



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

“Efecto protector de los extractos de verdolaga (*Portulaca oleraceae* L.) sobre un modelo de inflamación-cáncer de colon inducido químicamente en ratas F344”

T E S I S

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

Presenta:

L. en N. Rosa María Piña Zentella

Dirigida por:

Dra. Minerva Ramos Gómez

SINODALES

Dra. Minerva Ramos Gómez
Presidente



Firma

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Secretario



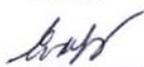
Firma

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz
Vocal



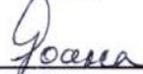
Firma

Dra. Eva González Jasso
Suplente

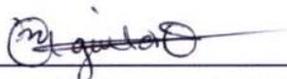


Firma

Dra. Ma. Guadalupe F. Loarca Piña
Suplente



Firma



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



Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Querétaro
Junio 2007
México

A mis padres Martha y Enrique,
con admiración por su ejemplo
como personas y como profesionistas.
Mi mayor agradecimiento por su amor,
apoyo, educación y por la vida misma.

AGRADECIMENTOS

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

A mi directora de tesis, Dra. Minerva Ramos Gómez, por compartir sus conocimientos, tiempo y entusiasmo para llevar a cabo este proyecto.

A los miembros del Comité Revisor: Dra. Rosalía Reynoso Camacho, Dra. Sandra O. Mendoza Díaz, Dra. Eva González Jasso y Dra. Ma. Guadalupe F. Loarca Piña, gracias por sus valiosos y oportunos comentarios.

A los maestros del Posgrado en Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro por todas sus enseñanzas y por su ejemplo de profesionalismo.

A Marigel, Carmelita, Laura y Silvia, por sus muestras de ánimo y su dedicación para el óptimo funcionamiento del Posgrado en Alimentos.

A todos mis compañeros de la Maestría, de manera muy especial a Adri, Maru, Aymara, Chely y Anita.

A Francisco, Mariana, Martha, Andrea por su cariño, ayuda y comprensión.

A mis hermanos, Marta, Antonio y Guadalupe por sus muestras de apoyo incondicional.

A mis amigos Amalia, Juan Antonio, Gabriela, Marcela, Lorena y Jaime por tantos momentos agradables.

RESUMEN

La inflamación crónica tiene un papel determinante en el cáncer colorrectal. La verdolaga (*Portulaca oleraceae*) es un vegetal comestible con efectos farmacológicos incluyendo capacidad analgésica y anti-inflamatoria; también posee un alto contenido de fenoles y flavonoides, y su extracto metanólico posee una alta capacidad antioxidante. La inducción de enzimas de fase 2 y antioxidantes es un mecanismo efectivo por algunos fenoles y flavonoides para proteger contra carcinógenos, por lo tanto, resulta atractivo evaluar el efecto quimioprotector de la verdolaga en un modelo de inflamación-cáncer de colon inducido químicamente en ratas F344. Ratas macho fueron inducidas con 3 inyecciones subcutáneas de dimetilhidrazina (DMH, 40mg/Kg) durante una semana y, posteriormente, se les administró el dextrán sulfato de sodio (DSS, 1%) en el agua de beber como agente promotor de la inflamación de colon. Para caracterizar el modelo, los animales se sacrificaron a diferentes tiempos, observándose un efecto después de 10 semanas de tratamiento. Para seleccionar la dosis y el extracto, ratas F344 recibieron intragástricamente el extracto acuoso (EA) o metanólico (EM) de verdolaga (50, 100 y 200mg/Kg) 3 veces por semana. 24 horas después, los animales se sacrificaron y se les extrajo colon e hígado para evaluar la actividad de glutatión-S-transferasa (GST) y quinona reductasa (QR), observándose un mayor efecto inductor de estas enzimas con EA (100mg/Kg). En el modelo de inflamación-cáncer de colon, el EA (100mg/Kg) se administró intragástricamente durante 10 semanas. A pesar de que la actividad de GST en hígado y colon decreció después de 10 semanas de tratamiento con EA, la actividad hepática de QR se indujo significativamente en todos los grupos tratados; asimismo, la actividad de QR en colon se elevó con el EA (1.2-veces) en el grupo EA/DMH/DSS. En la evaluación de fosas crípticas aberrantes, el grupo EA presentó 0% de incidencia; mientras que en el grupo EA/DMH/DSS disminuyó 7.3%, con respecto al control positivo (DMH/DSS). Similarmente, los grupos tratados con EA presentaron el menor grado de inflamación, confirmando la actividad anti-inflamatoria de la verdolaga. Estos resultados indican que el extracto de verdolaga (EA, 100mg/Kg) protege contra el desarrollo de cáncer de colon asociado a inflamación en ratas.

Palabras clave: Verdolaga (*Portulaca oleraceae*), cáncer de colon, inflamación, enzimas de fase 2, fosas crípticas aberrantes.

SUMMARY

Inflammation plays an important role in colorectal cancer. Purslane (*Portulaca oleraceae*) is an edible vegetable, with some pharmacological effects including analgesic and anti-inflammatory, and high levels of phenols and flavonoides; furthermore, its methanolic extracts exhibit high antioxidant capacity. The induction of phase 2 and antioxidant enzymes is an effective mechanism of some phenols and flavonoides to protect against carcinogens. Therefore, it is highly attractive to evaluate the chemoprotective effect of purslane on an inflammation-colon cancer model in male F344 rats. Rats received 3 s.c. injections of dimethylhydrazine (DMH, 40mg/Kg) during one week, followed by administration of dextran sodium sulfate (DSS, 1%) in drinking water to induce colon inflammation. To characterize the colon carcinogenesis-inflammation model, rats were sacrificed at different times, showing histological changes at 10 weeks of treatment. To select the dose and the extract, rats received an aqueous (AE) or methanolic (ME) extract of purslane (50, 100 and 200mg/kg, by gavage) 3 times a week. 24 hours after the last oral intubation, animals were euthanized; the liver and the colon were removed for measurement of glutathione-S-transferase (GST) and quinone reductase (QR) activities, showing the highest enzyme induction with AE (100mg/kg). In the inflammation-cancer model, AE (100mg/kg) was orally administered in rats treated with DMH/DSS for 10 weeks. Although GST activity decreased in the liver and colon after 10 weeks of AE administration, hepatic QR activity was significantly induced in all treated groups, compared to control group. In colon, QR activity was also induced with AE (1.2-fold) in DMH/DSS group. Aberrant crypt foci were also evaluated, showing a 0% incidence in the AE group, while decreasing by 7.3% in the AE/DMH/DSS group compared to positive control (DMH/DSS). Similarly, groups treated with AE presented the lowest inflammation grade compared with the control group, assuring/supporting the anti-inflammatory effect of purslane. These results confirm the chemoprotective effect of purslane extracts (AE, 100mg/Kg) in an inflammation-colon cancer model in rats.

Key words: Purslane (*Portulaca oleraceae*), colon cancer, inflammation, phase 2 enzymes, aberrant crypt foci.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1 CÁNCER	4
2.1.1 Definición	4
2.1.2 Proceso de carcinogénesis	4
2.1.3 Características de células cancerosas	5
2.1.4 Incidencia de cáncer de colon	6
2.1.5 Factores relacionados con el cáncer de colon	7
2.1.6 Morfología y función del colon	8
2.1.7 Relación entre inflamación crónica del colon y el cáncer de colon	9
2.1.8 Modelos de los eventos genéticos y morfológicos en el cáncer de colon humano esporádico y cáncer de colon asociado a colitis	10
2.1.9 Fosas crípticas aberrante (FCA) utilizadas como marcadores de lesión precancerosa	14
2.2. MODELOS ANIMALES PARA EL CÁNCER DE COLON	17
2.2.1 Clasificación de carcinógenos colónicos	17
2.2.2 Metabolismo de activación e inactivación de la dimetilhidrazina (DMH)	17
2.2.3 Efecto promotor/inflamatorio del dextrán sulfato de sodio (DSS) en el cáncer inducido químicamente	19
2.2.4 Alteraciones genéticas en el modelo DMH ó DMH/DSS en animales de experimentación	20
2.3 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN: Nrf2	21
2.3.1 Función de Nrf2 en la regulación de las enzimas de fase 2	21
2.3.2 Mecanismos de activación y regulación del complejo Keap1/Nrf2	22

2.4 FITOQUÍMICOS PRESENTES EN EXTRACTOS VEGETALES	24
2.4.1 Efecto quimioprotector de los extractos vegetales	24
2.4.2 Mecanismos de protección de agentes quimioprotectores	26
2.4.3 Inducción de enzimas de fase 2 y antioxidantes como estrategia general de contra enfermedades crónico-degenerativas	27
2.4.4 Principales plantas comestibles del estado de Querétaro y su caracterización	30
2.4.5 Características de la verdolaga (<i>Portulaca oleraceae</i> L.)	32
III. JUSTIFICACIÓN	34
IV. HIPÓTESIS	35
V. OBJETIVOS	36
5.1 Objetivo General	36
5.2 Objetivo Específicos	36
VI. METODOLOGÍA	37
6.1. Material	37
6.1.1 Compuestos químicos	37
6.1.2. Material biológico	38
6.2 Métodos	38
6.2.1 Preparación de los extractos acuosos y metanólicos	38
6.2.2 Determinación de fenoles totales	40
6.2.3 Determinación de flavonoides totales	40
6.2.4 Tratamientos <i>in vivo</i>	41
6.2.4.1 Experimento uno: elección de dosis y tipo de extracto de verdolaga	41
6.2.4.2 Experimento dos: inducción de cáncer de colon con DMH y DSS	43
6.2.4.3 Experimento tres: evaluar el efecto protector del extracto seleccionado en el modelo de cáncer de colon	44
6.2.5 Preparación de las muestras	47
6.2.5.1 Fracción citosólica	47
6.2.5.2 Fracción microsomal	47

