 20 μl de DTNB para llevar a cabo la reacción dejando reposar por 5 minutos y la lectura se realizó a una longitud de onda de 412 nm.

Para determinar el contenido de GSH de las muestras, primeramente se precipitaron las proteínas de los citosoles tomando 150 μl de citosol descongelado con 120 μl de agua HPLC y 30 μl de ácido tricloroacético (ATC) al 20%, se incubaron por 30 minutos en hielo y se centrifugaron a 8500 g durante 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, se agregó a 150 μl de solución amortiguadora Tris-EDTA en cada pozo de la microplaca 50 μl de muestra (sobrenadante ya precipitado) con 80 μl de metanol, finalmente se llevó a cabo la reacción con 20 μl de DTNB para completar 300 μl . Se dejó reposar por 5 minutos y se leyó a 412 nm. El contenido de GSH se obtuvo extrapolando la absorbancia de las muestras en la curva estándar realizada previamente. Los resultados se expresaron en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, para lo cual se determinó el contenido de ésta en las muestras.

Determinación de la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST)

Este método se basa en la reacción catalizada por esta enzima entre GSH (glutatión reducido) y el sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB), el cual tiene un amplio rango para detectar las diferentes isoenzimas (alfa, mu, pi y otras isoformas de GST). Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de CDBN-GSH conjugado por minuto (Habig y col., 1974).

De las diluciones de los extractos citosólicos empleadas para la cuantificación de proteína, se colocaron 50 µl de dilución en placas de 96 pozos (tres pozos por muestra). Se agregaron 100 µl de la solución de trabajo de glutatión reducido (GSH) 3 mM y 150 µl de la solución de trabajo de CDNB de 2 mM en cada pozo, evitando la formación de burbujas (ver anexo 9.8). La formación de CDNB-GSH por la enzima GST se monitoreó inmediatamente a una longitud de onda de 340 nm a 25 °C en un periodo de 2 minutos de reacción en el lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Microplate Reader (Molecular Devices Co. Sunnyvale, EUA), obteniéndose lecturas cada 20 segundos. Los resultados se analizaron con el software Pro Ver.4.7.1 (Molecular Devices Co. Sunnyvale, EUA). La actividad de GST se expresó en nmol de producto formado por mg de proteína por minuto, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{nmol/mg*min} = \Delta(\text{abs}_{\text{min}2} - \text{abs}_{\text{min}1}) / (0.0096 * \text{mg}_{\text{proteína}})$$

Donde:

$\text{abs}_{\text{min}2}$: absorbancia de la muestra a 340 nm al minuto 2 de reacción.

$\text{abs}_{\text{min}1}$: absorbancia a 340 nm al minuto 1 de reacción.

$\text{mg}_{\text{proteína}}$: mg de proteína en la muestra.

0.0096: coeficiente de extinción del CDNB ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Determinación de la actividad enzimática de quinona reductasa (NQO1)

La formación de 6-fosfogluconolactona mediante la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa genera poder reductor (NADPH), el cual es utilizado por la enzima NQO1 para reducir al compuesto azul de tetrazolium (MTT), dando como resultado un precipitado azul-café, el cual puede medirse a 610 nm después de 5 minutos de reacción (Prochaska y col., 1992).

De las diluciones de los extractos citosólicos empleadas para la cuantificación de proteínas, se colocaron 50 µl en placas de 96 pozos (cuatro pozos por muestra). Se agregaron cuidadosamente 200 µl de la mezcla de reacción en cada pozo (ver anexo 9.9), evitando la formación de burbujas. Se dejaron incubar por 5 minutos a

temperatura ambiente, al término de este tiempo se adicionaron 50 µl de la solución bloqueadora de dicumarol (ver anexo 9.10). Finalmente, se midió la absorbancia en el lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Microplate Reader (Molecular Devices Co. Sunnyvale, EUA) a una longitud de onda de 610 nm. Los datos se analizaron con el software Pro Ver.4.7.1 (Molecular Devices Co. Sunnyvale, EUA) y se realizaron los cálculos correspondientes empleando la siguiente fórmula y expresando el resultado en nmol/mg*min:

$$\text{nmol/mg*min} = A_{610} / (0.1833 * \text{mg}_{\text{proteína}})$$

Donde:

A: absorbancia de la muestra a 610 nm.

mg_{proteína}: son los mg de proteína en la muestra.

0.1833: relación del coeficiente de extinción del MTT ($11.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y los 5 minutos de la reacción.

6.2.9 Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EE). Para la comparación de grupos de capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides totales se utilizó la prueba de Tukey. La evaluación estadística de los datos *in vivo* se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) apoyado con la prueba de Dunn y Dunnet para la comparación entre los grupos tratados con cada extracto comparado con su respectivo control, empleándose un nivel de significancia de $P < 0.05$. También se llevaron a cabo correlaciones de Pearson para los resultados *in vivo*. Los análisis estadísticos se realizarán con el programa estadístico JMP versión 4.1.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Rendimiento de los extractos acuosos de las especies vegetales

Un aspecto importante en la preparación de extractos a partir de materiales vegetales es el rendimiento. Para *P. oleracea*, por cada 10 gramos de planta seca utilizada se obtuvieron aproximadamente 2 g de sólidos. En general, para el extracto acuoso de *M. parviflora* se obtuvo un rendimiento mayor (5.0%) comparado con *P. oleraceae* (2.3%).

Miranda (2005) reporta rendimientos para los extractos metanólicos de *C. murale*, *M. parviflora* y *P. oleraceae* del 10, 14 y 10%, respectivamente, observándose porcentajes mayores al llevar a cabo la extracción de compuestos fenólicos con metanol, comparado con los resultados obtenidos al llevar a cabo una extracción acuosa. La diferencia se puede atribuir a una mayor cantidad de fitoquímicos con polaridad media presentes en las especies vegetales, con lo que se tiene un mayor contenido de sólidos al llevar a cabo la extracción con metanol.

7.2 Cuantificación de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de los extractos acuosos

Según Belitz y Grosch (1988), los ácidos fenólicos como el ácido gálico (AG) son abundantes en casi todos los vegetales, por lo que en este estudio se consideró el AG como referencia en la cuantificación de fenoles, aunque no como valor absoluto para la cantidad de fenoles contenida en la planta.

Los resultados obtenidos indican que el contenido de fenoles totales fue de 46.7 a 52.4 mg equivalentes de AG/g de extracto. En *P. oleraceae* se encontró el mayor contenido de fenoles totales seguido de *M. parviflora* y *C. murale*, aunque no se encontraron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales (Cuadro 4). González (2007) reporta para *P. oleraceae*, *M. parviflora* y *C. murale* contenidos de 34.3, 30.8 y 30.6 mg equivalentes de AG/g de extracto, respectivamente. Piña-

Zentella (2007) reporta para *P. oleraceae* un contenido mayor de 96.2 mg equivalentes de AG/g de extracto. Estas variaciones del contenido de fenoles totales pueden deberse principalmente a las condiciones ambientales a las que se sometieron las plantas y al período de cosecha, ya que se utilizó el mismo proceso de extracción en la elaboración de los extractos acuosos.

Los compuestos fenólicos no son completamente absorbidos en el intestino delgado, pero si en el colon, debido a que la mayoría de los polifenoles se encuentran en forma glicosilada. Sin embargo, ciertas glicosidasas intestinales o glicosidasas de la microflora presentes principalmente en la porción distal del colon pueden hidrolizar los enlaces liberando los compuestos fenólicos de los glicósidos para que puedan ser absorbidos y llevados al torrente sanguíneo para permitir posteriormente que se llevé a cabo su función como antioxidantes en el organismo (Finley, 2005).

Cuadro 4. Contenido de fenoles, flavonoides totales y capacidad antioxidante de los extractos acuosos de las especies vegetales.

Especie en estudio	Fenoles totales	Flavonoides totales	Capacidad antioxidante
	mg equivalentes de ácido gálico/g extracto	mg equivalentes de catequina/g extracto	µM equivalentes Trolox/g extracto
<i>P. oleraceae</i>	52.45 ± 3.74 ^a	22.99 ± 1.96 ^b	341.94 ± 32.53 ^a
<i>C. murale</i>	46.75 ± 2.18 ^a	12.31 ± 0.84 ^c	642.50 ± 28.43 ^b
<i>M. parviflora</i>	51.18 ± 2.32 ^a	35.33 ± 0.67 ^a	374.50 ± 35.82 ^a

Los resultados son la media de 2 experimentos con 3 repeticiones ± DE. a,b,c Indican diferencia estadística de acuerdo a la prueba Tukey (P<0.001).

También se determinó el contenido de flavonoides totales de los extractos acuosos de cada una de las especies vegetales en estudio. El contenido de flavonoides totales se cuantificó usando el método propuesto por Liu y col. (2002) empleando el flavonoide catequina (CAT) como referencia ya que éste es el mayor componente de los flavonoides presentes en los vegetales (Madhavi y col., 1996).

En general, se encontraron valores de 12.3 a 35.3 mg equivalentes de catequina/g de extracto. En *M. parviflora* se cuantificó el mayor contenido de flavonoides totales (35.33 ± 0.67 mg equivalentes de catequina/g), seguido de *P. oleraceae* y *C. murale* (22.99 ± 1.96 y 12.31 ± 0.84 mg equivalentes de catequina/g, respectivamente), siendo estos valores estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba Tukey ($P < 0.05$) (Cuadro 4). González (2007) reporta para *M. parviflora*, *P. oleracea* y *C. murale* contenidos de 26.9, 15.8 y 20.2 mg equivalentes de catequina/g de extracto, respectivamente. Por el contrario, Zentella (2007) reporta un contenido de 11.5 mg equivalentes de catequina/g de extracto para *P. oleraceae*. Nuevamente, estas variaciones, además con las reportadas en el presente estudio, del contenido de flavonoides totales pueden deberse principalmente a las condiciones de estrés a las que son sometidas las plantas en su medio ambiente. Aunque las muestras fueron cultivadas en la misma región y se utilizó el mismo proceso de extracción, se cosecharon en diferentes temporadas del año, lo que puede contribuir a las diferencias encontradas.

Con respecto a los polifenoles y flavonoides, se han estudiado varias de sus funciones biológicas, entre ellas la actividad antioxidante, así como los efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos. Se sabe que los polifenoles ejercen sus efectos antimutagénicos a través de la inducción de enzimas de fase 2, el bloqueo de la biosíntesis del carcinógeno final, la inhibición de la unión covalente del carcinógeno con el ADN y la inducción de apoptosis. Esto confirma el amplio espectro de acción de los polifenoles en la prevención y tratamiento del cáncer. Dietas ricas en polifenoles, como las catequinas del té verde y las isoflavonas de la soya, han mostrado capacidad quimioprotectora (D'Alessandro y col., 2003).

La capacidad antioxidante de los extractos acuosos de las especies vegetales se determinó utilizando \cdot ABTS como radical y expresando los resultados como equivalentes de Trolox (TEAC). En el cuadro 4 se muestra la capacidad antioxidante de cada extracto, encontrando valores encontrados fueron de 341.9 a 642.5 μ M equivalentes Trolox/g de extracto. De acuerdo a la prueba Tukey ($P < 0.05$), *C. murale* presentó estadísticamente la mayor capacidad antioxidante seguido de *P. oleracea* y *M. parviflora*. Inesperadamente, estos resultados muestran claramente una falta de

relación entre la concentración flavonoides o fenoles totales y su capacidad antioxidante. Por lo que esta capacidad antioxidante se debe a un compuesto en particular que se encuentra en *C. murale*, que aunque en baja concentración, puede presentar una capacidad antioxidante muy alta. La capacidad antioxidante de los extractos acuosos de las especies vegetales se determinó utilizando \cdot ABTS como radical y expresando los resultados como equivalentes de Trolox (TEAC). Por otro lado, la capacidad antioxidante de los fenoles radica principalmente en el grupo hidroxilo del anillo bencénico. Además, el anillo entre oxígenos es lo que hace del fenol un excelente antioxidante al desplazarse un electrón o un hidrógeno formándose grupos OH y OR en la posición orto y para en el anillo de benceno (Bajpai y col., 2005).

Los antioxidantes encontrados en frutas, verduras y extractos vegetales han mostrado la capacidad de inhibir varios tipos de cáncer evitando el daño oxidativo al DNA. En las células el daño al DNA puede ser reparado antes de la división celular, sin lo cual el resultado sería una alteración genética permanente teniendo así el primer paso de la carcinogénesis. La capacidad antioxidante de los polifenoles proporciona la capacidad de retrasar la carcinogénesis (Reddy y col., 2003).

En este proyecto fue de interés el contenido de fenoles y flavonoides totales, así como la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de las especies vegetales, para determinar un posible mecanismo de acción acerca del efecto benéfico de estas especies nutraceuticas en el control del desarrollo del cáncer de colon inducido químicamente en animales.

Primera Etapa:

7.3 Capacidad inductora de los extractos acuosos sobre de la concentración glutatión reducido y la actividad de enzimas destoxicantes

7.3.1 Efecto de la administración de los extractos acuosos sobre la ganancia de peso

En esta primera etapa del experimento, todos los animales sobrevivieron y su peso se registró diariamente, no encontrándose diferencia significativa en el peso final de cada uno de los grupos, lo cual nos indica que los extractos no ocasionaron efectos adversos en los animales, lo que pudo haberse reflejado en el crecimiento de animal (Figura 10). El peso promedio inicial de las ratas control y de los grupos tratados con los extractos acuosos fue 114 a 121 g, mientras que el peso de las ratas control y de los grupos tratados con los extractos acuosos a los 7 días de finalizado el experimento fue de 176 a 205 g en los grupos experimentales, no encontrándose diferencias significativas con respecto al control ($P < 0.05$).