6.2.6	Determinaciones enzimáticas	48
6.2.6.1	Determinación de la actividad de la glutatión-S-transferasa (GST)	48
6.2.6.2	Determinación de la actividad de la quinona reductasa (QR)	49
6.2.6.3	Determinación de la actividad de la hemo-oxigenasa (HO-1)	50
6.2.6.4	Cuantificación de proteínas totales	51
6.2.7	Análisis histológicos	51
6.2.7.1	Evaluación de fosas crípticas aberrantes (FCA) en el colon	51
6.2.7.2	Evaluación del daño histopatológico	51
6.2.8	Análisis Estadístico	52
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	53
7.1	Contenido de fenoles y flavonoides en los extractos acuosos y metanólicos	53
7.2	Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de la verdolaga en la actividad enzimática glutatión-S-transferasa (GST) y quinona reductasa en hígado y colon distal de ratas F344	54
7.3	Ganancia de peso en ratas tratadas con DMH/DSS	60
7.4	Evaluación macroscópica del colon en ratas tratadas con DMH/DSS	61
7.5	Evaluación microscópica del colon en ratas tratadas con DMH/DSS	63
7.6	Actividad enzimática de la glutatión-S-transferasa (GST) en hígado de ratas tratadas con DMH/DSS	69
7.7	Actividad enzimática de la quinona reductasa (QR) en hígado de ratas tratadas con DMH/DSS	70
7.8	Efecto del extracto acuoso de verdolaga en la ganancia de peso en ratas tratadas con DMH/DSS	73
7.9	Efecto del extracto acuoso de verdolaga en la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en colon distal e hígado de ratas F344 tratadas con DMH/DSS	75
7.10	Efecto del extracto acuoso de verdolaga en la actividad enzimática de quinona reductasa (QR) en colon distal e hígado de ratas F344 tratadas con DMH/DSS	77
7.11	Efecto del extracto acuoso de verdolaga en la actividad enzimática de hemo-oxigenasa (HO-1) en hígado de ratas F344 tratadas	

con DMH/DSS	78
7.12 Efecto del extracto acuoso de verdolaga en la evaluación de fosas crípticas aberrantes (FCA) en el colon de ratas F344 tratadas con DMH/DSS	80
7.13 Efecto del extracto acuoso de verdolaga en la evaluación microscópica del colon de ratas F344 tratadas con DMH/DSS	81
VIII. CONCLUSIONES	86
IX. BIBLIOGRAFÍA	87
X. ANEXOS	102
9.1 Obtención de la fracción citosólica	102
9.2 Obtención de la fracción microsomal	102
9.3 Determinación de glutatión S-transferasa	103
9.4 Determinación de quinona reductasa	104
9.5 Determinación de hemo-oxigenasa 1	105

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Prevalencia de mutaciones genéticas en el cáncer colon	13
2. Clasificación de displasia en biopsias de colon inflamado	16
3. Mecanismos potenciales de compuestos quimioprotectores	26
4. Contenido de fenoles y flavonoides totales de los extractos metanólicos de plantas comestibles obtenidos mediante el Soxhlet	31
5. Contenido de fenoles y flavonoides totales en extracto acuoso y metanólico de verdolaga cultivada	53
6. Actividad de la enzima glutatión-S-transferasa (GST) en colon distal e hígado de ratas tratadas con extractos acuoso (EA) y metanólico (EM) de verdolaga (50, 100 y 200 mg/kg)	57
7. Actividad de la enzima quinona reductasa (QR) en colon distal e hígado de ratas tratadas con extractos acuoso (EA) y metanólico (EM) de verdolaga (50, 100 y 200 mg/kg)	60
8. Incidencia y grado de inflamación del colon de las ratas a las 5, 10 y 15 semanas de tratamiento DMH (40 mg/kg) y DSS (1%)	63
9. Incidencia de displasia en el colon de las ratas a las 5, 10 y 15 semanas de tratamiento DMH (40 mg/kg) y DSS (1%)	67
10. Actividad de las enzimas glutatión-S-transferasa y quinona reductasa en hígado de ratas tratadas con DMH/DSS a las 5, 10 y 15 semanas de tratamiento	72
11. Efecto del extracto acuoso de la verdolaga en la actividad de la enzimática de glutatión-S-transferasa en hígado y colon distal de ratas tratadas con DMH/DSS	76
12. Efecto del extracto acuoso de la verdolaga en la actividad de la enzimática de quinona reductasa en colon distal e hígado de ratas tratadas con DMH/DSS	78
13. Efecto del extracto acuoso de la verdolaga en la actividad de la enzima hemo-oxigenasa en hígado de ratas F344 tratadas con	

DMH/DSS	80
14. Efecto del extracto de verdolaga en el peso, % de ratas con FCA y no. total de FCA en colon distal de ratas F344 tratadas con DMH/DSS	81
15. Incidencia y grado de inflamación del colon distal de las ratas con verdolaga, DMH/DSS y DMH/DSS/verdolaga	82
16. Incidencia de displasia en el colon distal de las ratas con verdolaga, DMH/DSS y DMH/DSS/verdolaga	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Etapas múltiples en el proceso de carcinogénesis	5
2.	Distribución porcentual de defunciones por tumores malignos	6
3.	Secuencia de los genes mutados en el cáncer de colon esporádico y asociado con colitis	11
4.	Histología de varios grados de colitis	12
5.	Imágenes que muestran la presencia de criptas aberrantes	15
6.	Cripta del colon que presenta displasia	15
7.	Metabolismo de activación y conjugación de la DMH en el hígado y el intestino	18
8.	Estructura química del dextrán sulfato de sodio	19
9.	Mecanismos de acción de un agente inductor sobre el complejo Keap1/Nrf2	23
10.	Regulación del complejo Keap1/Nrf2	24
11.	Mecanismos de quimioprotección de enzimas de fase 2 y antioxidantes	28
12.	Portulacaceae, <i>Portulaca oleraceae</i> L., “Verdolaga”	32
13.	Diagrama de la elaboración de los extractos a partir de verdolaga	39
14.	Diagrama de los grupos experimentales en el experimento uno	42
15.	Diagrama de los grupos experimentales en el experimento dos	43
16.	Diagrama de los grupos experimentales en el experimento tres	45
17.	Actividad de la enzima GST en colon distal e hígado	55
18.	Actividad de la enzima QR en colon distal e hígado	58
19.	Ganancia de peso de las ratas tratadas con DMH/DSS vs. el grupo control	61

20. Efecto del tratamiento con DMH/DSS en el número de nódulos linfoides en el colon de ratas F344	62
21. Cortes de colon distal de rata control tinción con HIE	64
22. Cortes de colon distal de rata control tinción con HIE	64
23. Cortes de colon distal de 4 ratas con tratamiento DMH (40 mg/Kg) y DSS (1 %) a las 10 semanas tinción con HIE	66
24. Corte de colon de ratas con tratamiento DMH (40 mg/kg) y DSS (1 %), tinción con HIE	66
25. Corte de colon de rata control de 10 semanas tinción con HIE	67
26. Corte de colon de rata con tratamiento DMH (40 mg/kg) y DSS (1 %) a las 5 semanas, tinción con HIE	68
27. Corte de colon de rata con tratamiento DMH (40 mg/kg) y DSS (1 %) a las 10 semanas, tinción con HIE	68
28. Corte de colon de ratas con tratamiento DMH (40mg/kg) y DSS (1 %) a las 15 semanas, tinción con HIE	69
29. Actividad de la enzima GST en hígado de ratas tratadas con DMH/DSS	70
30. Actividad de la enzima QR en hígado de ratas tratadas con DMH/DSS	71
31. Ganancia de peso durante las 10 semanas experimentales	75
32. Actividad de GST en colon distal e hígado de ratas F344 DMH (40 mg/kg), DSS (1% en el agua de beber), verdolaga (100 mg/kg p.c., vía intragástrica)	76
33. Actividad de QR en colon distal e hígado de ratas F344 DMH (40 mg/kg), DSS (1% en el agua de beber), verdolaga (100 mg/kg p.c., vía intragástrica)	77
34. Actividad de HO-1 en hígado de ratas F344, DMH (40 mg/kg), DSS (1% en el agua de beber), verdolaga (100 mg/kg p.c., vía intragástrica)	79
35. Posibles mecanismos de protección de la verdolaga en el modelo de inflamación-cáncer de colon inducido con DMH y DSS en ratas F344	84

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial. Dentro de esta patología podemos citar específicamente al cáncer de colon, debido a que en los últimos años ha mostrado una alta incidencia en países desarrollados como Japón, Francia, Canadá y Estados Unidos, ocupando en este último país el segundo lugar como causa de muerte dentro de los diferentes tipos de cáncer. En nuestro país la incidencia de este tipo de cáncer se ha incrementado en años recientes, ocupando actualmente el octavo lugar como causa de muerte por esta patología, y en el estado de Querétaro el noveno lugar (Jemal y col., 2002; INEGI, 2004).

Este padecimiento se relaciona con algunos factores como son la dieta, el estilo de vida, la predisposición genética y algunas patologías; dentro de estas enfermedades cabe destacar las infecciones crónicas, la enfermedad de Crohn, el estreñimiento y la inflamación. Diversos estudios epidemiológicos sugieren que la inflamación crónica de la mucosa intestinal causada por patologías como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn, eleva considerablemente el riesgo a desarrollar cáncer colorrectal (Tremblay y col., 1995; Kazerouni y col., 2001; Tanaka y col., 2005).

Los mecanismos moleculares y morfológicos del cáncer de colon asociado a inflamación son únicos y relevantes. Dentro de esta serie de eventos ordenados existen varias proteínas involucradas en el desarrollo del cáncer que pueden utilizarse como biomarcadores moleculares y con ello detectar el cáncer en etapas tempranas. De esta manera es posible dar un tratamiento oportuno a los pacientes, pudiendo con ello mejorar su calidad de vida (Itzkowitz e Yio, 2004).

Los modelos en animales experimentales proporcionan información y simulan lo que puede estar ocurriendo en condiciones normales en la mucosa del colon de individuos. Es por esto que para el desarrollo de este trabajo, se propuso trabajar con un modelo de reciente implementación, en ratas F-344 utilizando dimetilhidrazina (DMH) y dextrán sulfato de sodio (DSS). En este

modelo se utilizaron tres dosis de DMH como dosis de iniciación, ocasionando una mutación en el ADN de los estromas de la mucosa intestinal seguido de un tratamiento durante una semana de dextrán sulfato de sodio (DSS) al 1%, ocasionando con este compuesto un proceso inflamatorio (Tanaka y col., 2003).

Existen diversos mecanismos ampliamente conocidos utilizados para la prevención del cáncer, tales como: la inducción de la apoptosis, la inhibición de enzimas de fase 1, favorecer la actividad antioxidante y la inducción de enzimas de fase 2 de desintoxicación. Estas enzimas juegan un papel determinante en la conjugación, detoxificación y eliminación de los carcinógenos del organismo, por lo que elevar sus concentraciones resulta ser un mecanismo de protección eficiente contra carcinógenos que pueden estar presentes en la dieta o en el ambiente. Dado que en este modelo de cáncer, la inflamación es determinante para el desarrollo de tumores malignos, se propone como otro posible mecanismo de protección la inducción de enzimas antioxidantes, como la hemo-oxigenasa, ya que estas enzimas pueden contrarrestar el daño causado por el estrés oxidativo derivado de la inflamación.

De manera tradicional en nuestro país se utilizan diferentes plantas comestibles debido a su efecto benéfico para la salud. En la actualidad sabemos que dicho efecto se debe a diversos compuestos identificados en las plantas, como por ejemplo el licopeno, el sulfurofano, así también como los fenoles y flavonoides. Algunos de estos compuestos ya se ha demostrado que ayudan a prevenir el desarrollo de ciertos tipos de cáncer en etapas iniciales, debido principalmente a su capacidad de inducción de enzimas detoxificantes de fase 2 (Surh, 2003).