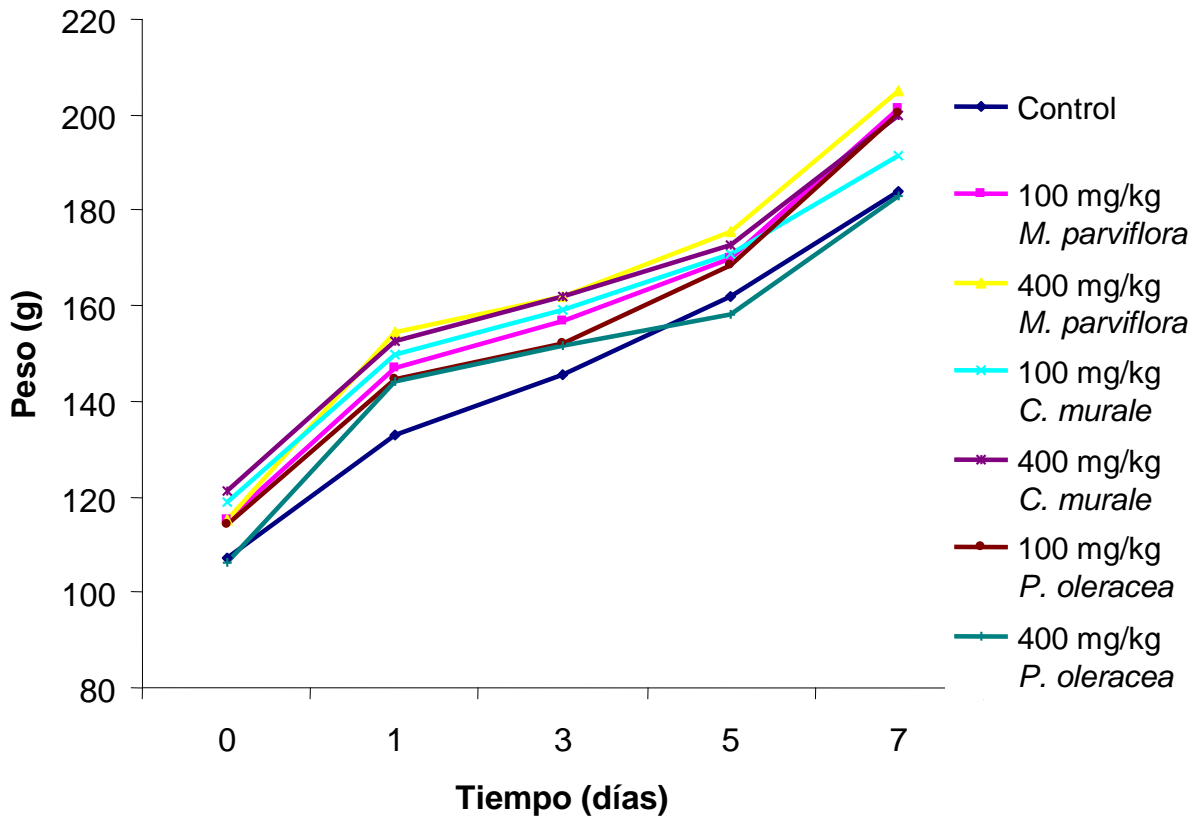


Figura 10. Peso de las ratas tratadas con los extractos acuosos de *M. parviflora*, *C. murale* y *P. oleracea* a concentraciones de 100 y 400 mg/kg.

No se presentó diferencia estadística significativa entre ambos grupos por la prueba de Dunnet ($P < 0.001$). Los resultados son la media de 3 experimentos con 3 repeticiones \pm EE.

7.3.2 Efecto de los extractos acuosos sobre la concentración de glutatión reducido (GSH) en hígado

El GSH es uno de los principales agentes reductores que da protección a las células contra el estrés oxidativo y los compuestos tóxicos de origen endógeno y exógeno; además, GSH es el cofactor para la enzima GST, por lo que es un elemento antioxidante importante en el organismo. Es por ello que la presencia de concentraciones adecuadas de GSH permite que los compuestos tóxicos sean conjugados y posteriormente metabolizados o excretados como un mecanismo de desintoxicación muy eficiente (Larsen y col., 1985). GSH también participa en el mantenimiento de la estructura de la hemoglobina, en la síntesis de proteínas en los reticulocitos, así como preserva la integridad de algunas enzimas y proteínas de la membrana.

Por lo tanto, en la primera etapa se llevó a cabo la determinación de GSH en el hígado de ratas tratadas con los extractos acuosos. *M. parviflora* y *C. murale* a la concentración de 100 mg/kg elevaron significativamente la cantidad de GSH en un 14.2 y 20.4 %, respectivamente, comparados con el control negativo, siendo estadísticamente significativo únicamente con el extracto de *C. murale*. Para el extracto de *P. oleraceae* no se encontraron resultados estadísticamente distintos con respecto al control (Figura 11). No se presentan los resultados de GSH en colon distal y proximal ya que en colon la concentración de este cofactor muestra valores muy bajos y no fue posible determinarlos mediante la técnica empleada.

El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido cuya síntesis se inicia con la formación de un dipéptido a partir del ácido glutámico y la cisteína (γ -glutamilcisteína) por la enzima γ -glutamil cisteil sintetasa (γ -GCS), seguida de la adición de glicina por la glutatión sintetasa (GS) (Estrada del Cueto y col., 1999). En mamíferos, el hígado constituye el órgano central para el metabolismo de GSH, que generalmente se encuentra en altas concentraciones (5 – 10 mM), lo que podría suministrar de GSH a otros tejidos a través de la circulación sanguínea. Aunque la eliminación de xenobióticos por conjugación con GSH representa una pérdida irreversible de GSH endógeno, estudios en ratas han demostrado que la concentración de GSH en hígado aumenta en respuesta a la exposición de algún tóxico como mecanismo de defensa (Emerole y col., 1979). Además, los resultados del presente estudio demuestran que la concentración de GSH en hígado puede incrementarse por la administración de extractos vegetales a través de la dieta.

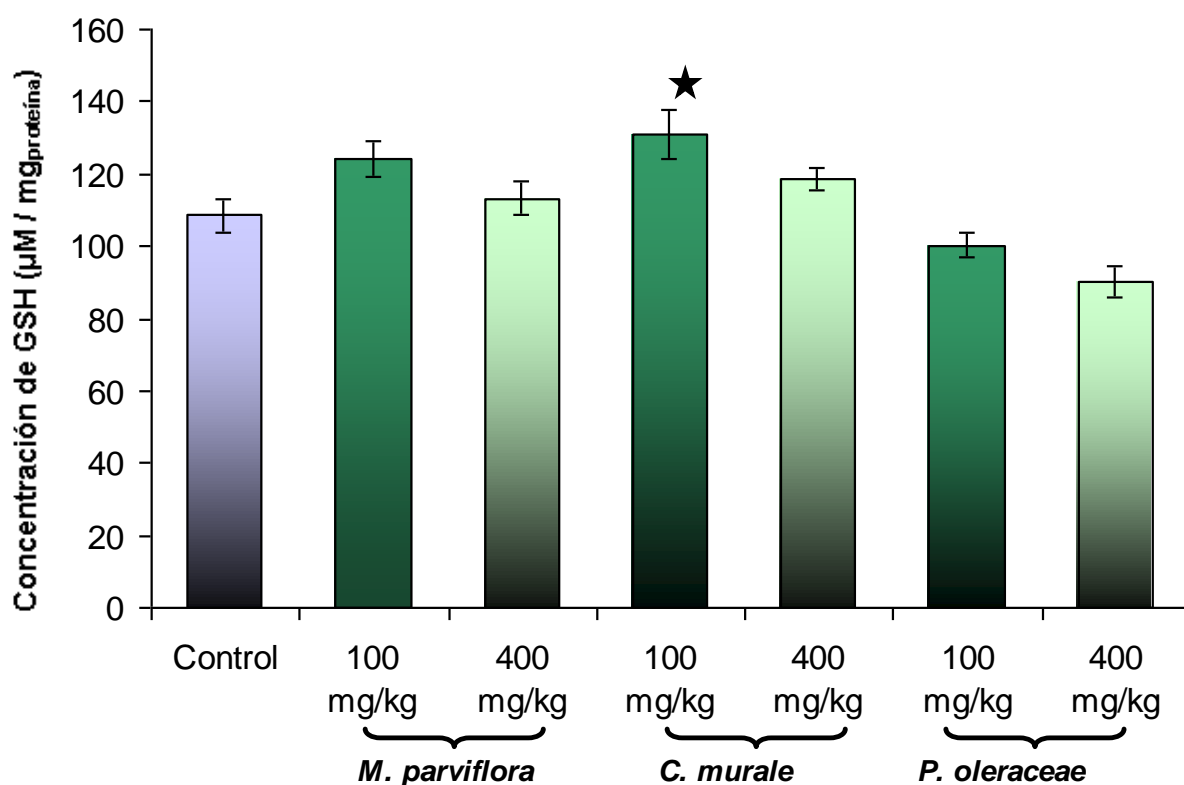


Figura 11. Concentración de glutatión reducido (GSH) en hígado de ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuosos a concentraciones de 100 y 400 mg/kg.

* Diferencia estadística comparado con el control por la prueba de Dunn ($P < 0.001$). Los resultados son la media de 3 experimentos con 3 repeticiones \pm EE. Extracto administrado en el alimento molido durante 1 semana.

7.3.3 Efecto de los extractos acuosos sobre la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST)

Actividad de glutatión-S-transferasa en hígado

Una de las enzimas de fase 2 estudiadas en este trabajo fue la GST, la cual conjuga el GSH con metabolitos de xenobióticos, incrementando con ello la eliminación de éstos compuestos del organismo. Así mismo, la literatura indica que esta enzima puede ser inducida por el tratamiento con diversos fitoquímicos presentes en las plantas o sus extractos en los diferentes órganos de roedores y en humanos (Talalay, 2000).

En hígado, las dos concentraciones del extracto de *M. parviflora* aumentaron significativamente la actividad enzimática de GST (21.8 - 25.7%, $P < 0.001$) con respecto al control; además, se observó un aumento con las dos concentraciones del extracto de *C. murale* del 28.7 y 39.1% con 100 y 400 mg/kg, respectivamente; y un aumento significativo del 39.7% con la concentración de 100 mg/kg del extracto de *P. oleraceae* respecto al control (Figura 12). En general, los incrementos en la actividad enzimática de GST en hígado con los 3 extractos a ambas concentraciones (excepto a la concentración de 400 mg/kg de extracto de *P. oleraceae*), se encontraron en los intervalos del 21% al 39%.

Gutiérrez (2006) reporta el efecto de la administración intragástrica de los extractos acuosos de *M. parviflora* y *C. murale* a ratas Sprague-Dawley durante una semana a concentraciones de 50, 100 y 200 mg/kg, encontrando un aumento significativo del 20% en la actividad enzimática de GST en hígado con concentraciones de 100 y 200 mg/kg del extracto acuoso de *C. murale* respecto al grupo control. Similarmente, Piña-Zentella (2007) reporta el efecto de la administración intragástrica del extracto acuoso de *P. oleraceae* a ratas Fisher F344 a concentraciones de 50, 100 y 200 mg/kg, mostrando un incremento significativo de la actividad enzimática de GST (39%) con ambas concentraciones de 100 y 200 mg/kg, comparado con el grupo control.

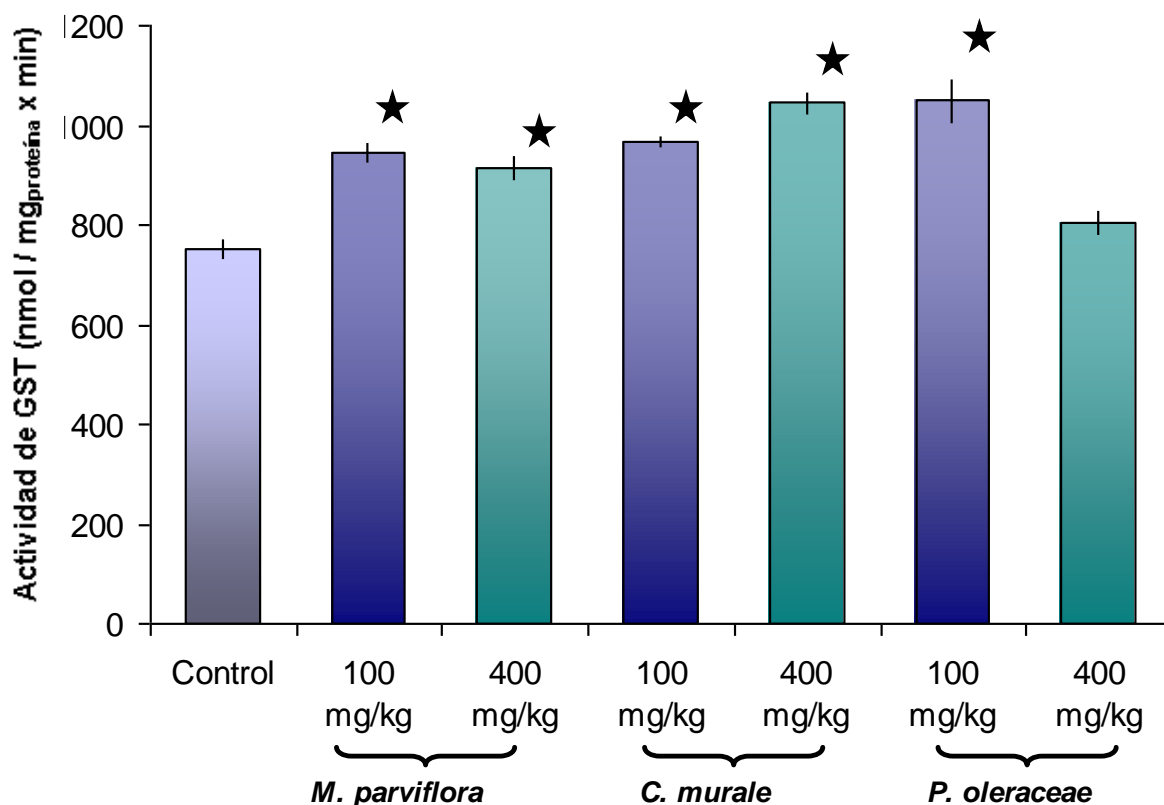


Figura 12. Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado de ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuosos a las concentraciones de 100 y 400 mg/kg.

* Diferencia estadística comparado con el control por la prueba de Dunn ($P < 0.001$). Los resultados son la media de 3 experimentos con 3 repeticiones \pm EE.

En general, se tiene un aumento del 21.8 al 39.7 % en la actividad enzimática de GST en el hígado de ratas tratadas con los extractos acuosos incorporados en el alimento molido durante 1 semana. Estos resultados, comparados con los obtenidos por Gutiérrez (2006), nos muestran que para *C. murale* se obtuvo una inducción enzimática de GST similar sin requerir la administración intragástrica del extracto, prácticamente trabajando en las mismas condiciones. Piña-Zentella (2007) reporta el mismo porcentaje de inducción del presente trabajo (39%) con la administración intragástrica de 100 y 200 mg/kg del extracto de *P. oleraceae*. Esto nos muestra que los fitoquímicos presentes en el extracto pueden actuar en la inducción enzimática independientemente de la vía de administración. La administración a través de la dieta de los extractos nos permite una disminución del estrés en los animales y evitar los daños que pudieran realizarse por la administración intragástrica del extracto.

Actividad de glutatión-S-transferasa en colon proximal y distal

En colon proximal (Figura 13), la actividad enzimática de GST aumentó en un 42.1% para la concentración de 100 mg/kg y un 38.9% para la concentración de 200 mg/kg con el extracto de *M. parviflora*; y un aumento respectivo de 80.3 y 37.6 % con las dos concentraciones empleadas de extracto de *C. murale*; así mismo para la concentración de 100 mg/kg de *P. oleraceae* se obtuvo un aumento de la actividad de GST del 36.5% (Figura 13). Estos aumentos porcentuales son significativos respecto al control de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.001$).

Similarmente, en colon distal la actividad enzimática de GST aumentó significativamente en un 40.2% con el extracto acuoso de *M. parviflora* (400 mg/kg), así como un aumento de 36.3% con el extracto de *P. oleraceae* (100 mg/kg), respecto al control de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.001$) (Figura 13).

Los compuestos fenólicos no son completamente absorbidos en el intestino delgado, pero si en el colon, debido a que la mayoría de los polifenoles se encuentran en forma glicosilada. Sin embargo, ciertas glicosidasas intestinales o glicosidasas de la microflora presentes principalmente en la porción distal del colon pueden hidrolizar los enlaces liberando los compuestos fenólicos para que puedan ser absorbidos y llevados al torrente sanguíneo para permitir que posteriormente lleven a cabo su función como antioxidantes en el organismo (Finley, 2005). Por ello, menos del 1% de flavonoides absorbidos en colon entra en el sistema circulatorio (0.2-0.5%), mientras que gran parte de estos compuestos son excretados a través de la orina (Mark y col., 2006). Sin embargo, la presencia de azúcares en la molécula original permite una mejor absorción de estos compuestos a nivel de colon. Además, con los resultados obtenidos de la actividad de GST, los extractos bajo estudio muestran un mayor efecto inductor en la zona proximal del colon comparada con la zona distal, a ambas concentraciones.

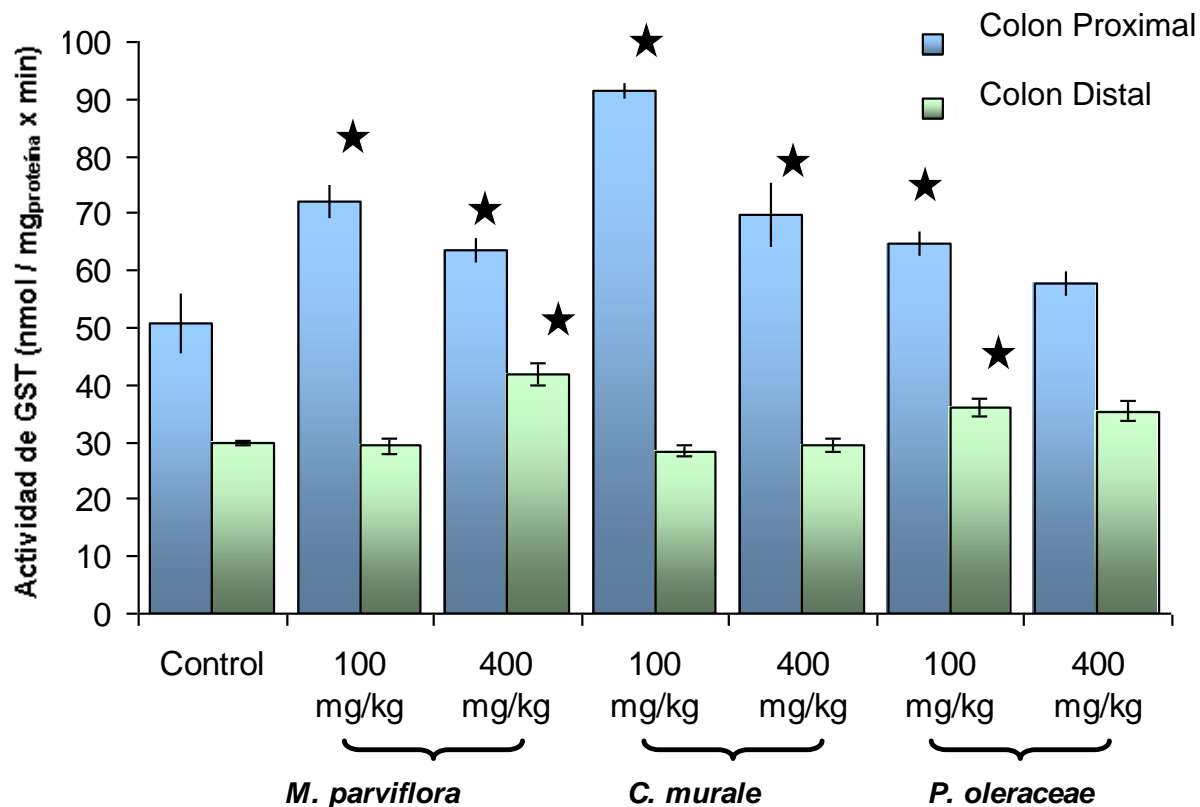


Figura 13. Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en colon proximal y distal de las ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuosos a las concentraciones de 100 y 400 mg/kg.

* Diferencia estadística comparado con el control por la prueba de Dunn ($P < 0.001$).
 Los resultados son la media de 3 experimentos con 3 repeticiones \pm EE.
 Extracto administrado en el alimento molido durante 1 semana.

Gutiérrez (2006) reportó el efecto que ejerció la administración intragástrica de diferentes concentraciones (50, 100 y 200 mg/kg) de los extractos acuosos de *C. murale* y *M. parviflora* durante 7 días, sobre la actividad de GST en colon proximal en ratas Sprague-Dawley. En este estudio se observó un aumento significativo en la actividad enzimática de GST en un 28.2, 33.2 y 11.0% con el extracto de *C. murale* y 15.4, 24.4 y 14.4% con el extracto de *M. parviflora*, respecto al control. Por el contrario, en colon distal se observó únicamente un aumento significativo del 20% en la actividad enzimática de GST al administrar 200 mg/kg de los extractos acuosos de *C. murale* y *M. parviflora*.

Piña-Zentella (2007) reporta el efecto de la administración vía intragástrica del extracto acuoso de *P. oleraceae* a ratas Fisher F344 a concentraciones de 50, 100 y 200 mg/kg mostrando un incremento significativo de la actividad enzimática de

GST de 25.4, 38.9 y 35.5%, respectivamente, en colon distal respecto al grupo control.

De manera general, se observó que la inducción de GST por los extractos vegetales varía dependiendo del órgano, del tipo de extracto, de la concentración empleada y la vía de administración. En el presente estudio se tuvo una inducción enzimática de GST en colon del 36.5 a 80.3% respecto al grupo control, siendo mayor la inducción enzimática en colon proximal. En colon proximal la actividad enzimática de GST fue de 36.3 a 40.2% mayor que el grupo control. Los porcentajes obtenidos son mayores que los reportados por Gutiérrez (2006), comparando las vías de administración observamos que fue mayor la inducción enzimática de GST administrando los extractos en el alimento molido que vía intragástrica se repiten las palabras; mientras que los resultados obtenidos por Piña-Zentella (2007) fueron similares a los del presente trabajo. Por otro lado, los niveles basales de GST muestran que hay una mayor actividad de esta enzima en el hígado al ser comparada con el colon. Esto es importante, ya que una mayor inducción de enzimas detoxificantes en hígado permite una eliminación más rápida de los carcinógenos que posteriormente podrían actuar en el colon. Además, se puede observar que no existe una relación entre la actividad enzimática de GST en colon proximal y colon distal, teniéndose una menor actividad de GST en colon distal.

Estos resultados demuestran la capacidad de los compuestos presentes en estas especies vegetales de aumentar la actividad enzimática de GST en hígado y colon proximal. Lo anterior que podría verse reflejado en una disminución de las lesiones inducidas en un modelo de cáncer al permitir una mayor desintoxicación del organismo de los electrófilos reactivos generados por la DMH en el colon.

Para fines comparativos, los datos de la actividad enzimática de GST en hígado, colon proximal y distal de las ratas tratadas con los extractos acuosos de *M. parviflora*, *C. murale*, y *P. oleraceae* a las concentraciones de 100 y 400 mg/kg, se muestran en el cuadro 5. Como se puede observar no existe una relación entre la actividad enzimática de GST en colon proximal y colon distal, teniéndose una menor actividad de GST en colon distal.

Cuadro 5. Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado, colon proximal y distal de las ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuosos.

Tratamiento (n=3)	GST (nmol/mg proteína x min)		
	Hígado	Colon proximal	Colon distal
Control	750 ± 21	50 ± 5.4	29 ± 0.3
<i>M. parviflora</i> 100 mg/kg	943 ± 22 *	72 ± 3.1 *	29 ± 1.4
400 mg/kg	914 ± 26 *	63 ± 2.3 *	41 ± 1.9 *
<i>C. murale</i> 100 mg/kg	966 ± 13 *	91 ± 1.6 *	28 ± 0.9
400 mg/kg	1044 ± 24 *	69 ± 6.6 *	29 ± 1.0
<i>P. oleraceae</i> 100 mg/kg	1049 ± 45 *	64 ± 2.3 *	36 ± 1.4 *
400 mg/kg	806 ± 26	57 ± 2.2	35 ± 1.8

* Diferencia estadística comparado con el control por la prueba de Dunn (P<0.001). Los resultados son la media de 3 experimentos con 3 repeticiones ± EE. Extracto administrado en el alimento molido durante 1 semana a las concentraciones de 100 y 400 mg/kg.

Estos resultados demuestran la capacidad de los compuestos presentes en estas especies vegetales de aumentar la actividad enzimática hepática de glutatión-S-transferasa. Lo que podría verse reflejado en una disminución de las lesiones inducidas en un modelo de cáncer al permitir una mayor detoxificación del organismo de los electrófilos reactivos generados por la DMH en el colon.

7.3.4 Efecto de los extractos acuosos sobre la actividad enzimática de quinona reductasa (NQO1)

La enzima NQO1 es una flavoproteína citosólica que cataliza la reducción de quinonas, los cuales son compuestos con un alto poder oxidante, a enoles por medio de 2 electrones, antes de su conjugación con ácido glucorónido o sulfato. NQO1 también cataliza la reducción de 2 electrones en óxidos de nitrógeno, lo cual está caracterizado en muchas especies animales incluyendo humanos; además, mantiene el balance redox en la célula (Begleiter y col., 2003). La reducción catalizada por NQO1 puede inactivar directamente carcinógenos o sus metabolitos y hacerlos sustratos más adecuados para GST, haciendo más fácil su eliminación de

las células (Begleiter y col., 1997). La literatura reporta que la enzima NQO1 puede ser inducida con el tratamiento de plantas o sus extractos en diferentes órganos de roedores (Chen y col., 2005). Similarmente, NQO1 puede ser inducida por varios xenobióticos (Talalay y col., 1998).

En hígado, la actividad de NQO1 se incrementó significativamente en un 72.6% con la concentración de 100 mg/kg de extracto de *M. parviflora* y un 33.3% con la concentración de 400 mg/kg de extracto de *P. oleraceae* ($P < 0.001$) (Figura 14).

Por el contrario, en colon distal se observó un aumento significativo de la actividad de quinona reductasa de 29.3% con la concentración de 100 mg/kg de extracto de *C. murale* ($P < 0.001$) (Figura 14).

En estudios iniciales por el grupo de trabajo, Subías-Juárez (2006) evaluó la capacidad de plantas comestibles para inducir enzimas de desintoxicación en células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c4. En este estudio las células fueron tratadas por 48 horas con las diferentes concentraciones de los extracto acuoso y metanólicos de *Portulaca oleraceae*, observando un incremento del 17% en la actividad de NQO1 con la concentración de 0.5 mg/ml respecto al grupo control. En cuanto a la evaluación del extracto metanólico sobre la actividad de NQO1, el extracto no mostró inducción de la actividad de NQO1 a ninguna de las concentraciones evaluadas.

Gutiérrez (2006) observó un aumento de la actividad de NQO1 en el hígado de ratas Sprague-Dawley tratadas intragástricamente con 50, 100 y 200 mg/kg del extracto acuoso de *C. murale* y *M. parviflora* durante 7 días, siendo estadísticamente significativo con 100 mg/kg de extracto de *M. parviflora* (35%), con respecto al control ($P < 0.05$). Para colon distal se reportó un aumento significativo del 31 y 34% para los extractos de *M. parviflora* y *C. murale*.

Por otro lado, Piña-Zentella (2007) reporta un aumento significativo de la actividad de NQO1 en hígado de (46% con ambas concentraciones) por efecto de la administración intragástrica del extracto acuoso de *P. oleraceae* en ratas Fisher F344 a concentraciones de 100 y 200 mg/kg, comparado con el grupo control. Sin

embargo, en este estudio se reporta una disminución significativa del 10% en la actividad de NQO1 en colon distal con ambas concentraciones de 100 y 200 mg/kg de extracto.

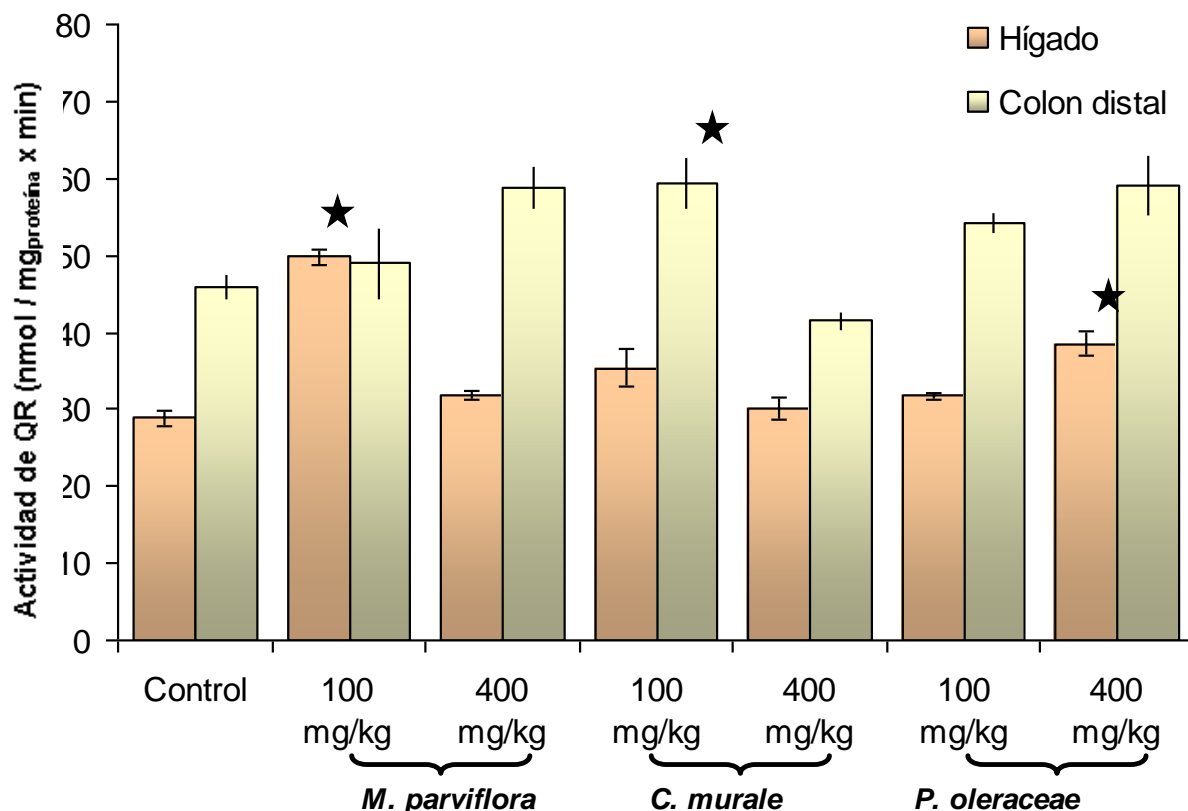


Figura 14. Actividad enzimática de quinona reductasa (NQO1) en hígado y colon distal de las ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuosos de *M. parviflora*, *C. murale* y *P. oleraceae*.

* Diferencia estadística comparado con el control por la prueba de Dunn ($P < 0.001$). Los resultados son la media de 3 experimentos con 3 repeticiones \pm EE. Extracto administrado en el alimento molido durante 1 semana a concentraciones de 100 y 400 mg/kg.

En general, se observa que los extractos acuosos de *M. parviflora* y *P. oleraceae* aumentaron en un 29 a 72% la actividad enzimática de NQO1 tanto en hígado como en colon distal. Gutiérrez (2006) y Piña-Zentella (2007) reportan aumentos porcentuales semejantes lo cual nos indica que la inducción de esta enzima pudiera ser independiente de la vía de administración.