En el estado de Querétaro se consumen, como parte de la dieta, plantas propias de la región, entre las que se encuentran la verdolaga (*Portulacaceae oleraceae*). Estudios previos muestran que la verdolaga posee un alto contenido de fenoles y flavonoides totales, así como una alta capacidad antioxidante y antiproliferativa comparada con otras plantas comestibles de la zona rural queretana (Miranda, 2005). Así mismo, los resultados obtenidos a partir de la inducción de enzimas de detoxificación de fase 2 en células transformadas de

hígado de ratón sugieren que los extractos de verdolaga son una fuente potencial importante para determinar su posible actividad quimioprotectora en un modelo de cáncer *in vivo* (Subías, 2006). Por otro lado, a la verdolaga se le atribuyen algunos usos medicinales relacionados con problemas digestivos, tales como infecciones intestinales, inflamación y estreñimiento. Por lo tanto, se considera que la verdolaga puede resultar ser un agente quimioprotector efectivo para reducir el número y el grado de lesiones, en un modelo de inflamación y cáncer de colon inducido químicamente.

II. ANTECEDENTES

2.1 CÁNCER

2.1.1 Definición

El cáncer o neoplasia es una enfermedad que se caracteriza por una proliferación celular descontrolada causada por la acumulación serial de mutaciones o alteraciones genéticas. La célula en la que esto ocurre comienza a crecer y a dividirse en forma descontrolada, al margen de las necesidades del organismo. Cuando esta célula tiene descendencia propensa a proliferar sin responder a la regulación, el resultado es un clon capaz de expandirse en forma indefinida. Este clon de células forma una masa denominada tumor. Los tumores pueden invadir células vecinas e incluso ingresar en el sistema circulatorio y llegar a tejidos distantes e invadirlos. La diseminación de las células tumorales y su establecimiento en zonas secundarias de crecimiento se denomina metástasis y los tumores que tienen esta característica se les considera malignos (Gariglio y Orozco, 2000; Lodish y col., 2003).

2.1.2 Proceso de carcinogénesis

El proceso de conversión de una célula corporal normal en maligna al parecer requiere múltiples mutaciones o eventos mutagénicos. Estas mutaciones pueden darse en diferentes genes como: supresores de tumores, proto-oncogenes, genes que participan en los mecanismos de reparación del ADN, otros que inducen apoptosis y los que participan en la proliferación del ciclo celular, dando origen a una célula cancerosa (Blum y col., 2001).

Para una mejor comprensión del proceso carcinogénico multietapas, se toma como modelo la carcinogénesis inducida químicamente. Las etapas sugeridas en este modelo son: exposición a un carcinógeno, iniciación, promoción, conversión y progresión.

Una célula corporal normal es expuesta a un agente mutagénico que le ocasiona un cambio genético activando proto-oncogenes y/o inactivando genes supresores de tumores. Esta mutación al no ser reparada por los sistemas celulares de reparación del ADN, da origen a una célula iniciada. Si esta célula es expuesta posteriormente a un agente promotor adquiere ventajas de crecimiento debido a que presenta defectos en los procesos de diferenciación terminal y en la resistencia a la citotoxicidad. Como resultado de estas alteraciones, la célula da origen a una lesión preneoplásica a través de un proceso denominado expansión clonal, dando origen a una lesión preneoplásica. Sin embargo, mutaciones adicionales son necesarias para la conversión de tumor benigno a un tumor maligno, así como para adquirir la capacidad de diseminarse a otros órganos (Figura 1) (Klaassen y col., 1996).

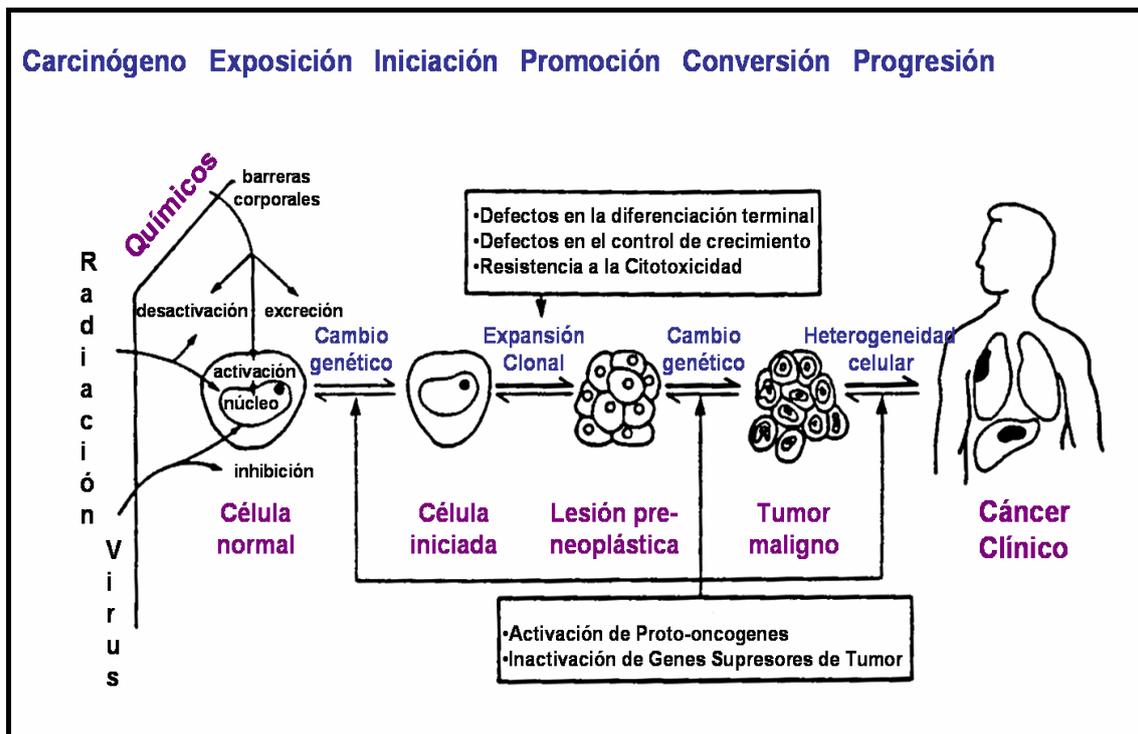


Figura 1. Etapas múltiples en el proceso de carcinogénesis (Klaassen y col., 1996).

2.1.3 Características de células cancerosas

Las células cancerosas difieren en varios aspectos de las células normales, ya que en las células cancerosas existe una diferenciación celular

incompleta, por lo que ya no cumplen con las características propias del tejido u órgano. Las células cancerosas poseen una tasa metabólica elevada y una morfología anormal tanto en el incremento del tamaño como en la densidad nuclear. También se ha visto que su proliferación celular es descontrolada y que no responden a los factores de crecimiento, volviéndose autónomas y perdiendo la inhibición por contacto, por lo que pueden crecer en capas o estratos formando la masa tumoral y sufrir una desorganización en la disposición original del tejido. Por otro lado, se sabe que las células cancerosas presentan crecimiento indefinido, por lo que son llamadas células inmortales (McCance y Huether, 1994; Torroella y Villa 1998; Griffiths y col., 2000).

2.1.4 Incidencia del cáncer de colon

En los últimos años el cáncer de colon ha mostrado una alta incidencia en países desarrollados como Japón, Francia, Canadá y Estados Unidos, ocupando en este último país el segundo lugar como causa de muerte. En nuestro país la incidencia de este tipo de cáncer se ha incrementado en años recientes, ocupando actualmente el octavo lugar como causa de muerte, tanto en hombres como en mujeres (Figura 2) y en el estado de Querétaro el noveno lugar (Jemal y col., 2002; Anuario Estadístico, 2004).

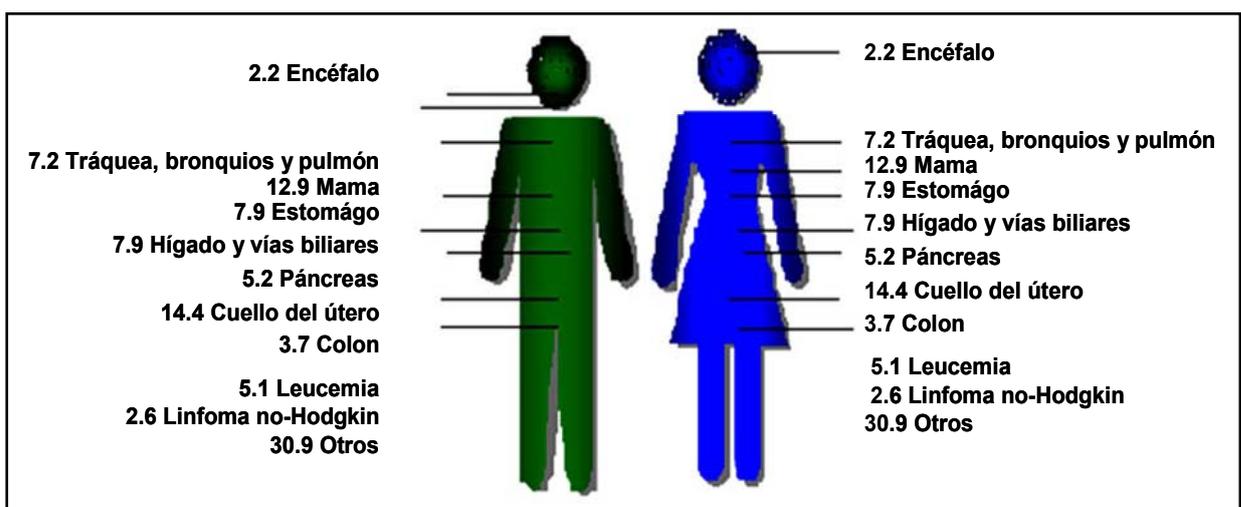


Figura 2. Distribución porcentual de defunciones por tumores malignos según sexo (INEGI; 2002).

El cáncer de colon se presenta con mayor frecuencia en hombres y, en un 90 % de los casos, se diagnostica después de los 50 años de edad. El hecho de que se presente con una mayor incidencia en hombres, se asocia estrechamente con la dieta, debido a que los hombres tienen una mayor ingesta de alimentos, un consumo menor de fibra y mayor consumo de grasas de origen animal y bebidas alcohólicas en comparación con las mujeres (Jemal y col., 2002; Lodish y col., 2003). Para tener una idea de lo costoso que resulta tratar este padecimiento, en Estados Unidos se tienen cifras en donde reportan que el 10 % del presupuesto de cuidados para la salud de todo el país se destina al cáncer y de esta cantidad el 24 % se enfoca al cáncer de colon, lo que da un total de 24 mil millones de dólares anuales (\$ 24 billones de dólares). Por lo que en este tipo de cáncer conocer terapias preventivas puede significar la vida de muchas personas y el ahorro de millones de dólares (Fuchs y Podda, 2004). Para ello es importante conocer los componentes que contribuyen a la etiología del cáncer de colon para alcanzar dentro de algunos años una menor incidencia de esta enfermedad y con ello mejorar la calidad de vida de la población.