Una posible explicación a esta menor inducción es que probablemente algún componente del extracto pudiera estar activando factores de transcripción que

compiten por el mismo Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE/EpRE), evitando la inducción de la NQO1 en este órgano. En 1999, Radjendirane y Kuttan (2003) reportaron la competencia entre Nrf2, Fra y Fos (factores de transcripción que dimerizan con las proteínas small Maf, entre otras) por los ARE presentes en la región promotora de transcripción de enzimas de fase 2 y antioxidantes, disminuyendo de esta manera la inducción de enzimas de fase 2. Hay que resaltar que la actividad de enzimas del presente estudio no fue menor que la expresión basal con todos los extractos acuosos respecto al grupo control.

Para fines comparativos, los datos de la actividad enzimática de NQO1 en hígado y colon distal de las ratas tratadas con los extractos acuosos de *M. parviflora*, *C. murale*, y *P. oleraceae* a las concentraciones de 100 y 400 mg/kg, se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Actividad enzimática de quinona reductasa (NQO1) en hígado y colon distal de las ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuosos.

Tratamiento (n=3)	NQO1 (nmol/mg de proteína x min)	
	Hígado	Colon distal
Control	28 ± 1.1	45 ± 0.6
<i>M. parviflora</i> 100 mg/kg	49 ± 1.0 *	48 ± 4.8
400 mg/kg	31 ± 0.5	58 ± 4.3
<i>C. murale</i> 100 mg/kg	35 ± 2.3	59 ± 3.4 *
400 mg/kg	30 ± 1.4	41 ± 1.2
<i>P. oleraceae</i> 100 mg/kg	31 ± 0.4	54 ± 1.4
400 mg/kg	38 ± 1.5 *	58 ± 3.9

* Diferencia estadística comparado con el control por la prueba de Dunn (P<0.001).

Los resultados son la media de 3 experimentos con 3 repeticiones ± EE. Extracto administrado en el alimento molido durante 1 semana a las concentraciones de 100 y 400 mg/kg.

7.3.5 Selección de la concentración de extracto acuoso con mayor potencia inductora de GSH y enzimas detoxificantes

El cuadro 7 muestra el contenido de GSH y las actividades de las enzimas detoxificantes en hígado, colon proximal y distal de las ratas tratadas con los extractos acuosos de *M. parviflora*, *C. murale*, y *P. oleraceae* a las concentraciones de 100 y 400 mg/kg.

Cuadro 7. Concentración de GSH y actividad de enzimas detoxificantes en hígado y colon distal de las ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuosos.

	GSH		GST		NQO1	
	Hígado	Hígado	Colon proximal	Colon distal	Hígado	Colon distal
Control	108 ± 4.6	750.8 ± 21.0	50.7 ± 5.4	29.8 ± 0.3	28.8 ± 1.1	45.8 ± 0.6
<i>M. parviflora</i>						
100 mg/kg	124.0 ± 4.8	943.8 ± 22.5 *	72.0 ± 3.1 *	29.3 ± 1.4	49.8 ± 1.0 *	48.9 ± 4.8
400 mg/kg	113.2 ± 4.6	914.6 ± 26.6 *	63.7 ± 2.3 *	41.9 ± 1.9 *	31.7 ± 0.5	58.8 ± 4.3
<i>C. murale</i>						
100 mg/kg	130.7 ± 6.8 *	966.8 ± 13.5 *	91.4 ± 1.6 *	28.4 ± 0.9	35.4 ± 2.3	59.3 ± 3.4 *
400 mg/kg	118.4 ± 3.2	1044.6 ± 24.1 *	69.7 ± 6.6 *	29.4 ± 1.0	30.0 ± 1.4	41.4 ± 1.2
<i>P. oleraceae</i>						
100 mg/kg	100.2 ± 3.4	1049.2 ± 45.2 *	64.6 ± 2.3 *	36.1 ± 1.4 *	31.7 ± 0.4	54.1 ± 1.4
400 mg/kg	90.3 ± 4.3	806.5 ± 26.4	57.7 ± 2.2	35.4 ± 1.8	38.4 ± 1.5 *	58.9 ± 3.9

* Diferencia estadística comparado con el control por la prueba de Dunn ($P < 0.001$).

Los resultados son la media de 3 experimentos con 3 repeticiones ± EE.

Extracto administrado en el alimento molido durante 1 semana a las concentraciones de 100 y 400 mg/kg.

Como se ha descrito anteriormente, se realizaron estos estudios para determinar la concentración de los extractos con mayor potencia inductora sobre los biomarcadores GSH y enzimas detoxificantes, para evaluarlos finalmente en un modelo de cáncer de colon. El análisis estadístico mostró una mejor respuesta en estos biomarcadores con la concentración de 100 mg/kg de los extractos incorporados al alimento. Así mismo, mediante el análisis de correlación de Pearson se determinó el grado de dependencia lineal entre la concentración de GSH y la actividad de enzimas detoxificantes y la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de *M. parviflora*, *C. murale* y *P. oleraceae* (Cuadro 8).

Para *M. parviflora* se tiene un coeficiente de correlación de 0.834 entre la concentración de GSH en hígado y la actividad enzimática de GST en colon proximal ($P < 0.0391$), esto nos indica que el extracto de *M. parviflora* aumenta la concentración GSH en hígado y se tiene, también como resultado, un aumento lineal de la actividad enzimática de GST en colon proximal.

Para la actividad antioxidante de *C. murale* se tiene un coeficiente de correlación de 0.726 para la actividad enzimática de NQO1 en hígado y colon proximal ($P < 0.0416$). Por otro lado, actividad antioxidante de *C. murale* y la actividad enzimática de NQO1 en colon distal mostraron un coeficiente de correlación de 0.997 ($P < 0.0488$), esto nos muestra que la capacidad antioxidante de este extracto correlaciona con su capacidad para aumentar la actividad enzimática de NQO1 tanto en hígado como en colon distal. Para *P. oleraceae* no se encontró ningún valor de correlación positiva o con valor de P por debajo de 0.005.

Cuadro 8. Coeficientes de correlación de Pearson de la actividad antioxidante de los extractos acuosos con la concentración de GSH y la actividad enzimática de GST y NQO1.

Capacidad Antioxidante	GSH		GST		NQO1	
	Hígado	Hígado	Colon proximal	Colon Distal	Hígado	Hígado
<i>M. parviflora</i>	0.634 *	-0.289	0.223	0.560	-0.131	-0.109
GSH	0.251 §	0.637	0.719	0.326	0.834	0.862
		-0.658	0.834	0.465	0.265	0.118
		0.155	0.039	0.353	0.612	0.824
<i>C. murale</i>	0.837	0.463	-0.928	0.989	0.921	0.997
GST Distal	0.369	0.693	0.243	0.095	0.254	0.049
					0.726	0.062
					0.042	0.907

* Coeficiente de correlación.

§ Probabilidad.

Dos variables con coeficientes de correlación positiva y valores de P por debajo de 0.050 tienden siempre a incrementarse. Para las variables con coeficiente de correlación negativa y valores de P por debajo de 0.050 una de las variables tiende a disminuir mientras que la otra se incrementa. Para variables con valores de P mayores a 0.050 no hay relación entre ambas variables.

Segunda Etapa:

7.4 Efecto quimioprotector de los extractos acuosos de *M. parviflora* y *P. oleraceae* sobre el desarrollo de cáncer de colon inducido con DMH en ratas Sprague-Dawley

7.4.1 Ganancia de peso, consumo de alimento y sobrevivencia de ratas inducidas con DMH y tratadas con los extractos acuosos

En la segunda etapa del experimento se trabajó con un modelo de inducción de cáncer de colon con DMH en ratas Sprague-Dawley, determinándose semanalmente varios parámetros, entre ellos el peso corporal, el consumo de alimento y la sobrevivencia, siendo el peso inicial de las ratas de 97 a 115 g y el peso final a las 18 semanas de 350 a 388 g (Figura 15); mientras que el consumo de alimento al final del experimento fue de 30 a 38 g (Cuadro 9).

La determinación del peso corporal y consumo de alimento son parámetros importantes en un modelo de cáncer, ya que son indicadores del crecimiento o desarrollo de los animales en presencia de algún tratamiento. A este respecto, se encontró que el carcinógeno no afectó de manera significativa el crecimiento de los animales, ya que su peso corporal es muy similar al peso del grupo control (Figura 15). Estos resultados demuestran que la DMH a la dosis empleada para inducir cáncer de colon no afecta significativamente el desarrollo o crecimiento de los animales.

Tal y como se esperaba, la incorporación de los extractos en el alimento no presentó un efecto negativo sobre el crecimiento de los animales de experimentación. Por el contrario, se observa que las ratas que recibieron los extractos acuosos tuvieron una mayor ganancia de peso durante el periodo experimental, comparadas con el grupo control negativo y DMH; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 15).

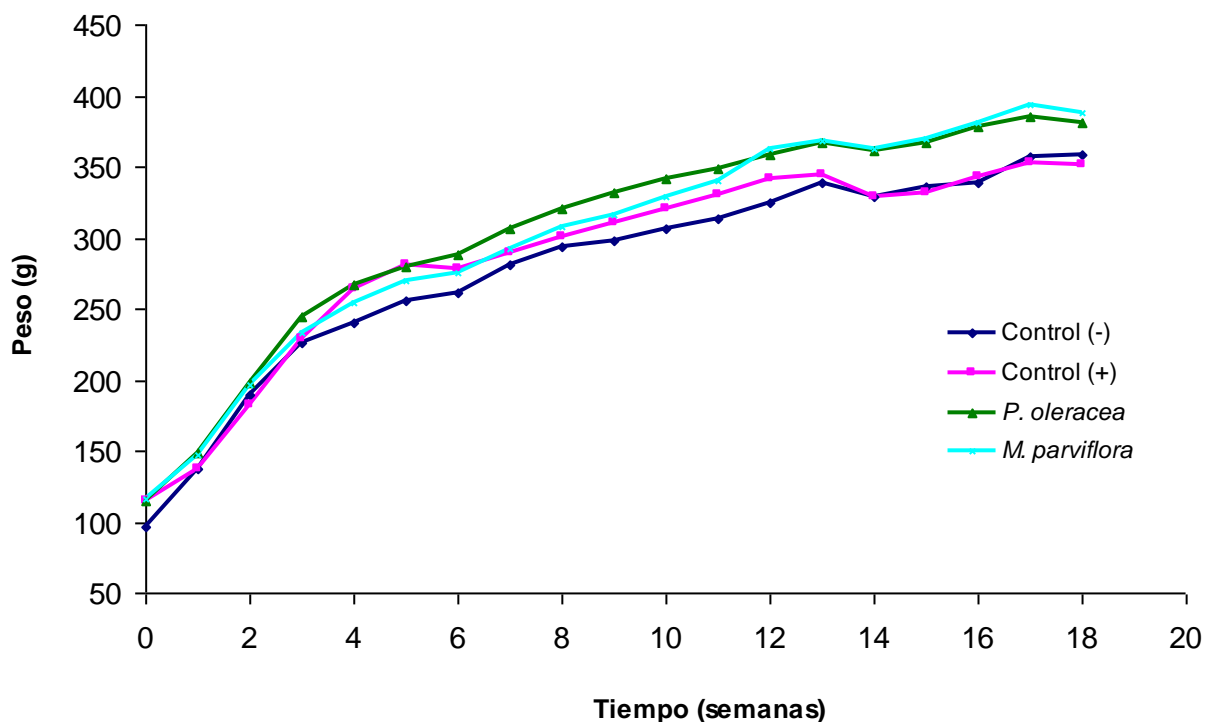


Figura 15. Peso de las ratas tratadas con los extractos acuosos de *M. parviflora* y *P. oleraceae* a concentraciones de 100 mg/kg e inducidas con 21 mg/kg de DMH.

No hay diferencia estadística significativa entre los grupos por la prueba de Dunnett ($P < 0.001$). Los resultados son la media de 3 experimentos con 3 repeticiones \pm EE.

El grupo tratado sin DMH presentó un porcentaje de supervivencia del 100%, el grupo tratado con DMH un porcentaje del 88.46%, y los grupos tratados con *M. parviflora* y *P. oleraceae* una supervivencia del 92 y 96%, respectivamente. Por otro lado, el grupo control negativo (sin DMH) presentó un porcentaje de supervivencia del 90%; la muerte de un animal en este grupo ocurrió en la semana 6 de experimentación y estuvo relacionada directamente con el peso bajo del animal desde el inicio del experimento, con respecto al resto de los animales del grupo control (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto de los extractos acuosos sobre el peso, el consumo de alimento y la sobrevivencia de ratas Sprague-Dawley inducidas con DMH[§]

Tratamiento	Peso corporal (g)*	Consumo de alimento (g) **	Sobrevivencia (%)
Control	358.18 ± 56.4 a	32.4 ± 7.3 a	90.0 (n = 9)
DMH	350.83 ± 55.1 a	38.6 ± 6.2 a	88.5 (n = 23)
<i>M. parviflora</i> [¶]	380.67 ± 39.8 a	33.4 ± 5.8 a	92.3 (n = 25)
<i>P. oleraceae</i> [¶]	388.59 ± 26.0 a	30.1 ± 4.1 a	96.2 (n = 24)

* Peso de los animales al final del período experimental (18 semanas).

** Consumo de alimento por animal al final del período experimental durante un tiempo de 24 horas.

[§] DMH = 1,2-dimetilhidracina (21 mg/kg de peso corporal, una vez por semana, durante 8 semanas).

[¶] Alimento suplementado con 100 mg de extracto/kg de peso corporal.

a,b,c indican diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey (P<0.001)

7.4.2 Evaluación macroscópica del colon en ratas con cáncer inducido con DMH

De acuerdo a la literatura, los tumores intestinales inducidos con la DMH pueden agruparse en: tumores sésiles, tumores pedunculados, tumores exofíticos, tumores endofíticos y placas (Piñols, 1998). En base a lo anterior, en la figura 16 se muestra lesiones representativas encontradas en la zona distal del colon de ratas inducidas con la DMH. Es importante mencionar que el grupo control negativo (sin DMH) no presentó ningún tipo de lesión o displasia tanto en la zona proximal como en la distal.

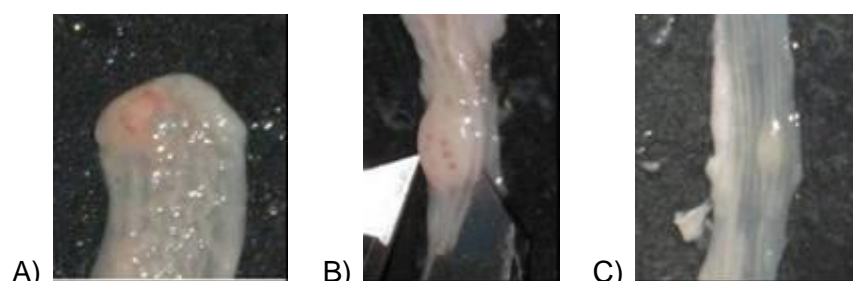


Figura 16. Lesiones encontradas en la zona distal del colon de ratas inducidas químicamente con DMH. A) y B) tumor endofítico; C) placas.

En la figura 17 se muestran lesiones representativas encontradas en la zona proximal del colon de ratas inducidas con la DMH.

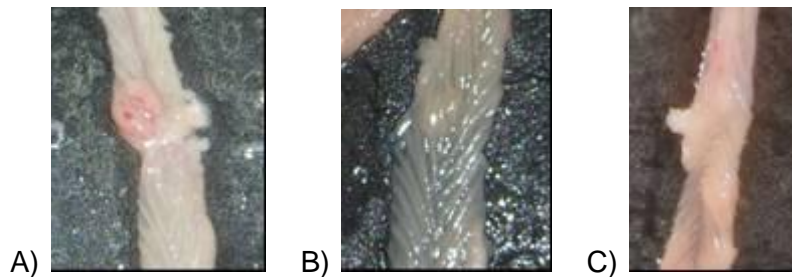


Figura 17. Lesiones encontradas en la zona proximal del colon de ratas inducidas químicamente con DMH. A) tumor endofitico; B) placas; C) tumor pedunculado.

En general, no se observaron lesiones en los órganos adyacentes al colon o al hígado lo cual nos muestra la selectividad de carcinógeno DMH sobre el colon. Sin embargo, un animal del grupo tratado con *P. oleraceae* desarrolló un tumor en hígado, ocupando casi la tercera parte del órgano, ya que posiblemente se trataba de un animal muy sensible. De acuerdo a Piñols (1998), los tumores observados en el presente estudio fueron principalmente del tipo endofitico, seguido del tipo pedunculado. Además, en el grupo control positivo se observaron tumores ulcerativos, mismos que no se presentaron en los grupos tratados con los extractos acuosos de *M. parviflora* y *P. oleraceae*.

En el cuadro 10 se muestran los resultados derivados del análisis macroscópico y conteo de tumores encontradas en los animales de los diferentes tratamientos. Como se mencionó previamente no se encontraron tumores o displasias en los animales del grupo control negativo (sin DMH). Por otro lado, el grupo tratado con el extracto acuoso de *P. oleraceae* presentó la menor incidencia de animales con tumores de todos los grupos tratados. Inesperadamente, se observó la mayor incidencia de animales con tumores en el grupo tratado con el extracto acuosos de *M. parviflora*.

El número promedio de tumores indica el número total de tumores encontrados entre el número de ratas en el grupo. A este respecto, el grupo tratado con los extractos acuosos de *P. oleraceae* y *M. parviflora* presentaron el menor número de tumores por rata. En lo que respecta a la multiplicidad, este valor

representa el número total de placas o tumores en el grupo entre el número de ratas únicamente con tumores. De acuerdo al cuadro 10, los tratamientos con los extractos de *M. parviflora* y *P. oleraceae* muestran valores de multiplicidad de 1.00 y 1.33, respectivamente, menor al grupo DMH. Este parámetro indica la agresividad del cáncer, y en base a los resultados se observa la efectividad del tratamiento sobre este parámetro.

Cuadro 10. Porcentaje de incidencia, número promedio y multiplicidad de tumores de ratas tratadas con DMH y los extractos acuosos a concentraciones de 100 mg/kg.

Tratamiento	Total de ratas	Tumores	Incidencia* (%)	Promedio por rata**	Multiplicidad [§]
Control	9	0	0.0	0.00	0.00
DMH	23	5	13.0	0.21	1.66
<i>M. parviflora</i>	25	4	16.0	0.16	1.00
<i>P. oleraceae</i>	24	4	12.5	0.16	1.33

* Incidencia: la relación del número de animales con tumores entre el número total de ratas en el grupo.

** Promedio: la relación del número total de tumores entre el número total de ratas en el grupo.

[§] Multiplicidad: la relación del número total de tumores entre el número de animales con tumores.

Se llevó a cabo un análisis de tablas de contingencia o prueba χ^2 para determinar el efecto de los extractos en la incidencia de tumores, no encontrándose diferencia estadística ($P=0.05$). Por lo tanto, aunque el grupo tratado con *M. parviflora* muestra una incidencia mayor, ésta no es significativa con respecto al grupo DMH. Similarmente, no se encontraron diferencias significativas en el número promedio de tumores por efecto de los extractos ($P=0.06$) por un análisis de diferencia de medias. En cuanto a la multiplicidad, se obtuvo un de $P=0.204$, lo cual nos indica que los extractos no tuvieron un efecto sobre la agresividad de los tumores en colon en las ratas en cada uno los grupos experimentales.

En el cuadro 11 se muestran los resultados derivados del análisis macroscópico y conteo de lesiones (placas) encontradas en los animales de los diferentes tratamientos. El grupo tratado con el extracto acuosos de *P. oleraceae* presentó la mayor incidencia de animales con placas de todos los grupos tratados,

seguido del grupo tratado con *M. parviflora* y del grupo tratado con DMH. En cuanto al número promedio de placas, el grupo tratado con los extractos acuosos de *P. oleraceae* y *M. parviflora* presentaron el mayor número de placas por rata. En lo que respecta a la multiplicidad, los tratamientos con los extractos de *M. parviflora* y *P. oleraceae* muestran valores de multiplicidad de 1.26 y 1.27, respectivamente, mayor al grupo DMH. Debido a que se encontraron placas en los animales del grupo control negativo (sin DMH), el conteo de placas pudieran no ser un buen indicador para evaluar el efecto de extractos u otros materiales en este modelo de cáncer.

Cuadro 11. Porcentaje de incidencia, número promedio y multiplicidad de placas de ratas tratadas con DMH y los extractos acuosos a concentraciones de 100 mg/kg.

Tratamiento	Total de ratas	Placas	Incidencia* (%)	Promedio por rata**	Multiplicidad [§]
Control	9	2	11.1	0.22	1.00
DMH	23	14	43.4	0.52	1.20
<i>M. parviflora</i>	25	15	60.0	0.76	1.26
<i>P. oleraceae</i>	24	17	75.0	0.95	1.27

* Incidencia: la relación del número de animales con placas entre el número total de ratas en el grupo.

** Promedio: la relación del número total de placas entre el número total de ratas en el grupo.

[§] Multiplicidad: la relación del número total de placas entre el número de animales con placas.

Igualmente, se llevó a cabo un análisis de tablas de contingencia para determinar la incidencia de las placas de cada uno de los grupos utilizando la prueba χ^2 . Para la incidencia de placas se obtuvo un valor de $P < 0.01$, lo cual nos indica que hay diferencia de los grupos tratados con el extracto acuoso respecto al tratado con DMH, es decir, el número de ratas con placas es estadísticamente mayor en los grupos tratados con los extractos acuosos. Para la diferencia estadística de los grupos respecto a las placas promedio por rata se llevó a cabo un análisis de diferencia de medias, encontrándose diferencias significativas ($P = 0.033$), esto nos muestra que el tratamiento con extractos acuosos incrementaron el promedio de placas en colon en cada uno de los grupos. En cuanto a la multiplicidad se realizó el mismo análisis encontrándose que también un análisis de diferencia de medias,

obteniendo un valor de $P=0.412$, esto nos indica que los extractos no tuvieron un efecto sobre el número de placas en colon en las ratas en cada uno de los grupos experimentales.

De acuerdo a su anatomía, el colon se divide en: colon ascendente (proximal), transversal (medio), descendente (distal) y colon sigmoideo (recto). De manera más específica, la localización del cáncer de colon por orden de frecuencia es en primer lugar en el recto (50%), seguido del sigmoideo (20%), colon derecho y ciego (12%), ascendente o proximal (5%), transversal o medio (6%), y descendente o distal (7%) (Piñols, 1998). En base a lo anterior, en la figura 18 se muestra la distribución de las displasias (placas o tumores) encontradas por zona del colon de ratas inducidas químicamente con la DMH y tratadas con los extractos acuosos de *M. parviflora* y *P. oleraceae*.

Los resultados muestran que los tumores encontrados en los grupos control positivo (DMH) y tratados con los extractos acuosos de *M. parviflora* y *P. oleraceae* se localizan principalmente en la zona proximal del colon. Estos resultados coinciden con la literatura. Por otro lado, es importante resaltar el hecho de que se presentaron menor cantidad de lesiones en la zona distal del colon de ratas tratadas con extractos acuosos de *M. parviflora* y *P. oleraceae*, se ha encontrado que esta zona es muy susceptible al desarrollo de tumores en humanos, observándose menor cantidad de lesiones (placas) con el extracto de *M. parviflora* en colon distal. Por lo que estos resultados son de gran relevancia para prevenir el desarrollo de cáncer de colon en humanos (Figura 18).

Los resultados anteriormente descritos sugieren aparentemente que los extractos de *M. parviflora* y *P. oleraceae* carecen de un potencial quimioprotector en el modelo de cáncer colon inducido químicamente con DMH. Sin embargo, es importante aclarar que únicamente se reporta el análisis macroscópico y visual de las lesiones encontradas y que, por lo tanto, es necesario el estudio histopatológico para descartar o resaltar el efecto quimioprotector de estas plantas.

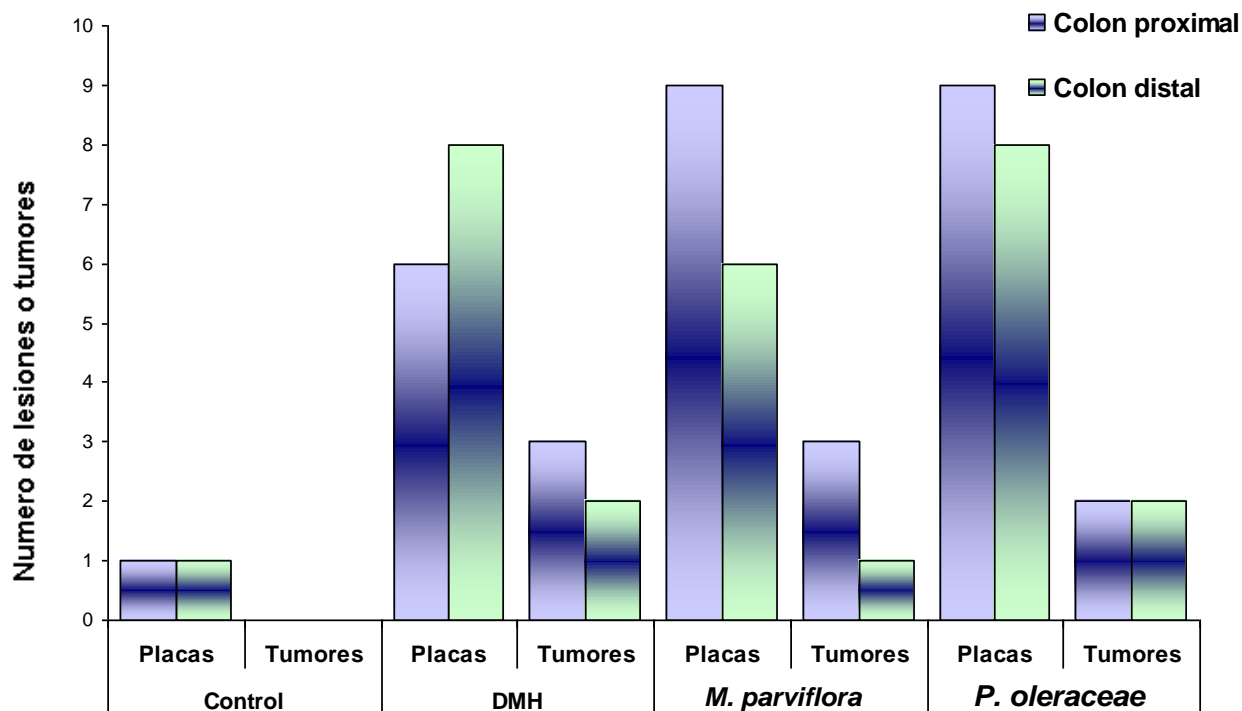


Figura 18. Distribución de placas y tumores en el colon de cada uno los grupos tratados con 21 mg/kg de DMH y los extractos acuosos de *M. parviflora* y *P. oleraceae* a concentraciones de 100 mg/kg.

7.4.3 Efecto de los extractos acuosos sobre la concentración de glutatión reducido (GSH) en hígado en las ratas tratadas con DMH

Debido a la protección aparente que ejercieron los extractos de *M. parviflora* y *P. oleraceae* fue importante determinar la contribución de la capacidad inductora en el efecto quimioprotector de los extractos. En base a los resultados del presente estudio, se observa que al administrar los extractos acuosos (100 mg/kg) y la DMH se incrementa significativamente la concentración de GSH en hígado de ratas respecto al control, de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$) (Figura 19). Así mismo, el extracto de *M. parviflora* indujo de forma significativa una mayor concentración de GSH (66%) en hígado respecto al grupo control y en un 21% respecto al grupo tratado con DMH. Por el contrario, el extracto de *P. oleraceae* no incrementó la concentración de GSH respecto al grupo DMH, pero si en relación al grupo control tratado con DMH en un 37% ($P < 0.05$). Esto demuestra la capacidad de *M. parviflora* de inducir este cofactor o incrementar el poder reductor en el hígado de

ratas con cáncer de colon. Comparados estos resultados con los obtenidos para la concentración de GSH de la primera etapa, se observa que la DMH incrementa la concentración de GSH respecto a los valores obtenidos esto se debe a que con presencia de xenobióticos se tiene una mayor incremento de los niveles basales de este cofactor.

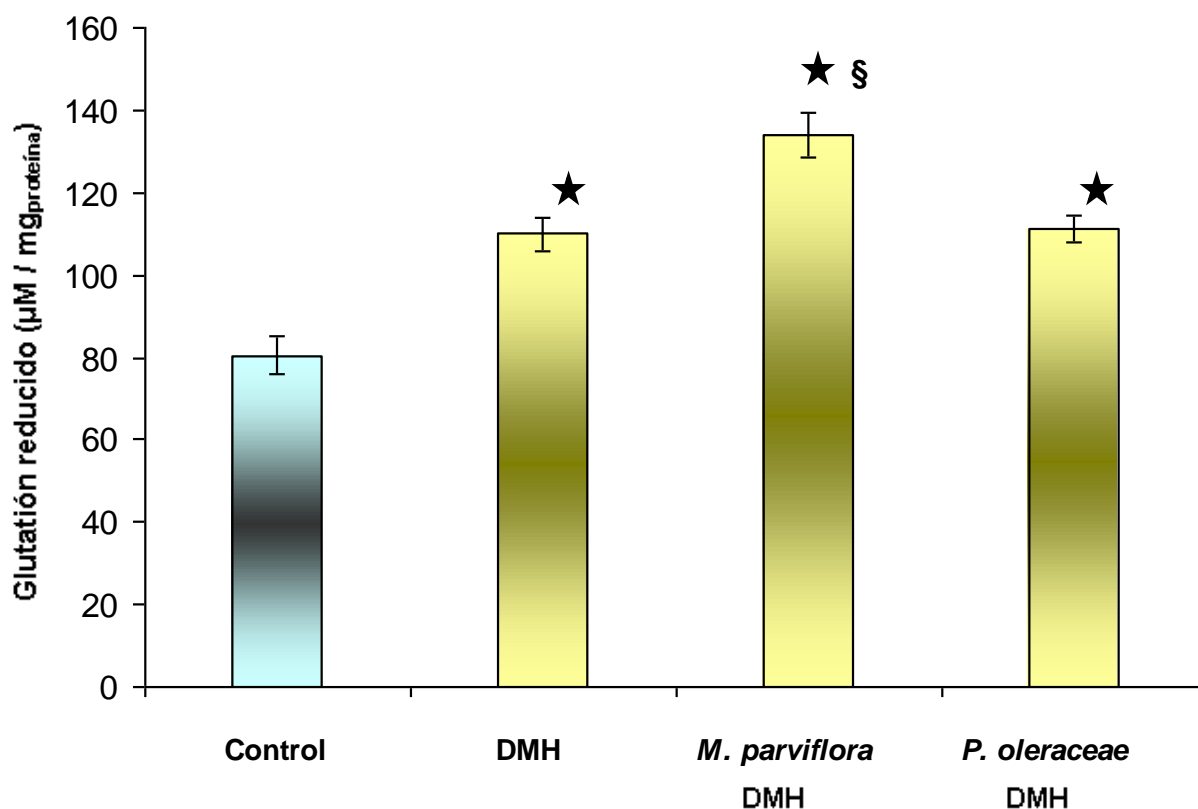


Figura 19. Concentración de GSH en hígado de ratas inducidas con 21 mg/kg de DMH y alimentas con extractos acuosos de *M. parviflora* y *P. oleraceae* a concentraciones de 100 mg/kg.