2.1.5 Factores relacionados con el cáncer de colon

Se sabe que este padecimiento se relaciona estrechamente con factores tanto ambientales como genéticos. Recientemente fue reportado que únicamente el 20 % de los cánceres de colon se atribuyen a una causa genética, la mayoría de casos en este tipo de cáncer son eventos esporádicos que carecen de bases genéticas identificadas (Fuchs y Podda, 2004). Algunos de los factores ambientales que favorecen el desarrollo de cáncer de colon son: el tabaquismo, el estrés, el sedentarismo y el consumo excesivo de bebidas alcohólicas. La dieta se considera uno de los factores que más impacto tiene en el desarrollo de esta enfermedad. En el 2003, Begleiter y colaboradores consideraron que cerca del 90% de los cánceres de colon pueden prevenirse con cambios en la dieta. Algunos componentes de la dieta pueden actuar como carcinógenos que inician el proceso de carcinogénesis, promueven la expansión clonal o la progresión de un tumor. De manera contraria, ciertos

componentes de la dieta pueden prevenir la iniciación del proceso carcinogénico ayudando a inactivar o remover el carcinógeno, inhibiendo el proceso de carcinogénesis desintoxicando carcinógenos o directamente inhibiendo la evolución de una célula iniciada a una célula cancerosa (Surh, 2003). Algunos de estos componentes se encuentran principalmente en frutas y verduras; un mecanismo de protección ampliamente estudiado es la inducción de enzimas de fase 2 y las enzimas antioxidantes. Adicionalmente este grupo de alimentos ayuda a prevenir esta enfermedad, debido principalmente a sus elevados niveles de agentes antioxidantes (Surh, 2003).

Se han identificado ciertas patologías que pueden contribuir al desarrollo de este tipo de cáncer, entre ellas se encuentra la inflamación del colon, que incluye la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn, así también como las infecciones intestinales y el estreñimiento (Kazerouni y col., 2001; Fuchs y Podda, 2004; Suzuki y col., 2004).

La incidencia del cáncer de colon es por lo menos 30 veces mayor que en el intestino delgado. En contraste con el intestino delgado, el colon tiene una mayor exposición a la materia fecal. La actividad respiratoria de la microflora de las heces fecales son una fuente significativa de radicales superóxido ($O_2 \cdot^-$) que, en presencia de hierro, puede generar radicales hidroxilo ($\cdot OH$). También se ha reportado que en procesos inflamatorios del colon hay un exceso en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), y probablemente daño oxidativo, nitrativo y nitrosativo en los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. También se ha observado un descenso en los mecanismos antioxidantes de defensa (Fuchs y Podda, 2004).

2.1.6 Morfología y función del colon

El colon forma parte del aparato digestivo y se divide en apéndice, cecum, colon ascendente, transverso, descendiente, sigmoideo y recto; mide aproximadamente 1.5 m de largo. Dentro de las funciones principales del intestino grueso se encuentran la reabsorción de agua y electrolitos, así como la

eliminación del material no digerido o heces fecales (Fenoglio-Preiser y col., 1989). La eliminación es facilitada por la secreción de moco, que lubrica y protege a la mucosa del contenido del lumen, debido a esto la estructura histológica se conforma principalmente por glándulas de secreción de moco y por células epiteliales. El contenido del intestino delgado fluye al grueso de manera intermitente y es regulado por la válvula ileocecal. En el colon proximal el contenido es líquido y cambia a semisólido conforme va descendiendo, debido a la absorción de agua y electrolitos. La pared del colon está formada por 4 capas que incluyen la mucosa, la submucosa, la muscularis propia y la serosa. La superficie del colon tiene un arreglo geométrico con una amplia extensión de mucosa intestinal regularmente colocada en la abertura de las criptas de Lieberkühn (Fenoglio-Preiser y col., 1989). Las criptas tienen una longitud aproximada de 0.5mm y se extienden del lumen a la mucosa muscularis, y se acomodan en grupos de cinco o seis separadas por surcos profundos. El epitelio normal del colon está formado por células no diferenciadas, células globo maduras, células de absorción inmaduras y células de enterocromatina, con un patrón regular del proceso de diferenciación celular de la base de la cripta a la superficie luminal. Dentro de la capa denominada muscularis propia se expanden los nódulos linfoides, llegando hasta la parte superficial de la submucosa. Estas células linfoides forman parte del sistema inmune de la mucosa y secretan inmunoglobulina A (IgA) así como otras sustancias (Fenoglio-Preiser y col., 1989).

2.1.7 Relación entre la inflamación crónica del colon y el cáncer de colon

La inflamación crónica se asocia con un incremento en el riesgo de diversos tipos de cánceres humanos. Algunos ejemplos incluyen el *Helicobacter pylori* al inducir gastritis que conlleva a cáncer gástrico, la hepatitis viral crónica que deriva en cáncer de hígado, el esófago de Barrett que origina cáncer de esófago, así como la inflamación crónica o repetida de la mucosa intestinal (colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn) que puede originar y promover el desarrollo de cáncer en el colon. Este padecimiento involucra diversos mecanismos tales como la presencia de mutaciones genéticas, el aumento en

la proliferación celular, la inestabilidad genómica, algunos cambios en el metabolismo celular, y en la circulación enterohepática del ácido biliar, así como alteraciones de la flora bacteriana (Tanaka y col., 2003; Sawa y Ohshima, 2006).

La inflamación de la mucosa intestinal, presente en la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn, se ha relacionado con la distribución geográfica y la raza, también se ha documentado que afecta a individuos en una edad más temprana que la población en general.

Existen algunas causas que predisponen a los individuos con inflamación crónica de la mucosa del colon a padecer cáncer de colon. En primer lugar, el riesgo a presentar cáncer de colon aumenta con el aumento en la duración de colitis. Por alguna razón, es poco frecuente presentar cáncer de colon antes de padecer 7 años colitis; después de este tiempo, el riesgo aumenta de 0.5 a 1.0 % por año. En segundo lugar, la superficie que presenta colitis es determinante, entre mayor sea la superficie el riesgo también aumenta. Paradójicamente, pacientes con colitis en el recto no tienen riesgo de padecer cáncer. En tercer lugar, el riesgo de cáncer de colon es mucho mayor en ciertas subpoblaciones de pacientes con colitis que además tienen esclerosis primaria de bilis, una condición idiopática característica de inflamación crónica de los ductos biliares, que predispone no solamente a cáncer de colon sino también a cáncer del tracto biliar (Itzkowitz y Yio, 2004).

Sin embargo la patogénesis del cáncer de colon relacionado con la inflamación crónica del intestino todavía no es del todo conocida, por lo que se considera conveniente el uso de modelos animales para tener un mayor conocimiento de esta patología.

2.1.8 Modelos de los eventos genéticos y morfológicos en el cáncer de colon humano esporádico y cáncer de colon asociado a colitis

El desarrollo evidente de una lesión precursora, el pólipo adenomatoso, ha permitido construir un modelo de los eventos genéticos secuenciales en el

proceso de iniciación y progresión del cáncer de colon (Figura 3). Aparentemente, el orden en el que ocurren estas mutaciones es crítico para el desarrollo tanto de cáncer de colon esporádico como de cáncer de colon asociado a colitis (Itzkowitz y Yio, 2004).

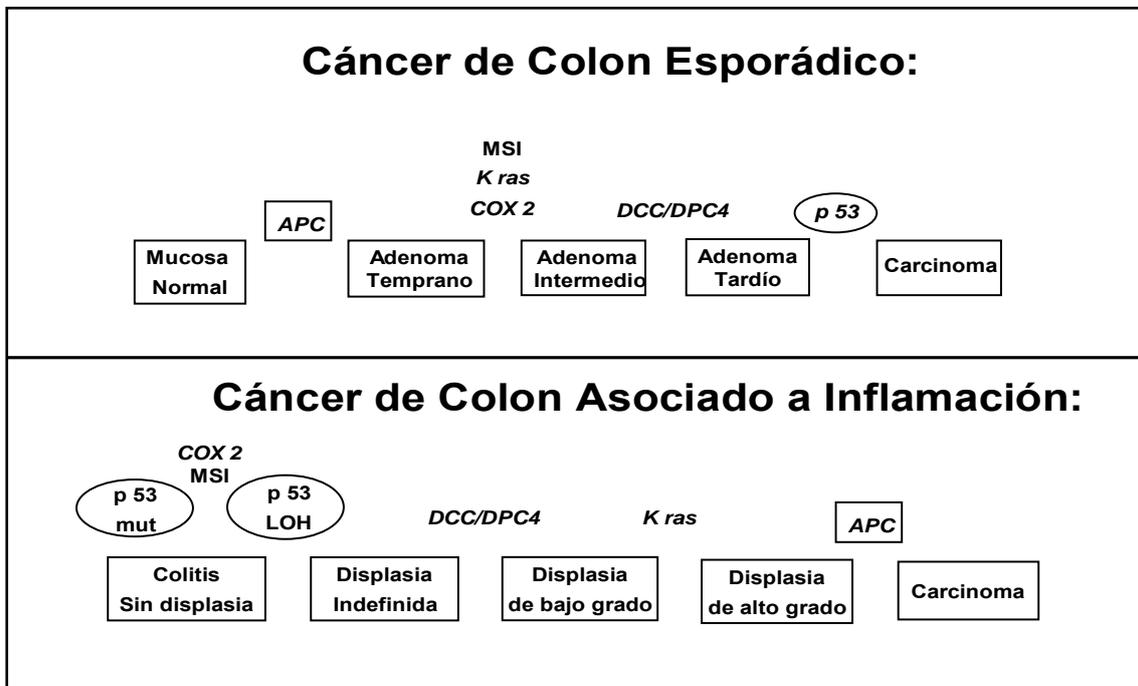


Figura 3. Secuencia de los genes mutados en cáncer de colon esporádico y asociado con colitis (Itzkowitz y Yio, 2004).

En el cáncer de colon esporádico la pérdida de gen *APC* ocurre en etapas tempranas, por lo que del gen *APC* se le ha denominado el “guardián” del colon. Durante del progreso del adenoma, en donde se ve incrementado el tamaño y el grado de displasia, ocurren otros cambios en la regulación genética, como la inducción del oncogen *k-ras*. La pérdida en la función del gen *p53* ocurre tardíamente y se cree que es un evento definitivo que convierte el adenoma en carcinoma. Por otro lado, en el cáncer de colon asociado a inflamación la progresión ocurre de una no displasia a una displasia indefinida, posteriormente a una displasia de bajo grado, luego una displasia de alto grado y finalmente un carcinoma (Figura 3) (Itzkowitz y Yio, 2004).