* Estadísticamente diferente con respecto al control por la prueba de Dunnett (P<0.05).

§ Estadísticamente diferente con respecto al grupo DMH por la prueba de Dunnett (P<0.05).

Los resultados son la media de 5 experimentos independientes por triplicado \pm EE.

Los carcinógenos químicos, como otros xenobióticos, son eliminados del cuerpo a través de la acción de dos tipos de reacciones enzimáticas: la hidroxilación con citocromos P-450 seguida de la conjugación de moléculas solubles en agua como el glutatiión. Desafortunadamente, la hidroxilación produce compuestos altamente electrofílicos y carcinogénicos. Por otro lado, la identificación o aislamiento de compuestos que inducen específicamente la conjugación de

compuestos carcinógenos, como la inducción de GST que interviene en la neutralización de compuestos electrofílicos, resulta conveniente. Compuestos como las ditioltionas, los glucosinolatos o compuestos fenólicos se incluyen dentro de los compuestos que inducen una mayor actividad de enzimas de fase 2 (Boone y col. 1990). En base a lo anterior fue importante la determinación de la actividad de la enzima GST en el modelo de cáncer de colon.

7.4.4 Efecto de los extractos acuosos sobre la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado en las ratas tratadas con DMH

En cuanto a la actividad de la enzima GST en colon e hígado, se observó que los niveles basales de esta enzima varían dependiendo del órgano, siendo mayores en el hígado. Para este órgano, se observó que el extracto acuoso de *P. oleraceae* en presencia de DMH aumentó en un 68% la actividad enzimática de GST en hígado respecto al grupo control sin DMH y en un 5% respecto al grupo control tratado con DMH. El extracto de *M. parviflora* en presencia de DMH no incrementó la actividad hepática de GST respecto al grupo DMH, pero si en relación al grupo control negativo (15%). El grupo tratado con DMH y el grupo DMH + *P. oleraceae* aumentaron de manera significativa la actividad de GST en hígado respecto al control (Dunnett $P < 0.05$), pero ninguno de los grupos tratados con extracto acuoso y la DMH aumentó la actividad respecto al grupo tratado con DMH (Figura 20). La falta de inducción con el tratamiento del extracto de *M. parviflora* a la concentración de 100 mg/kg en la actividad de GST en el hígado nos indica que probablemente durante el tratamiento crónico (18 semanas) de dicho extracto, pudo incrementarse la concentración de algún compuesto que compite con el mismo elemento de respuesta para la inducción de esta enzima y, por lo tanto, mostrar una menor actividad enzimática respecto a los otros tratamientos con DMH pero no respecto al grupo control.

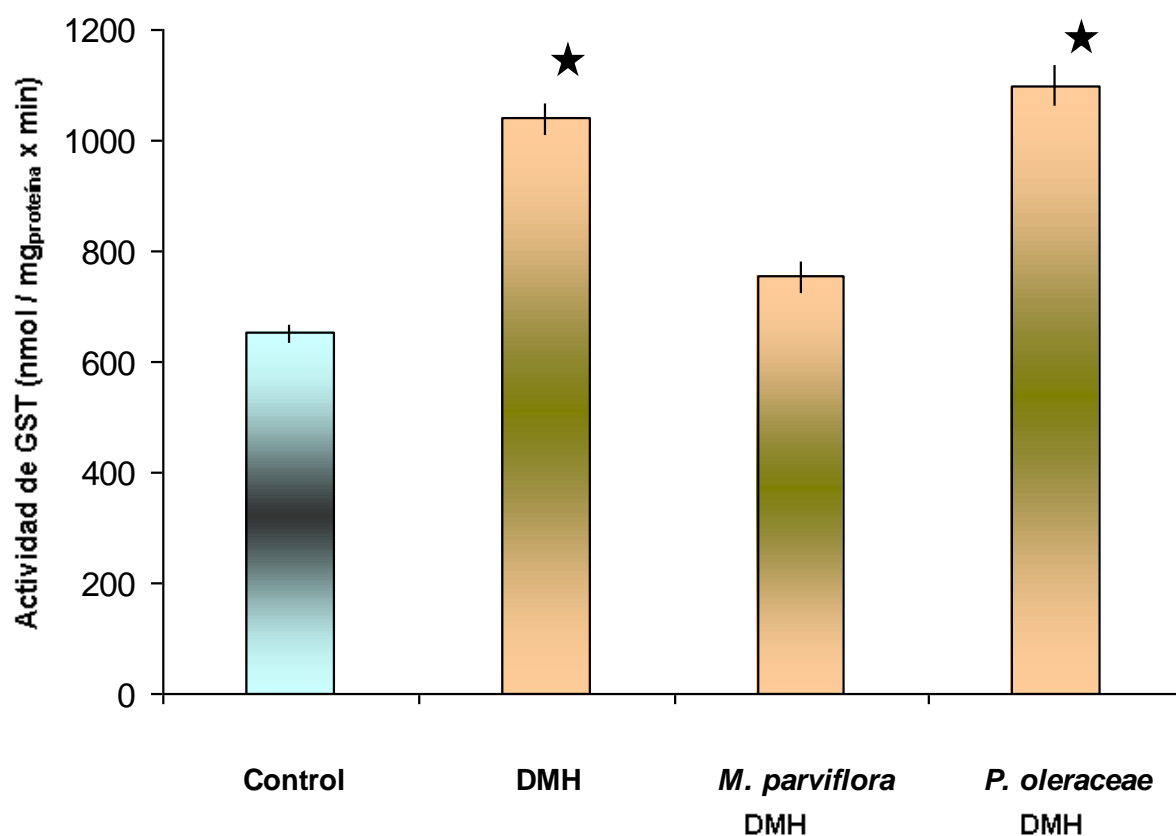


Figura 20. Actividad enzimática de GST en hígado de ratas inducidas con 21 mg/kg de DMH y alimentadas con extractos acuosos de *M. parviflora* y *P. oleraceae* a concentraciones de 100 mg/kg.

* Estadísticamente diferente con respecto al control por la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

[§] Estadísticamente diferente con respecto al grupo DMH por la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

Los resultados son la media de 5 experimentos independientes por triplicado \pm EE.

La menor inducción del tratamiento del extracto de *M. parviflora* (100 mg/kg) sobre la actividad de GST en el hígado respecto a los otros grupos tratados con DMH nos indica que probablemente durante el tratamiento crónico (18 semanas) de dicho extracto, pudo incrementarse la concentración de algún compuesto que compite con el mismo elemento de respuesta que regula transcripcionalmente a esta enzima y, por lo tanto, una menor actividad enzimática.

7.4.5 Efecto de los extractos acuosos sobre la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en colon proximal en las ratas tratadas con DMH

En base a los resultados se observa que no se obtuvieron aumentos significativos en la actividad de GST en colon proximal con ninguno de los tratamientos respecto al grupo control negativo o con respecto al grupo tratado con DMH (Figura 21). Únicamente se observó que el extracto acuoso de *M. parviflora* en presencia de DMH aumentó la actividad de GST (5%) respecto al grupo DMH, pero este incremento no fue estadísticamente significativo.

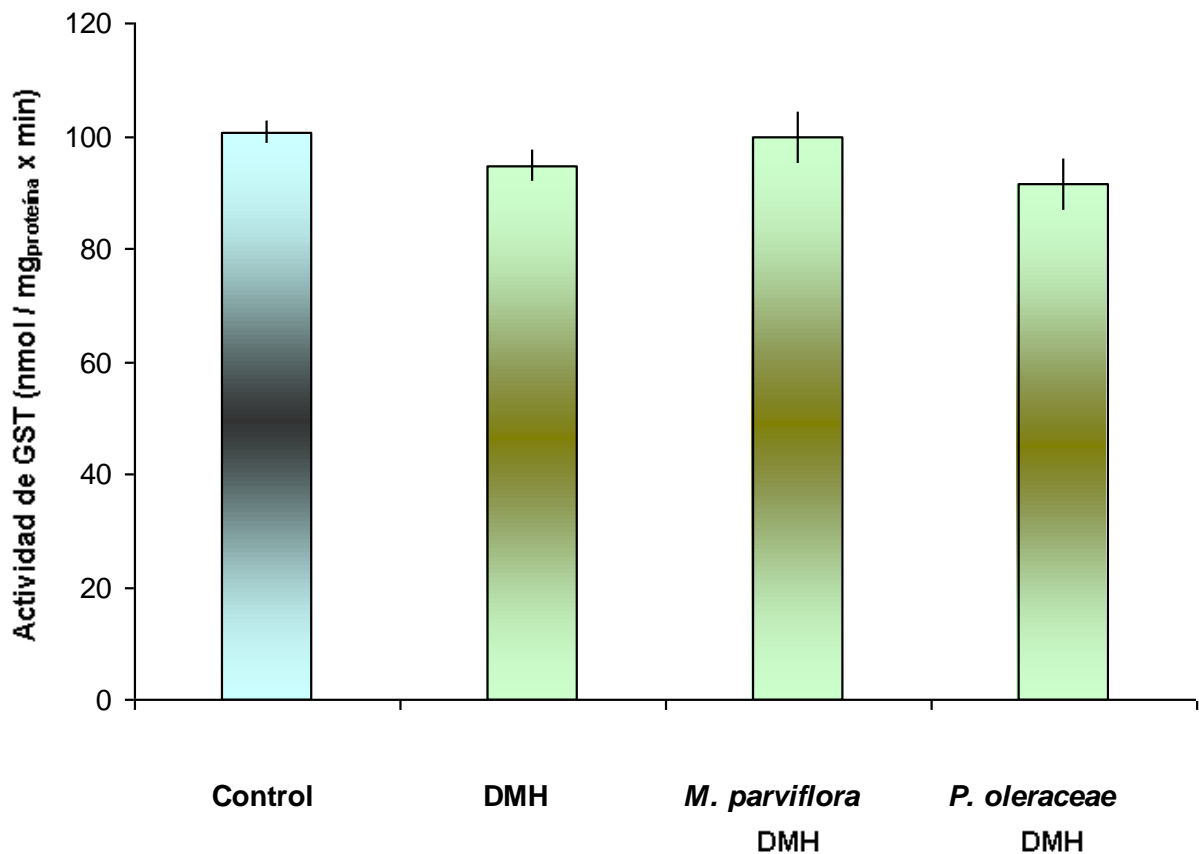


Figura 21. Actividad enzimática de GST en colon proximal de ratas inducidas con 21 mg/kg de DMH y alimentas con extractos acuosos de *M. parviflora* y *P. oleraceae* a concentraciones de 100 kg/kg.

* Estadísticamente diferente con respecto al control por la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

§ Estadísticamente diferente con respecto al grupo DMH por la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

Los resultados son la media de 5 experimentos independientes por triplicado \pm EE.

7.4.6 Efecto de los extractos acuosos sobre la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en el colon distal de ratas tratadas con DMH

En la figura 22 se observa el incremento significativo en la actividad de GST en el colon distal de ratas tratadas con la DMH y los extractos acuosos de *M. parviflora* y *P. oleraceae*, respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$). El extracto acuoso de *P. oleraceae* aumentó significativamente en un 28% la actividad enzimática de GST en colon distal respecto al grupo control sin DMH y en un 10% respecto al grupo DMH. Por otro lado, el extracto de *M. parviflora* no incrementó la actividad de GST respecto al grupo DMH, pero si en relación al grupo control negativo (20%), siendo este último estadísticamente significativo ($P < 0.05$). Estos resultados demuestran la capacidad de *P. oleraceae* de inducir esta enzima en el colon distal de ratas con cáncer de colon.

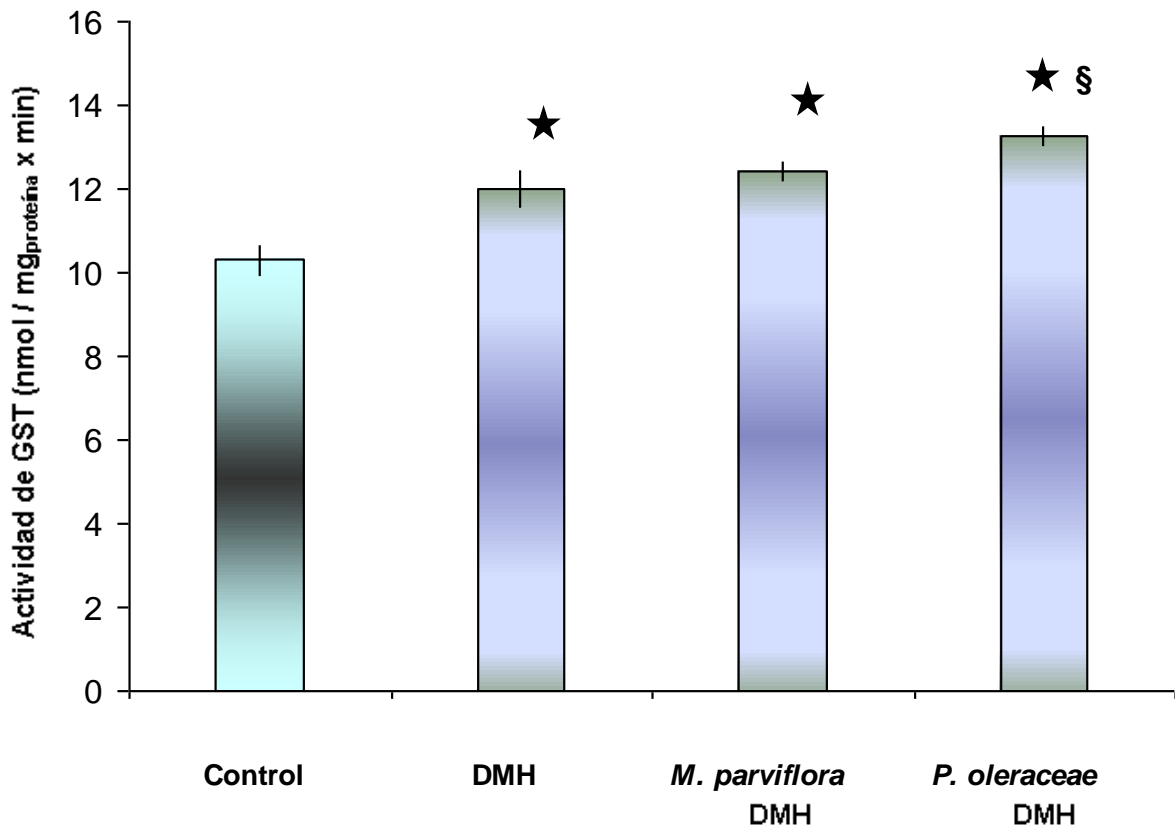


Figura 22. Actividad enzimática de GST en colon distal de ratas inducidas con 21 mg/kg de DMH y alimentadas con extractos acuosos de *M. parviflora* y *P. oleraceae* a concentraciones de 100 kg/kg.

* Estadísticamente diferente con respecto al control por la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

§ Estadísticamente diferente con respecto al grupo DMH por la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

Los resultados son la media de 5 experimentos independientes por triplicado \pm EE.

Respecto a los valores encontrados en la primera etapa experimental, se tiene una menor actividad de GST en esta segunda etapa, pero es importante resaltar que *P. oleraceae* al incrementar de manera significativa la actividad enzimática se acerca a los valores encontrados en la primera etapa, esto permite que el colon distal se mantengan los mecanismos de detoxificación que evitan el desarrollo de la carcinogénesis.

La inducción de enzimas de fase 2 o antioxidantes, especialmente la GST, por compuestos activos en plantas se ha correlacionado con la reducción del número de tumores inducidos por carcinogénesis química en roedores, debido a que crucíferas, como el brócoli, son plantas que contienen compuestos bioactivos que son capaces de inducir la actividad de GST en diversos órganos (Williamson y col., 1997) y con

ello proteger contra el desarrollo de cáncer. Ya que la estimulación de la actividad de GST a partir de la dieta tiene una importante participación en el procesos de desintoxicación es importante llevar a cabo estudios en la población para determinar la capacidad de de inducción de GST a partir de las especies vegetales estudiadas, tomando en cuenta que estos niveles pueden ser menores a los reportados en roedores.

Para fines comparativos, los datos de la concentración de GSH y la actividad enzimática de GST en hígado, colon proximal y distal de las ratas tratadas con los extractos acuosos de *M. parviflora* y *P. oleraceae* y DMH se muestran el cuadro 12.

Cuadro 12. Concentración de GSH y la actividad enzimática de GST en hígado, colon proximal y distal de ratas inducidas con y alimentadas con extractos acuosos de *M. parviflora* y *P. oleraceae*.

	GSH (nmol/mg proteína)		GST (nmol/mg proteína*min)	
	Hígado	Hígado	Colon proximal	Colon distal
Control	80.5 ± 16.9	651.1 ± 63.0	100.7 ± 9.1	10.3 ± 1.0
DMH	110.0 ± 14.6 *	1039.9 ± 108.5 *	94.8 ± 9.78	12.0 ± 1.4 *
<i>M. parviflora</i>	133.9 ± 15.5 *,§	753.6 ± 85.8	99.8 ± 13.7	12.4 ± 0.9 *
<i>P. oleraceae</i>	111.0 ± 12.4 *	1099.8 ± 119.2 *	91.6 ± 9.5	13.26 ± 0.9 *,§

* Estadísticamente diferente con respecto al control por la prueba de Dunnett (P<0.05).

§ Estadísticamente diferente con respecto al grupo DMH por la prueba de Dunnett (P<0.05).

Los resultados son la media de 5 experimentos independientes por triplicado ± EE.

Se tiene evidencia de que un aumento en el consumo de compuestos bioactivos en frutas y verduras reduce el riesgo de cáncer. La posibilidad de desarrollar alimentos que puedan reducir el riesgo de un cáncer en específico ha crecido en la industria de los alimentos funcionales. Por esto se ha propuesto evaluar la capacidad de los compuestos bioactivos sobre la reducción de riesgo de cáncer (como son los compuestos fenólicos), así como la capacidad de los alimentos ricos en compuestos bioactivos de reducir el riesgo de algún tipo de cáncer. En la quimioprotección se utilizan compuestos de la dieta o químicos que bloqueen, inhiben y retrasen el desarrollo de cáncer en tejido normal o preneoplásico,

respectivamente. La inducción de enzimas de fase 2 que biotransforman xenobióticos tales como la GST y la NQO1 se considera como el mejor mecanismo de protección contra el estrés químico y la iniciación de la carcinogénesis. Bajo condiciones fisiológicas o normales, el Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE) regula la expresión de enzimas antioxidantes citoprotectoras y de proteínas antioxidantes, las cuales contribuyen a la defensa contra el ataque de químicos ambientales y presentes en la dieta. El elemento ARE se encuentra en la región promotora de genes que expresan diversas enzimas de fase 2, entre las que se encuentran la GST y NQO1. Aunque el mecanismo de activación del elemento ARE no está completamente elucidado, se ha comprobado que el factor de transcripción Nrf2 juega un papel central en este proceso (Itoh y col., 2003). En ratones sin el gen *Nrf2* se observa una disminución de la capacidad de detoxificación y, por lo tanto, una disminución de la capacidad de respuesta a agentes quimioprotectores (Ramos-Gómez y col., 2001).

La detoxificación celular es crucial para el mantenimiento de la salud y proporciona la capacidad de defensa contra la exposición diaria a diversos xenobióticos. El factor de transcripción Nrf2 participa en el mecanismo de defensa celular contra el estrés ocasionado por los xenobióticos y éste permite entender los mecanismos básicos de diversas enfermedades crónico-degenerativas (Motohashi y col., 2004). Por lo tanto, la activación del elemento ARE a través del factor de transcripción Nrf2 por componentes de la dieta puede ayudar como estrategia terapéutica contra el tratamiento de diversas enfermedades degenerativas, estrés oxidativo y la formación de displasias, aunque el mecanismo de acción no es totalmente conocido (Liu y col., 2007).

Los resultados del presente trabajo de investigación establecen por primera vez el efecto quimioprotector de los extractos acuosos de las especies nutraceuticas *M. parviflora* y *P. oleraceae* sobre el desarrollo del cáncer de colon en un modelo animal. Así mismo, los resultados sugieren un efecto en el aumento de algunos parámetros relacionados con la prevención del cáncer al consumir estos extractos en la dieta (100 mg de extracto/kg de peso corporal equivale a 350 g de planta fresca). Además, los resultados establecen la inducción de enzimas detoxificantes y el aumento de la concentración de glutatión reducido como un mecanismo

comprobable e importante a través del cual estas plantas comestibles ejercen su efecto protector y, que por lo tanto, este efecto pudiera esperarse a nivel de la población mexicana con un consumo moderado de estas plantas.

VIII. CONCLUSIONES

- Los extractos acuosos de *M. parviflora*, *C. murale* y *P. oleraceae* inducen significativamente la concentración de glutatión reducido (GSH) y la actividad de enzimas detoxificantes (GST y NQO1) en los diferentes tejidos de la rata (hígado y colon) a concentraciones que están directamente relacionadas con un consumo normal en la dieta (100 mg/kg equivalente a 350 g de planta fresca).
- Se encontró una inducción enzimática similar a la reportada por otros autores mediante la administración de los extractos vegetales en alimento molido que mediante administración intragastrica de los extractos acuosos. Para los extractos evaluados no existe diferencia en cuanto a la capacidad para inducir enzimas de fase 2 por efecto de la vía de administración.
- Los resultados muestran una correlación entre la capacidad antioxidante de los extractos y la concentración de glutatión reducido y la inducción de enzimas detoxificantes en hígado, lo incrementa el potencial nutracéutico de estas plantas.
- Los resultados del presente estudio confirma los efectos benéficos de la malva y la verdolaga en un modelo de cáncer de colon, al aumentar la actividad enzimática de GST y disminuir la presencia de displasias en colon.
- En base a los resultados de dosis-respuesta, la determinación de la actividad enzimática de NQO1 en colon distal se puede considerar un marcador adecuado de exposición a extractos vegetales en ratas sanas tratadas con extracto acuoso.
- Las plantas comestibles empleadas en esta investigación contienen una amplia variedad de metabolitos, algunos de los cuales son inductores de enzimas de fase 2 y de glutatión reducido, lo que contribuye a la identificación de fuentes vegetales de la región con gran potencial para la prevención y/o

tratamiento del cáncer, especialmente de cáncer colorrectal. Así mismo, los resultados del presente trabajo recomiendan el consumo de malva y verdolaga como parte de una dieta habitual para la población en general. Sin embargo, en personas con cáncer colorrectal se debe tener además un tratamiento médico adecuado.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albarrán, C.M.E. 2007. Efecto modulador de los frutos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) y zarzamora (*Rubis fruticosis*) sobre biomarcadores de estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas inducidas con estreptozotocina. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. UAQ. Querétaro, México.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Roff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 2004. Biología Molecular de la Célula. 3ª ed., Omega S. A, México: 1345-1347, 1378, 1382.

Awadh, A., Jülich, W., Kusnick, C., Lindequist, U. 2001. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. J Ethnopharmacol. 74: 173-179.

Bajpai, M., Mishra, A., Prakash, D. 2005. Antioxidant and free radical scavenging activities of some Leary vegetables. J Food Sci Nutr. 56: 473-481.

Begleiter, A., Leith, M.K., Doherty, G.P. 1997. Induction of DT-diaphorase in cancer chemoprevention and chemotherapy. Oncol Res. 9: 371-382.

Begleiter, A., Sivananthan, K., Curphey, T.J., Bird, R.P. 2003. Induction of NAD(P)H quinone: oxidoreductase 1 inhibits carcinogen-induced aberrant crypt focy in colons of Sprague-Dawley rats. Cancer Epidemiol Prev. 12: 566-572.

Belitz, T., Grosch, J. 1988. Química de los alimentos. Ed. Acribia. España, Zaragoza: 25-49.

Boone, C.W., Kelloff G.J., Malone W.E. 1990. Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. Cancer Res. 50: 2-9.

Camuesco, D., Comalada, M., Rodríguez-Cabezas, M., Nieto, A., DeLorente, M., Concha, A., Zarzuelo, A., Gálvez, J. 2004. The intestinal anti-inflammatory effect of

quercetin is associated with an inhibition in iNOS expression. Br J Pharmacol. 143: 908-918.

Casarett, J.L., Klaassen D.C., Doull J. 2001. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 4a edition. McGraw-Hill Professional. México. 201-205, 241-270.

Chan, K. and Kan, Y. 1999. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 96: 12731-12736.

Chan, K., Islam, M., Kamil, M., Radhakrishnan, R., Zalaria, M., Habibullah, M., Attas, A. 2000. The analgesic and antiinflammatory effects of *Portulaca oleraceae* L. subsp sativa. J Ethnopharmacol. 3: 445-471.

Chen, Y.Y., Chen, C.M., Chao, P.Y., Chang, T.J., Lui J.F. 2005. Effects of frying oil and *Houttuynia cordata* thumb on xenobiotic-metabolizing enzyme system of rodents. J Gastroenterol. 11: 389-392.

Clapper, M.L., Szarka, C.E., Pfeiffer, G.R., Gram, T.A., Balshem, A.M., Litwin, S., Goosenberg, E.B., Frucht, H., Ångstrom, P.F. 1997. Preclinical and clinical evaluation of broccoli supplements as inducers of glutathione-S-transferase activity. Cancer Res. 3: 25-30.

Colussi, C., Fiumicino, S., Giuliani, A., Rosini, S., Musiani, P., Macro, C., Potten, C., Crescenzi, M., Bignami, M. 2001. 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinoma and lymphoma in *msh2*^{-/-} mice. J Natl Cancer Inst. 93: 1534-1540.

D'Alessandro, T., Prasain, J., Benton, M.R., Botting, N., Moore, R., Darley-USmar, V., Patel, R., Barnes S. 2003. Polyphenols, Inflammatory Response, and Cancer Prevention: Chlorination of Isoflavones by Human Neutrophils. J. Nutr. 133:3773S-3777S.

Demark-Wahnefried, W., Rock, C.L., Patrick, K., Byers, T. 2008. Lifestyle interventions to reduce cancer risk and improve outcomes. *Am Fam Physician*. 77: 1573-1578.

DeVita, V.T., Hellman, S.J., Rosenberg, S.A. 2004. Cáncer, principios y prácticas de oncología. Séptima edición. Arán Ediciones, EUA. 579-587, 1144-1148.

Donna, I.F. 1986. Flora de Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. 51: 19-22.

Doll, R. and Peto, R. 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*. 66: 1191-308.

Ellman, G. 1959. Determination of glutathione. *Arch Biochem Biophys*. 82: 70-79.

El-Sayed, N.H., Awaadb, A.S., Hifnawyb, M.S., Mabryc, T.J. 1999. A flavonol triglycoside from *Chenopodium murale*. *Phytochemistry*. 51: 4 591-593.

Emerole, G., Neskovic, N., Dixon, R. 1979. The detoxification of aflatoxin B1, with glutathione in the rat. *Xenobiotica*. 9: 737-743.

Estrada del Cueto, M., G.M. Matos, Gutiérrez, A.C., Pérez-Diez, G. 1999. Enzimas de la biosíntesis del glutatión reducido (GSH). Valores normales y estudio de un paciente con deficiencia de GSH. *Hematol Inmunol Hemoter*. 15:35-41.

Finley, W.R. 2005. Proposed criteria for assessing the efficacy of cancer reduction by plant foods enriched in carotenoides, glucosinolates, polyphenols and selenocompounds. *Annals Bot*. 95: 1075-1096.

Frixell, P.A. 1993. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología. 16: 79-82.

Gohar, A.A. and Elmanzar, M.M. 1997. Isolation of hypotensive flavonoids from *Chenopodium* species growing in Egypt. *Phytotherapy Res.* 11: 564-567.

Gohar, A., Maatooq, T., Niwa, M. 2000. Two flavonoid glycosides from *Chenopodium murale*. *Phytochemistry.* 53: 299-303.

González, P. 2007. Evaluación de la actividad antioxidante total de extractos acuosos de especies vegetales comestibles en el Estado de Querétaro. Tesis para obtener el título de Licenciado Químico Farmacéutico Biólogo. UAQ. Querétaro, México.

Gutiérrez, G. 2006. Evaluación de la actividad quimioprotectora de extractos acuosos y matanólicos de plantas medicinales y comestibles en el Estado de Querétaro como inductores de enzimas de fase 2. Tesis para obtener el título de Licenciado Químico Farmacéutico Biólogo. UAQ. Querétaro, México.

Habig, W.H., Pabst M.J., Jakoby W. B. 1974. Glutathione-S-Transferases, The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 42: 7130-7139.

Ho, C.T. and Zheng, Q.Y. 2001. Quality management of nutraceuticals. American Chemical Society. 1ª Edit. Oxford University Press. EUA. 2-9.

INEGI, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2006. Anuario Estadístico. www.inegi.gob.mx

Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y. Bannai, S., Yamamoto, M. 2000. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem.* 26: 16023-16029.

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii T. O'conor, T. Yamamoto, M. 2003. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cell.* 8: 379-391.

Itzkowitz, S., and Yio, X. 2004. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 287: 7-17.