A diferencia del cáncer de colon esporádico, en donde aparecen lesiones en una o dos áreas definidas del intestino grueso, en la mucosa con

colitis el daño es multifocal y se caracteriza por una infiltración predominante de neutrófilos con abscesos de criptas y ulceración del epitelio (Itzkowitz y Yio, 2004). En la figura 4 se muestran cortes histológicos del colon de ratón ICR sometido a un experimento en el cual se indujo cáncer de colon asociado a colitis con cierto grado de inflamación y las criptas se clasifican morfológicamente de acuerdo al criterio descrito por Cooper y colaboradores (1993).

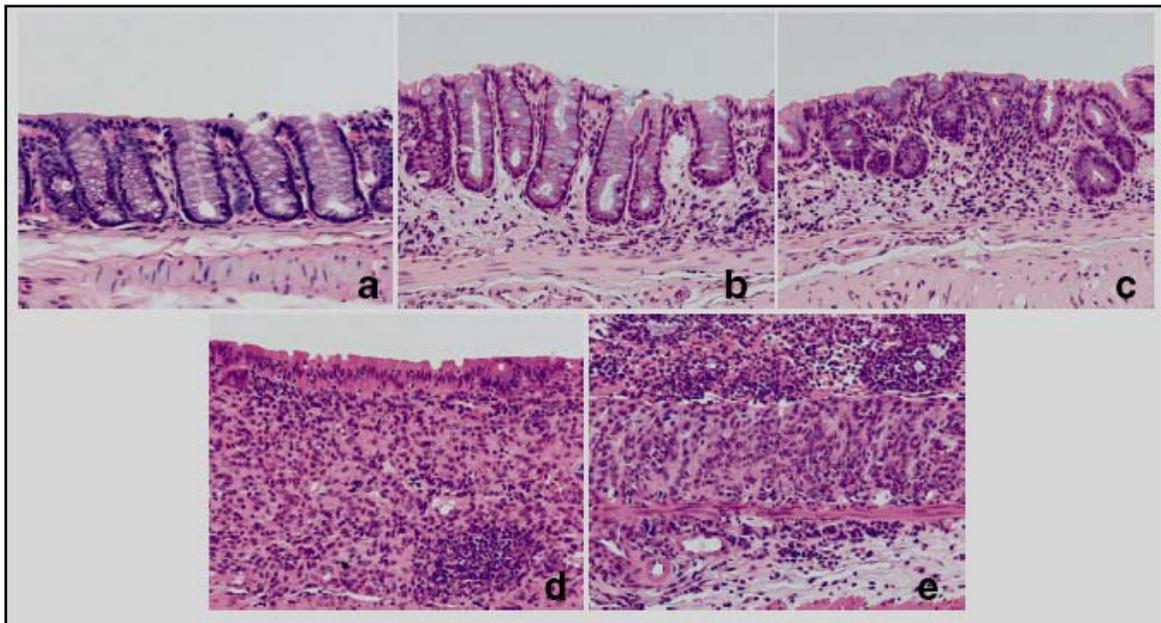


Figura 4. Histología de varios grados de colitis. a) mucosa del colon normal; b) algunas de las criptas se acortan un tercio de la parte basal y se distorsionan, también se observa inflamación en la lámina propia (infiltración de neutrófilos); c) pérdida de dos tercios de la cripta de la parte basal e inflamación moderada en la lámina propia; d) pérdida completa de la cripta con inflamación severa en la lámina propia, pero aún se conserva la superficie del epitelio; e) pérdida completa de la cripta y la superficie del epitelio con inflamación severa (infiltración de neutrófilos, linfocitos y células de plasma) en la mucosa, muscularis propia y submucosa (Cooper y col., 1993).

En cuanto a los eventos genéticos del cáncer de colon asociado a colitis en humano, se ha reportado que la pérdida del gen *APC* es menos frecuente y por lo general ocurre en etapas tardías de la secuencia. También se observa que las mutaciones en *p53* ocurren tempranamente y frecuentemente se detectan en la mucosa sin displasia o con displasia indefinida. De manera frecuente se han encontrado mutaciones de *p53* en la mucosa inflamada de

pacientes con colitis ulcerativa que no tienen cáncer, indicando que la inflamación crónica predispone a estas mutaciones tempranas. Se ha observado que en la mucosa inflamada hay una sobreexpresión de la proteína ciclo-oxigenasa 2 (COX-2), del óxido nítrico (NO), de la sintasa-2 de óxido nítrico (NOS)-2 y del gen inducible a interferón *1-8U* (Itzkowitz y Yio, 2004).

La frecuencia de la alteración o mutación en estos genes en el desarrollo del cáncer de colon (Cuadro 1), sugiere que pueden ser utilizados como biomarcadores moleculares y con ello detectar el cáncer en distintas etapas.

Cuadro 1. Prevalencia de mutaciones genéticas en el cáncer colon (Chung, 2000).

Gen/Proteína	Localización cromosomal	Prevalencia de la mutación
Oncogen		
<i>KRAS2</i>	12p	~ 50 %
<i>CTNNB1</i>	3p22	~ 4 -15 %
<i>SRC</i>	20q11	2 %
Genes supresores de tumores		
<i>APC</i>	5q21	~ 70 %
<i>TP53</i>	17p13	~ 50 -70 %
<i>SMAD4</i>	18q21	16 %
<i>SMAD2</i>	18q21	6 %
<i>DCC</i>	18q21	3 %
Deficiencia en genes de reparación del DNA		
<i>hMSH2</i>	2p21	
<i>hMLH1</i>	3p21	
<i>hPMS1</i>	2q31-33	~ 15 %
<i>hPMS2</i>	7p22	
<i>hMSH6</i>	2p21	

2.1.9 Fosas crípticas aberrantes (FCA) utilizadas como marcadores de lesión precancerosa

Como ya se mencionó, la carcinogénesis ocurre en un proceso de multietapas, por lo que conocer los eventos que se dan en cada una de estas etapas puede influir, para prevenir o inhibir el desarrollo del cáncer. Es por esto que el uso de metodologías que permitan evaluar algunos biomarcadores en cada una de las etapas de la carcinogénesis puede ser de gran importancia. El ensayo de fosas crípticas aberrantes (FCA) se ha utilizado para evaluar las etapas de iniciación y promoción en la carcinogénesis inducida químicamente. Las FCA son lesiones morfológicas, observadas estereotípicamente como criptas grandes y elevadas con un epitelio grueso, con aberturas luminales y claramente rodeadas por criptas normales. Estas lesiones fueron inicialmente descritas en el colon de roedores tratados con carcinógenos y posteriormente se observó una alta incidencia de FCA en pacientes con cáncer de colon (Bazo y col., 2002).

Las FCA han sido utilizadas como lesiones precancerosas que se proyectan hacia el interior o luz del colon. Con el tiempo, varias fosas de criptas aberrantes contienen más de una cripta (Figura 5). Posteriormente, el colon puede contener un gran número de FCA mostrando un espectro característico de crecimiento determinado por el número de criptas presentes en cada fosa (multiplicidad de criptas). Una cripta aberrante única se expande mediante la ramificación o multiplicación de la misma. Cuando estas lesiones se desarrollan la mayoría de ellas exhiben diversos grados de displasia (Figura 6). El número de FCA en el colon varía con el tiempo indicando que están en un estado dinámico de remodelación o regresión (Bird y col., 2000; Bazo y col. 2002). Sin embargo no todas las FCA van a desarrollar un tumor.

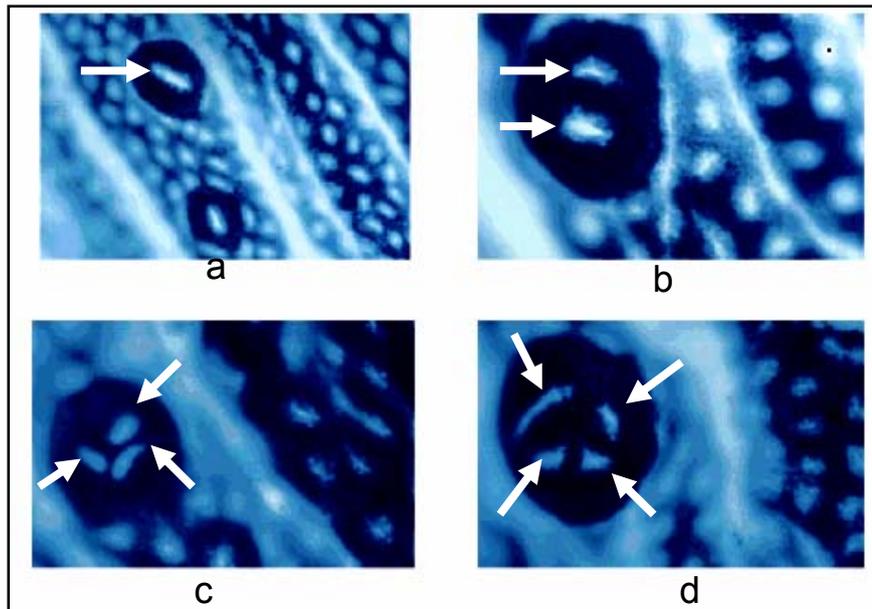


Figura 5. Imágenes que muestran la presencia de criptas aberrantes: a) 1 cripta, b) 2 criptas, c) 3 criptas y d) 4 criptas (Bazo y col., 2002).

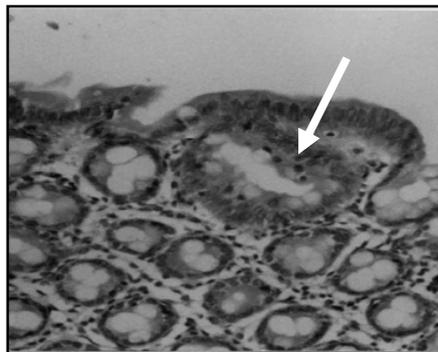


Figura 6. Cripta del colon que presenta displasia

Las FCA pueden dar origen a una alteración en el epitelio intestinal denominado displasia. La displasia es una alteración que puede presentar diversas apariencias, como por ejemplo una mucosa plana que no presenta pliegues en la mucosa, o que presenta una apariencia granular, o un aspecto aterciopelado acompañado de una transformación en las vellosidades de la mucosa, también pueden verse varias placas o nódulos en forma florida que pueden ser adenomas. El epitelio que presenta displasia además de ser un marcador o precursor de carcinoma, por si propio se considera una lesión maligna y asociada con invasión directa al tejido interno. La clasificación de displasia consta de 3 categorías principalmente: negativa, indefinida y positiva

(Cuadro 2). Esta clasificación va a depender de cierta combinación de la observación microscópica como las alteraciones en la arquitectura, ciertas anomalías citológicas, principalmente celulares y pleomorfismos nucleares, hiper cromatismo nuclear, pérdida de polaridad y una marcada estratificación del núcleo (Riddell y col., 1983).

Cuadro 2. Clasificación de displasia en biopsias de colon inflamado (Riddell y col., 1983).

Negativa

Mucosa normal

Colitis inactiva

Colitis activa

Indefinida

Probablemente negativa (probablemente inflamación)

Desconocido

Probablemente positiva (probablemente displasia)

Positiva

Displasia de bajo grado

Displasia de alto grado

Existen diversos factores que afectan la mucosa, lo que dificulta la clasificación de displasia, ya que algunos cambios epiteliales son inequívocamente negativos o positivos para displasia. Por lo que diversos patólogos han determinado adaptar esta clasificación de Riddell y colaboradores (1983), tomando en cuenta únicamente las clasificaciones de negativa y positiva; si la displasia es clasificada como positiva, se subclasifica en displasia de grado bajo y de grado alto. Algunos patrones como la inflamación activa observada en forma “florida” y regenerada, pueden considerarse como displasia de manera equivocada (Riddell y col., 1983).

Con el fin de evaluar los parámetros de displasia e inflamación, el empleo de modelos animales experimentales permite conocer los mecanismos

de inducción de cáncer con carcinógenos químicos (DMH) y promotores de cáncer (DSS). La determinación de algunos biomarcadores genéticos (APC, K-ras y p53), alteraciones morfológicas como las FCA, displasia e inflamación, así como posibles mecanismos de protección (inducción de enzimas de fase 2 y las antioxidantes), resultan apropiados para evaluar el extracto de verdolaga como un posible alimento con propiedades de prevención del cáncer de colon.

2.2 MODELOS ANIMALES PARA EL CÁNCER DE COLON

2.2.1 Clasificación de carcinógenos colónicos

Entre los carcinógenos colónicos generalmente utilizados para inducir cáncer en animales experimentales, se encuentran la dimetilhidrazina (DMH) y su metabolito azoximetano (AOM), la metil nitrosourea y el 2-amino-1-metil-6,6-fenilimidazol-(4,5-b)-piridina, siendo la DMH o su metabolito AOM los más comúnmente usados (Corpet y Taché, 2002). Se ha informado que cualquiera que sea la ruta de administración, en dosis adecuadas, la DMH produce una alta incidencia de adenomas y adenocarcinomas en el colon de ratas y ratones, así como en el intestino delgado aunque en menor cantidad. Esto se debe principalmente a su actividad alquilante en los ácidos nucleicos del epitelio intestinal. Este carcinógeno actúa modificando el genoma del enterocito, y ocasionando alteraciones celulares como pérdida de la diferenciación, ganancia de invasividad o una conducta proliferativa anormal (Lodish y col., 2003).

2.2.2 Metabolismo de activación e inactivación de la dimetilhidrazina (DMH)

La DMH se encuentra en el hígado una hora después de la inyección subcutánea y tres horas después en las células epiteliales del colon. El carcinógeno es excretado primariamente por el pulmón y los riñones, los cuales eliminan el 50 % de la dosis inyectada. Los metabolitos en el aire expirado son CO₂ y azoximetano, mientras que la orina contiene al carcinógeno inalterado y los metabolitos: azoximetano (AOM) y metilazoximetanol (MAOM) (Jackson y Singletary, 2004).

En hígado, la DMH es principalmente oxidada y activada por varios sistemas enzimáticos de fase 1 (citocromo P450 y flavín-monooxigenasas) a AOM, el cual es posteriormente N-hidroxilado en MAOM. El MAOM es un compuesto muy inestable y se descompone de manera espontánea en formaldehído e ión metildiazonio, el cual se cree es el último carcinógeno (carcinógeno final) debido a su capacidad de metilar los ácidos nucleicos ADN y RNA (Figura 7) (Negrete y col., 2000).

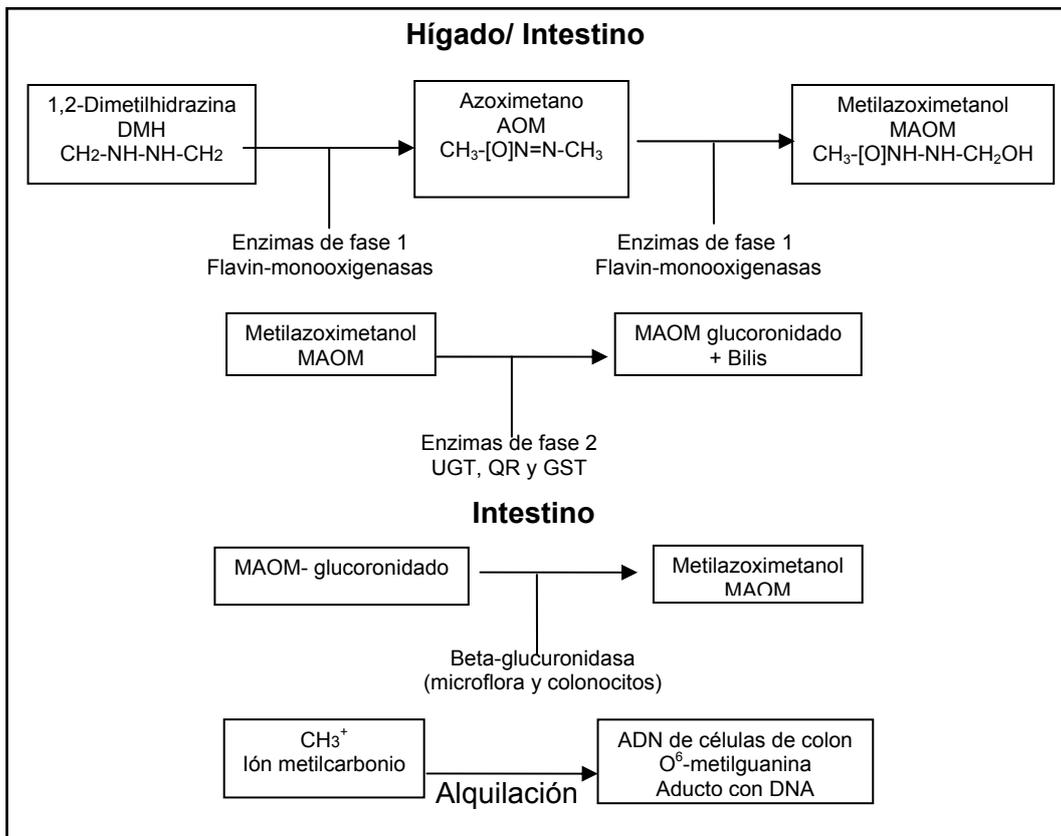


Figura 7. Metabolismo de activación y conjugación de la DMH en el hígado y el intestino (Corpet y Taché, 2002).

También en el hígado los diferentes metabolitos de la DMH pueden ser conjugados por enzimas de fase 2 de desintoxicación como la uridín difosfato glucoronisil-transferasa (UGT), la quinona reductasa (QR) y la glutatión S-transferasa (GST) a metabolitos no tóxicos, los cuales son posteriormente eliminados vía urinaria o en heces (Figura 7). Sin embargo, una vez en colon la reactivación del carcinógeno puede darse a través de la enzima β -glucuronidasa propia de la microflora normal o de las células del colon. De esta

manera, el metabolito tóxico que fue conjugado en el hígado mediante la glucoronidación (MAOM) es liberado o hidrolizado a nivel de colon del cual se deriva el ión metilcarbanión que, al unirse al DNA, da origen a la formación de aductos y, finalmente, al desarrollo de tumores (Jackson y Singletary, 2004).

2.2.3 Efecto promotor/inflamatorio del dextrán sulfato de sodio (DSS) en el cáncer de colon inducido químicamente

El dextrán sulfato de sodio (DSS) es el compuesto químico más ampliamente utilizado para inducir colitis o inflamación del colon, fenómeno altamente relacionado con el desarrollo de cáncer colorrectal en humanos (Suzuki y col., 2004). El DSS es un polisacárido sintético sulfatado, compuesto de dextrán con sulfato de glucosa, cuyo mecanismo de acción se basa principalmente en el daño mecánico a la mucosa del colon (Figura 8). A pesar de no ser un compuesto genotóxico, el tratamiento a largo plazo (6 meses) con DSS si puede resultar genotóxico, ocasionando el desarrollo de cáncer de colon en ratas, ya que la inflamación inducida por el DSS conlleva a la oxidación del DNA, formando 8-hidroxi-deoxiguanosina en la mucosa colónica, lo que a su vez en esta situación puede tener un papel importante en la iniciación del proceso de cáncer (Onose y col., 2003).

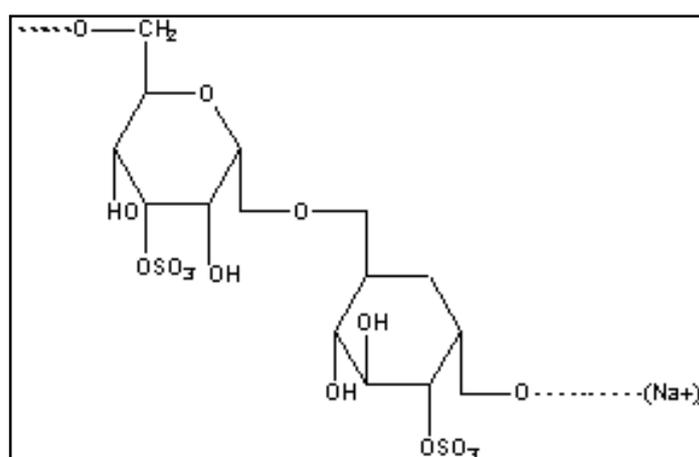


Figura 8. Estructura química del dextrán sulfato de sodio.

La administración de DSS a una concentración del 1% durante una semana con tratamiento previo de DMH (40 mg/kg de peso corporal), ocasiona un efecto promotor en el desarrollo de cáncer de colon. Por lo que, diversos estudios han reportado que empleando el modelo DMH-DSS es posible obtener un mayor número de tumores en un período de tiempo más corto (Onose y col., 2003). Así mismo, la administración de ambas sustancias representa un modelo más adecuado para el estudio de cáncer de colon asociado a colitis ocasionada por inflamación crónica de la mucosa intestinal.

Como se mencionó anteriormente, existen diversos estudios que sugieren que las especies reactivas del oxígeno, como el superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el óxido nítrico (NO) y los radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) pueden ser los causantes del daño intestinal en el padecimiento de la inflamación de la mucosa intestinal (Mazzon y col., 2005).

2.2.4 Alteraciones genéticas en el modelo DMH ó DMH/DSS en animales de experimentación

El modelo de cáncer de colon inducido por la DMH ofrece la oportunidad de identificar las alteraciones genéticas en diversos órganos por un carcinógeno químico y es utilizado principalmente en roedores (Jackson y col., 1999). En 2003, Tanaka y colaboradores reportaron que la administración de AOM y DSS causó que el 100% de los adenocarcinomas resultaran positivos para β -catenina, ciclooxigenasa (COX-2) y la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS).