Jacoby, R.F., Llor, X., Teng, B., Davidson, N.O., Brasitus, T.A. 1991. Mutations in the *k-ras* oncogene induced by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. *Am Soc Clin Inv.* 87: 624-630.

Jackson, P.E., O'Connor, P.J., Cooper, D.P., Margison, G.P., Povey, A.C. 2003. Associations between tissue-specific DNA alkylation, DNA repair and cell proliferation in the colon and colon tumour yield in mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis.* 24: 527-533.

Jiménez-Arellanes, A., Meckes, M., Ramirez, R., Torres, J., Luna-Herrera, J. 2003. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytotherapy Res.* 17: 903-938.

Kazerouni, N., Sinha, R., Hsu, C.H., Greenberg, A. 2001. Rothman N. Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem Toxicol.* 39: 423-436.

Kwak, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Kensler, T.W. 2002. Enhanced chemopreventive agents: role of antioxidant response element like sequences in the *nrf2* promoter. *Mol Cel Biol.* 22: 2883-2892.

Larsen, C., Erlich, M., Discoll, C., Gross, W.B. 1985. Aflatoxin-antioxidant effects on growth of young chicks. *J Poultry Sci.* 64: 2287-2291.

Liu, L., Howe, P., Zhou, Y., Xu, Z., Hocart, C. Zhang, R. 2000. Fatty acids and β -caroteno in Australian purslane (*Portulaca oleraceae*) varieties. *J Chromatogr.* 893: 207-213.

Liu, M., Weber, C. Lee, C. Liu, R. Brown, J., Liu R.H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J Agric Food Chem.* 50: 2926-2930.

Liu, Y., Kern, J.T., Walter, J.R., Jonson, J.A., Schultz, P.G., Luesch, H. 2007. A genomic screen for activators of the antioxidant response element. *Natl Acad Sci.* 104: 5205–5210.

Lodish, B., Berk, A., Zupurskt, S.L., Matsudaira, P., Bartimore, D., Darnell, J. 2003. *Biología celular y molecular.* 4a. Edition. Harvey Editorial Medica Panamericana. EUA. 1054-1081.

Madhavi, D.L., Desphande, S.S., Salunkhe, D.K. 1996. *Technological, Toxicological and Health perspectives.* 1^a. Edition. Edit. Marcel Deker, inc. EUA. 73-105.

Mark, S.M., Wayne, R.B., Keith, R.R. 2006. *Phytochemicals nutrient-gene interactions.* First edition. Taylor & Francis Group, EUA. 12-25.

Meyer, P. 1989 Thiaminase activities and thiamine content of *Pteridium aquilinum*, *Equisetum ramosissimum*, *Malva parviflora*, *Pennisetum clandestinum* and *Medicago sativa*. *Onderstepoort J Vet Res.*56: 145-6.

Miranda, C.N. 2005. Estudio químico y evaluación del potencial quimioprotector de plantas comestibles en zonas rurales queretanas. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. UAQ. Querétaro, México.

Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., Kan, Y.W. 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci.* 91: 9926-9930.

Motohashi, H. and Yamamoto, M. 2004. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Medicine.* 11: 549-557.

Nagaswa, H.T., Frances, N.S., Hiromu, M. 1972. Decomposition of methyl azoxymethanol, the aglycone of cycasin, in D₂O. *Nature.* 236: 234-235.

Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R. **2001**. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *J Pharmacol.* 33: 2-16.

Nurmi, K., Ossipov, V., Huakioja, E., Pihlaja, K. **1996**. Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Berula pubescens* ssp. *tortuosa*). *J Chem Ecology.* 22: 2023-2040.

O'Neill, I.K., Loktionoa, A., Manson, M.M., Ball, H., Bandaletova, T., Bingham, S.A. **1997**. Comparison of metabolic effects of vegetables and teas with colorectal proliferation and with tumour development in DMH-treated F344 rats. *Cancer.* 114: 287-291.

Okwuasaba, F., Parry, O., Ejike, O. **1986**. Skeletal muscle relaxant properties of the aqueous extract of *Portulaca oleraceae*. *J Ethnopharmacol.* 17: 139-160.

Organización Mundial de la Salud. **2005**. El impacto del cáncer. <http://www.who.int/es/>

Palaniswamy, V.R., Avoy, R.J., Bible, B.B. **2001**. Stage of harvest and polyunsaturated essential fatty acid concentrations in purslane (*Portulaca oleraceae*) leaves. *J Agric Food Chem.* 49: 3490-3493.

Piña-Zentella, R. **2007**. Efecto quimioprotector de los extractos de verdolaga (*Portulaca oleraceae* L.) sobre un modelo de inflamación-cáncer de colon inducido químicamente en ratas F344. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. UAQ. Querétaro, México.

Piñols-Felis, C. **1998**. Estudios de los cambios en la mucosa colónica de rata y cinética durante la carcinogénesis experimental inducida con 1,2-dimetilhidracina. Barcelona. Universidad de Lleida. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias, 15-20.

Prestera, T.W., Holtzclaw D., Zhang, Y., Talalay, P. **1993**. Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. Proc Natl Acad Sci. USA. 90: 2965-2969.

Prochaska, J., Talalay, P., Long, M.J. **1988**. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci. USA. 85: 8261-8265.

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

Radhakrishnan, R., Zakaria, M.N.M., Islam, M.W., Chen, H.B., Kamil, M., Chan, K., Al-Attas, A. **2001**. Neuropharmacological actions of *Portulaca oleraceae* L v. sativa (Hawk). J Ethnopharmacol. 76: 171-176.

Rajeshkumar, N.V., Kuttan, R. **2003**. Modulation of carcinogenic response and antioxidant enzymes of rats administered with 1,2-dimethylhydrazine by Picroliv. Cancer. 191:137-143.

Ramos-Gómez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., Kensler, T.W. **2001**. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in *nrf2* transcription factor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci. USA. 98: 3410-3415.

Rashed, A.N., Afifi, F.U., Disi, A.M. **2003**. Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Portulaca oleraceae* L. (growing in Jordan) in *Mus musculus* JVI-1. J Ethnopharmacol. 88: 131-136.

Reddy, L., Odhav, B.K., Bhoola D. **2003**. Natural products for cancer prevention: a global perspective. Pharmacol Therap. 99: 1-13.

Rushmore, T.H. and Pickett C. B. **1991**. The Antioxidant Responsive Element. J Biol Chem. 266: 11632-11639.

Rzedowski, J. 1979. Flora fanerogámica del Valle de México. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. 1: 142-143.

Shale, T.L., Stirk, W.A., Staden, J. 2005. Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of *Malva parviflora* and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds. J Ethnopharmacol. 96: 325-330.

Soong, Y.Y., Barlow, J.P. 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit. Food Chem. 88: 411-417.

Suárez, R.G., Serrano, V., Balderas, P., Pelz, R. 2004. Atlas de las malezas arvenses del Estado de Querétaro. 1ª Edición. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro. México.

Subías-Juárez, D.E. 2006. Evaluación *in vitro* del potencial quimioprotector de extractos metanólicos y acuosos de plantas comestibles del estado de Querétaro. Tesis para obtener el título de Licenciado en Químico en Alimentos. UAQ. Querétaro, México.

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

Talalay, P., De Long, M.J., Prochaska, H.J. 1988. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. Med Sciences. 85: 8261-8265.

Talalay, P. 2000. Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. Mini-review. Biofactors. 12: 5-11.

Wang, X. 2001. Plant phospholipases. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 52: 211-231.

Wang, J., Wang, D., Lv, B. Si, J. 2004. A novel mouse model for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium. *World J Gastroenterol.* 10: 2958-2962.

Williamson, G., DuPont M.S., Wanigatunga S., Heaney R.K., Musk S.R.R., G.R. Fenwick, Rhodes M.J.C. 1997. Induction of glutathione-S-transferase activity in hepG2 cells by extracts from fruits and vegetables. *Food Chem.* 60: 157-160.

Xiang, L., Xing, D., Wang, W., Wang, R., Ding, Y., Du L. 2005. Alkaloids from *Portulaca oleraceae* L. *Phytochemistry.* 66: 2595-2601.

Zhang, X., Ji, Y., Qu, Z., Xia, J., Wang, L. 2002. Experimental studiesn antibiotic functions of *Portulaca oleraceae* L. *in Vitro.* *Chinese J Microecol.* 5: 277-280.

X. Anexos

9.1. Preparación de 1,2-dimetilhidracina

Se pesan 931.14 mg de DMH, posteriormente se disuelven 100 ml de agua destilada al 0.9% de solución salina NaCl con 37 mg de EDTA, ajustando el pH a 6.5 usando NaOH 0.25 M.

9.2. Reactivos para la determinación de fenoles totales

a) Folin Ciocalteu 1 N.

El reactivo comercialmente se encuentra a una concentración 2 N, por lo que se procede a diluir. Utilizando la fórmula $V_1C_1 = V_2C_2$ con 10 ml de agua destilada más 10 ml de reactivo de Folin Ciocalteu se tiene al final una concentración 1 N. El procedimiento debe realizarse en campana de extracción y el reactivo conservarse en frasco ámbar con tapón de aluminio y en refrigeración (4 °C). Verifique que el color del reactivo sea color dorado, no utilizarse si tiene un verde olivo.

b) Carbonato de sodio al 20%.

Pesar 5 g de carbonato de sodio, disolver en aproximadamente en 20 ml de agua grado HPLC y sonicar hasta dilución normal, posteriormente aforar a 25 ml.

c) Solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/ml).

Pesar 10 mg de ácido gálico y aforar en agua destilada a 10 ml (Solución A). Posteriormente Tomar 1 ml de esta solución y aforar con 10 ml de agua destilada (Solución B). Usar siempre soluciones recién preparadas.

9.3. Reactivos para la determinación de flavonoides totales

a) Nitrito de sodio al 5%.

Para la preparación de 5 ml (p/v) de este reactivo, pesar en un vial 0.25 g de NaNO_2 con 99.5% de pureza y aforar en un vial de 5 ml con agua destilada, es decir, adicionar 4.75 ml de agua.

b) Cloruro de aluminio al 10%.

Para la preparación de 5 ml (p/v) de este reactivo, pesar en un vial 0.5 g de AlCl_3 y aforar en el vial a 5 ml con agua destilada, es decir, adicionar 4.5 ml de agua.

c) Hidróxido de sodio 1 M.

Para la preparación de 25 ml de NaOH 1 M, se pesa 1 g de NaOH en escamas y se afora a 25 ml.

d) Solución estándar de Catequina.

Pesar 100 mg de catequina y aforar a 10 ml con metanol (usar siempre una solución recién preparada).

9.4. Reactivos para la preparación de extractos citosólicos

a) Solución amortiguadora Tris/sacarosa.

Para preparar un litro de esta solución amortiguadora son necesarias las siguientes cantidades de sustancias: 7.9 g de Tris-HCl, 2.1 g de MgCl_2 , 1.9 g de KCl, 85.6 g de sacarosa ultrapura. Se ajusta el pH a 7.0 y se afora en un matraz de 1 litro.

9.5. Reactivos para la determinación de capacidad antioxidante

a) Solución ABTS.

La solución ABTS se preparará poniendo a reaccionar 5 ml de una solución acuosa de ABTS 7 mM con 88 μl de persulfato de potasio 140 μM , se almacena a oscuridad por 16 horas.

b) Solución PBS.

Para preparar esta solución son necesarias las siguientes cantidades de sustancias: 4 g de NaCl, 0.1 g de KCl, 0.72 g de Na₂HPO₄ y 0.12 g de KH₂PO₄. Se ajusta a un pH de 7.4 y se afora a 500 ml.

9.6. Reactivos para la determinación de proteína

a) Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6.5 (dilución de citosoles).

Esta solución amortiguadora se utiliza para hacer las diluciones de los citosoles y para preparar las soluciones de trabajo de GSH y CDNB. Para preparar 200 ml de se requieren 1.89 g de NaH₂PO₄ y 0.896 g de Na₂HPO₄ los cuales se aforan a 200 ml con agua destilada y se ajusta el pH a 6.5.

b) Solución de trabajo para determinación de proteínas.

El kit de proteínas maneja dos reactivos el A y el B, los cuales se mezclan tomando 50 partes del reactivo A más una parte del reactivo B. Ejemplo: 50 ml del reactivo de A + 1 ml del reactivo B.

9.7. Reactivos para la determinación de glutatión reducido

a) Solución amortiguadora Tris-EDTA pH 8.2 (100 ml).

Pesar 0.744 g de EDTA y 3.152 g de Tris, diluir ambas cantidades en agua destilada, ajustar a pH a 8.2 y aforar a 100 ml.

b) Solución de trabajo de GSH 0.6 mM (para curva estándar).

Pesar 1.843 mg de GSH y aforar a 10 ml con el buffer Tris-EDTA pH 8.2. El peso molecular del GSH es de 307.33 g/mol.

c) Stock de 5.5'-ditiol-2-ácido nitrobenzoico (DTNB).

Pesar 24.3 mg y aforar a 25 ml con metanol para obtener una concentración 2.46 mM.

d) Ácido tricloroacético (ATC) al 20% (para precipitar proteína de las muestras).

Para obtener ATC al 20% se agregar 1.1 g de ATC en 5 ml de agua destilada.

9.8. Reactivos para la determinación de glutatión-S-transferasa

a) Solución de trabajo de glutatión (GSH) 150 mM.

Se pesan 46.1 mg de glutatión reducido y se adiciona 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.1 M. El peso molecular del GSH es de 307.33 g/mol.

b) Solución de trabajo de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 50 mM.

Se pesan 12.2 mg de CDNB y se adiciona 1 ml de etanol al 100%. El peso molecular del CDNB es de 203.33 g/mol.

c) Solución de trabajo GSH 3 mM.

Para una microplaca de 96 pozos, se añaden 240 μ l de solución de trabajo de GSH 150 mM a 11.76 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M.

d) Solución de trabajo CDNB 2 mM.

Para una microplaca de 96 pozos, se añaden 567 μ l de solución de CDNB 60 mM a 16.43 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M.

9.9. Reactivos para la determinación de quinona reductasa

Para preparar un volumen total de 12 ml se adicionan las siguientes cantidades de cofactores:

a) 8 μ l de una solución 7.5 mM de FAD (6.2 mg/ml).

b) 80 μ l de una solución 150 mM de glucosa-6-fosfato (42.3 mg/ml).

c) 7.2 μ l de una solución 50 mM de NADP (38.3 mg/ml).

d) 24 UI de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de levadura.

e) 8 mg de albúmina bovina (BSA).

f) 3.6 mg de MTT.

g) 80 μ l de una solución de Tween 20 al 1.5%.

h) 600 μ l de una solución 0.5 M de Tris-HCl a pH 7.4.

i) 1.0 ml menadiona 50 mM en acetonitrilo (8.6 mg/ml).

Aforar a 12 ml con agua destilada y mezclar perfectamente en Vortex[®]. Adicionar 12 μ l de la solución de menadiona justo antes de transferir la mezcla de la reacción a la microplaca. Finalmente, mezclar perfectamente.

9.10. Solución bloqueadora para quinona reductasa

- a) Se prepara una solución de dicumarol a una concentración de 20 mg/ml.
- b) Se toman 20 μ l de la solución anterior.
- c) Se afora a 4 ml con una solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4.