Diversos estudios indican que COX-2 no se encuentra presente en condiciones fisiológicas normales, pero es regulada en procesos inflamatorios y se encuentra expresada en niveles altos en un 80 - 90 % de los adenocarcinomas colorrectales (Mutoh y col., 2000). Por otro lado, el tratamiento con inhibidores selectivos de COX-2 protege efectivamente contra el desarrollo y la progresión del cáncer, tanto en modelos *in vitro* como en modelos animales.

Se ha reportado que la expresión de iNOS es difícilmente detectable tanto en células epiteliales como estromas de la mucosa del colon normal. Sin embargo, es frecuente observar una expresión elevada de iNOS en displasias como las fosas crípticas aberrantes (FCA), adenomas y adenocarcinomas. La expresión de iNOS es detectada en prácticamente todas las lesiones en las cuales hay alteraciones de β -catenina, lo cual indica una posible relación ya sea de manera directa o indirecta (Tanaka y col., 2003). Existe también una relación entre la activación oncogénica de K-ras y el incremento en la expresión de iNOS en presencia de un estímulo inflamatorio, lo que probablemente promueve el desarrollo de tumores (Takahashi y Wakabayashi, 2004).

Recientemente se identificó que el complejo β -catenina TCF /LEF regula la expresión del gen COX-2 en células humanas colorrectales HT29-APC (Surh, 2003). La sobre expresión de COX-2 confiere a las células tumorales resistencia a la apoptosis y las estimula para la neovascularización (angiogénesis), confiriéndoles de esta manera ventajas para sobrevivir y proliferar (Takahashi y Wakabayashi, 2004).

El empleo de fitoquímicos que modulen tanto las enzimas de fase 2 como las enzimas antioxidantes, pudieran tener un efecto benéfico para proteger tanto en casos de inflamación de la mucosa intestinal como de cáncer colorrectal. Estas enzimas son reguladas principalmente por el factor de transcripción Nrf2.

2.3 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN: Nrf2

2.3.1 Función de Nrf2 en la regulación de las enzimas de fase 2

Nrf2 (NF-E2-relacionado al factor 2) es miembro de la familia de factores de transcripción que interaccionan a través de la cremallera de leucina. Esta proteína se localiza en el citoplasma unida a la proteína Keap1 (Kelch-like ECH asociado a la proteína 1), la cual está asociada al citoesqueleto. En respuesta a compuestos electrofílicos (agentes inductores), metabolitos derivados de

carcinógenos y especies reactivas del oxígeno, el complejo Keap1/Nrf2 se disocia, permitiendo la traslocación del factor de transcripción Nrf2 al núcleo y la activación de genes dependientes de este complejo (Itoh y col., 2002). Una vez en núcleo, Nrf2 forma dímeros con proteínas Maf, los cuales se unen a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) que se encuentran en las regiones promotoras de los genes que codifican para las enzimas de fase 2 de detoxificación y enzimas antioxidantes (Itoh y col., 2002).

En 1997, Itoh y colaboradores demostraron por primera vez el papel esencial de Nrf2 en la expresión basal e inducible de los niveles de mRNA de GST y NQO1 mediante el empleo de animales deficientes en Nrf2. Así mismo, Nrf2 participa en la inducción de los niveles de mRNA de aproximadamente 200 genes, entre los cuales se incluyen genes que codifican para enzimas de detoxificación, proteínas antioxidantes, enzimas que sintetizan glutatión, proteínas regeneradoras de NADPH, factores de crecimiento, proteínas anti-inflamatorias, proteínas chaperonas y de tráfico, subunidades del proteosoma 26S y moléculas de señalización de cascadas (Kwak y col., 2003; Lee y col., 2003). Lo anterior confirma el papel protector de Nrf2 en la célula contra diversos estímulos adversos.

2.3.2 Mecanismo de activación y regulación del complejo Keap1/Nrf2

Diversos estudios muestran que los tratamientos con compuestos naturales o inductores de enzimas, permiten que el complejo citosólico Keap1/Nrf2 se separe y Nrf2 entre al núcleo, a través de diversos mecanismos. Talalay (2000) propone que el agente inductor de enzimas de fase 2 puede interactuar directamente sobre Nrf2, Keap1 o ambos, a través de modificaciones de los grupos sulfhidrilos de las cisteínas (Figura 9).

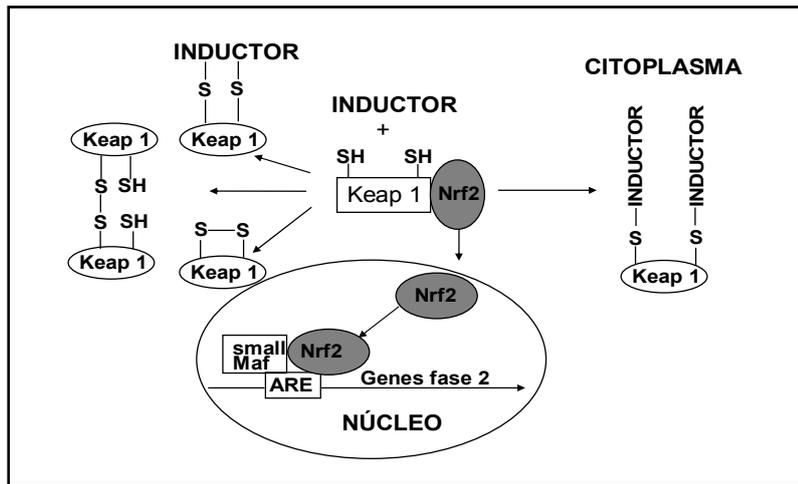


Figura 9. Mecanismos de acción de un agente inductor sobre el complejo Keap1/Nrf2 (Talalay, 2000).

Además de la interacción directa del inductor con el complejo Keap1/Nrf2, otras rutas pueden interactuar con el complejo activándolo. La cascada de señalización de las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs, por sus siglas en inglés) como ERK (cinasa regulada por estímulos extracelulares) (Zipper y col., 2003), PKC (cinasa de la proteína C) (Venugopal y Jaiswal, 1999) y PI3K-Akt (cinasa del fosfatidil-3-inositol) (Kang y col., 2002) participan sobre el complejo Keap1/Nrf2, favoreciendo la disociación de Nrf2 de su inhibidor Keap1, su traslocación al núcleo donde dimeriza con small Mafs y su unión a elementos de respuesta a antioxidantes o electrófilos (ARE/EpRE), que se encuentran localizados en la región promotora de genes que codifican para enzimas de fase 2 (Figura 10). Así también, se ha reportado la regulación negativa de enzimas de fase 2, ya sea a través de la ruta de p38 que regula negativamente al complejo Nrf2/Keap1 o por competencia entre Nrf2 y otros factores de transcripción por su unión a ARE/EpRE (Venugopal y Jaiswal, 1999; Huang y col., 2000; Dhakshinamoorthy y col., 2005).

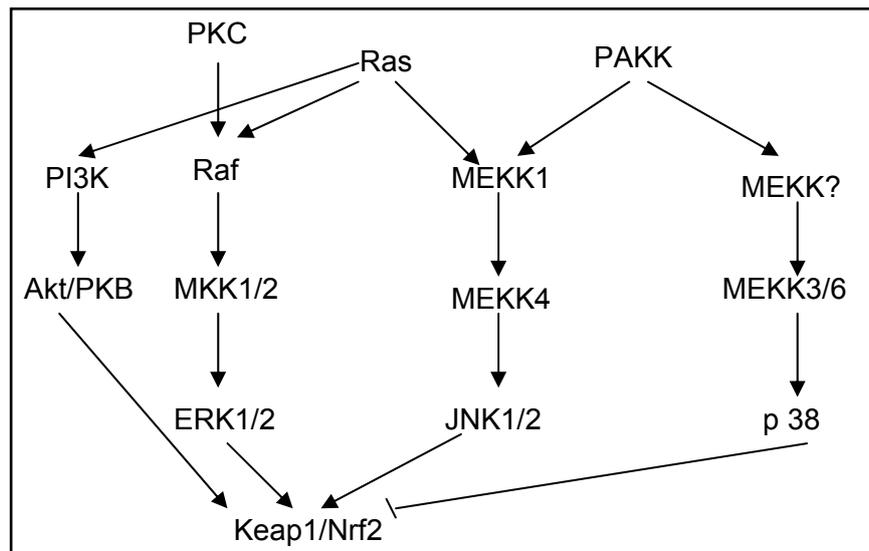


Figura 10. Regulación del complejo Keap1/Nrf2 (Adaptado de Keum y col., 2004)

Debido al papel esencial de Nrf2 en la expresión basal e inducible de los niveles de mRNA de una gran diversidad de enzimas y proteínas antioxidantes (hemo-oxigenasa y ferritina), enzimas de detoxificación de fase 2 (GST y QR), enzimas de síntesis de glutatión (gamma-cisteín glutatión sintasa), el empleo de estrategias que regulen positivamente el complejo Keap1/Nrf2 resultan altamente atractivas en el tratamiento o en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, como el cáncer (Talalay y col., 2000). Así mismo, existe la posibilidad de que Nrf2 sea blanco de las alteraciones inducidas por diversas sustancias tóxicas o carcinogénicas, lo que a su vez alteraría los sistemas de defensa celular e incrementaría la susceptibilidad al desarrollo del cáncer. Por lo tanto, la identificación temprana de alteraciones en la función de Nrf2 en un modelo de cáncer, permitirá emplearlo como un biomarcador de susceptibilidad en el desarrollo del cáncer.

2.4 FITOQUÍMICOS PRESENTES EN EXTRACTOS VEGETALES

2.4.1 Efecto quimioprotector de los extractos vegetales

Desde tiempos remotos el hombre ha utilizado diferentes plantas con fines curativos y medicinales, basándose solamente en una tradición y con

conocimientos empíricos. Sin embargo, no es hasta hace algunos años cuando se iniciaron los estudios sistemáticos con los fitoquímicos para determinar un beneficio a la salud. Así mismo, estos estudios han sido de gran importancia para conocer el mecanismo de acción de dichos compuestos y, por lo tanto, diseñar estrategias más efectivas de tratamiento.

En la actualidad, estudios epidemiológicos demuestran que un consumo de 5 raciones de frutas o vegetales por día presentes en la dieta, se asocia con una menor probabilidad de padecer enfermedades crónico-degenerativas, como el cáncer, la diabetes, los padecimientos cardiovasculares, las cataratas, la disfunción inmunológica y cerebral (Eskin y Tamir, 2006). Lo anterior se debe principalmente a la presencia de fitoquímicos tales como la curcumina, el betacaroteno, el sulfurofano, el resveratrol, la genisteina, el ácido gálico o los flavonoides, que pueden funcionar como agentes bloqueadores o agentes supresores en el proceso carcinogénico (Cuadro 3). A los alimentos que tienen compuestos quimioprotectores se les ha dado el nombre de alimentos funcionales (Surh, 2003; Chen y Kong, 2005).

De manera convencional se han utilizado animales experimentales, principalmente roedores, para conocer el efecto de algunos de compuestos quimioprotectores presentes en los alimentos, así también se han elaborado extractos vegetales tanto de plantas, granos y frutos para facilitar la administración a los animales experimentales. Estos extractos pueden ser acuosos, utilizando agua a 100° C, mientras que para la extracción de los fitoquímicos orgánicos empleando solventes como el metanol, el hexano u otros. Lo anterior dependiendo de la polaridad de los solventes y los compuestos que se deseen acarrear.

Cuadro 3. Mecanismos potenciales de compuestos quimioprotectores (Chen y Kong; 2005).

Función	Ejemplos	Fuentes
Agentes bloqueadores		
Promueven la destoxificación de carcinógenos	Curcumina Sulfurofano Indol-3-carbinol	Azafrán de las Indias Vegetales crucíferos Vegetales crucíferos
Inhibición de citocromos P450 que participan en la activación de carcinógenos	Isotiocianatos	Vegetales crucíferos
Actividad antioxidante (atrapamiento de radicales libres) Atrapa carcinógenos y previene su interacción con el ADN	Selenio Vitamina E	Nueces y carne Aceites vegetales
Agentes supresores		
Interrumpe el ciclo celular y/o induce apoptosis	Epigallocatequingalato Quercetina Resveratrol Curcumina Sulfurofano	Té verde Cebolla y jitomate Uvas Azafrán de las Indias Vegetales crucíferos
Modula la actividad hormonal	Genisteína	Soya
Modula los receptores nucleares	Vitamina D Retinoides	Pescado Huevo y leche
Suprime la expresión de genes por mutación de ADN	Ácido fólico	Frutas y vegetales

2.4.2 Mecanismos de protección de agentes quimioprotectores

En el proceso del cáncer, los mecanismos de protección consideran etapas múltiples que están involucradas en este padecimiento y las estrategias de intervención incluyen primero la inhibición de la mutación y de la iniciación del cáncer; y después los mecanismos que interfieren con etapas posteriores de

la carcinogénesis, i.e., promoción, progresión, invasión y metástasis (De Flora, 1997).

Según Silvo De Flora (1997), el término quimioprevención se puede definir como la inhibición del proceso de carcinogénesis en sus etapas iniciales. De tal forma que las estrategias de prevención primaria se dan en individuos sanos con la finalidad de evitar el inicio del cáncer. Las estrategias de prevención secundaria se aplican en individuos que sufren una situación de preneoplasia (tumor benigno) y que puede ser regresiva. Por otro lado, el término quimioprotección involucra las etapas subsiguientes en el proceso de carcinogénesis (progresión, invasión y metástasis). Las estrategias de intervención terciaria involucran la inhibición de la invasión y metástasis en individuos con cáncer clínico (Figura 1) (De Flora, 1997).

Se sabe que existen una gran diversidad de agentes quimioprotectores presentes en las frutas y vegetales que han demostrado tener un efecto protector contra ciertos tipos de cánceres en humanos y probados ampliamente en animales de laboratorio, a través de una gran variedad de mecanismos. Entre los mecanismos de protección se pueden incluir la inducción de enzimas detoxificantes de fase 2 y de enzimas antioxidantes, así como la inhibición de enzimas activadoras de carcinógenos o de fase 1 (Zhang y Talalay, 1998; Gao y col., 2003).

2.4.3 Inducción de enzimas de fase 2 y antioxidantes como estrategia general contra enfermedades crónico-degenerativas

En contraste con la activación metabólica de carcinógenos químicos mediada por las reacciones de enzimas de fase 1, las reacciones de fase 2 catalizan la conjugación con glutatión, sulfato y ácido glucorónico, entre otros cofactores, neutralizando así los intermediarios electrofílicos, facilitando la eliminación de estos metabolitos y previniendo así que reaccionen con los grupos nucleofílicos del DNA. Así como los compuestos electrofílicos pueden dañar al DNA, las especies reactivas del oxígeno (ROS) también formadas por

la biotransformación de carcinógenos como la 1,2-DMH pueden dañar al DNA y, como consecuencia, desarrollar cáncer u otra enfermedad. Sin embargo, el organismo ha desarrollado estrategias en respuesta a estos posibles daños (Ishii y col., 2000; Itoh y col., 2002).

Como un mecanismo de defensa, la exposición de células animales a niveles bajos de compuestos electrofílicos y especies reactivas resulta en la elevación de los niveles de GHS y la inducción de enzimas de fase 2 de desintoxicación, incluyendo a la GST, QR y UGT. Estas enzimas detoxificadoras de electrófilos protegen a las células contra los efectos tóxicos de carcinógenos convirtiendo los electrófilos reactivos en productos menos tóxicos y de más fácil excreción (Figura 11) (Pretera y col., 1993; Huang, 2000).

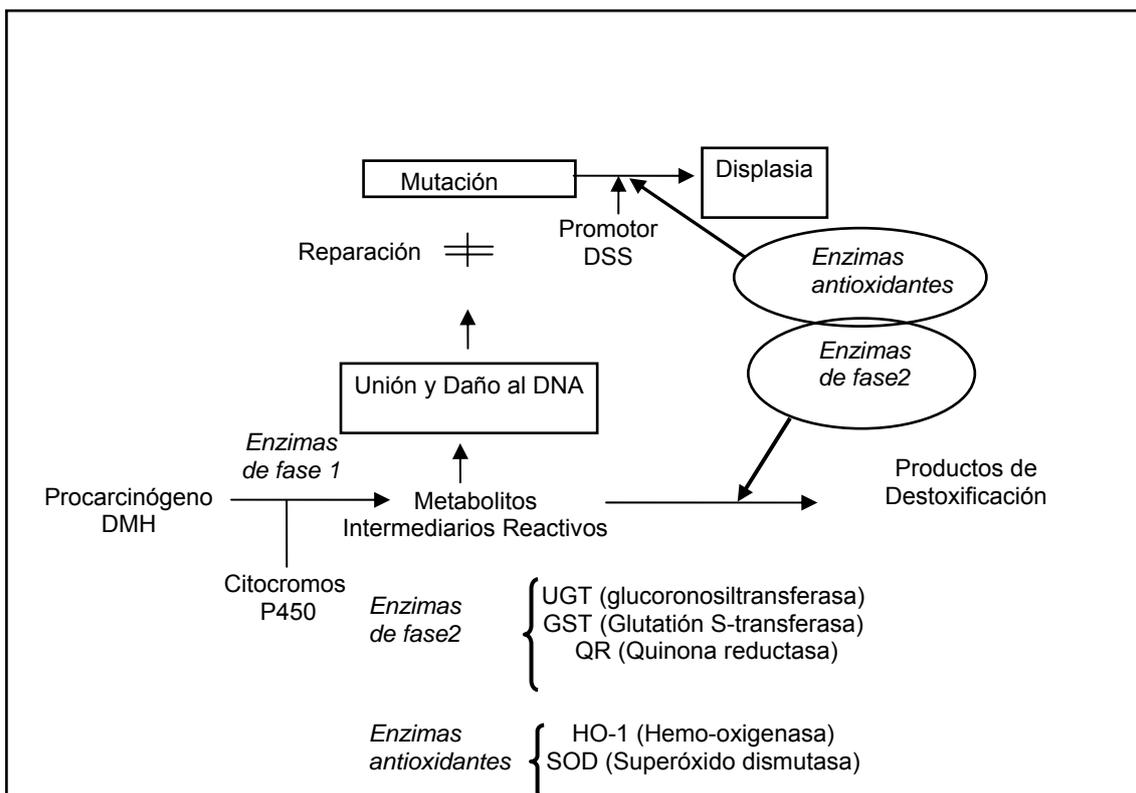


Figura 11. Mecanismos de quimioprotección de enzimas de fase 2 y antioxidantes (Adaptada de Talalay, 2000).

Se han identificado un gran número de inductores de enzimas de fase 2 como potentes anticarcinógenos y se han clasificado en varios grupos según su estructura química: isotiocianatos, ditioneiones, quinonas oxidables, aceptores

de reacción de Michael y carotenoides/polienos, entre otros (Zhang y col., 1994). A este respecto, diversos estudios moleculares muestran que el incremento en la expresión de enzimas de fase 2, de enzimas y proteínas antioxidantes como la ferritina, es el resultado de la actividad transcripcional de sus genes correspondientes. Este incremento en la expresión de enzimas de fase 2 es mediado a través de la unión del factor de transcripción Nrf2 a los elementos responsivos a antioxidantes (AREs) presentes en la región promotora de estos genes. Así mismo, diversos estudios proporcionan amplia evidencia que un período de 48 horas después del tratamiento con diferentes agentes inductores es suficiente para elevar la expresión de un gran número de enzimas de fase 2 y antioxidantes (Davidson y col., 1990; Ramos-Gómez y col., 2001; Kwak y col., 2004).

Balogun y colaboradores (2003) realizaron estudios con dos compuestos polifenólicos extraídos de plantas, la curcumina y el éster fenetil del ácido caféico (CAPE), antioxidantes de origen natural. Los autores concluyen que estos compuestos inducen la expresión y actividad de enzimas antioxidantes a través de la actividad del factor de transcripción Nrf2. Así mismo, los resultados sugieren a Nrf2 como un potente regulador del gen anti-inflamatorio *Ho-1*.

Estudios recientes muestran que la gran mayoría de los agentes inductores poseen varios mecanismos como parte de su efecto protector, entre los que se incluyen la inhibición del crecimiento celular por arresto del ciclo celular, la activación del proceso de apoptosis (Chiao y col., 2002) y la ruptura de la polimerización normal de la tubulina, entre otras (Jackson y col., 2004).

Con respecto a los polifenoles y flavonoides, se han estudiado varias de sus funciones biológicas, entre ellas la actividad antioxidante, los efectos antimutagénicos (Guo y Sonenshein, 2006), los efectos anticarcinogénicos (Zaveri, 2006), así como sus propiedades anti-inflamatorias, antimicrobianas, antialérgicas y antiasmáticas (Pietta, 2000; Russo y col., 2000). Se sabe que los polifenoles ejercen sus efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos a través de la inducción de enzimas de fase 2 (Chandra y González, 2004), el bloqueo de la biosíntesis del carcinógeno final, la inhibición de la unión covalente del

carcinógeno con el DNA, la inhibición de la síntesis de DNA y de la proliferación celular y la inducción de apoptosis en líneas celulares de cáncer humano (Bin y col., 2006). Lo anterior confirma el amplio espectro de acción de los polifenoles en la prevención y tratamiento del cáncer de colon asociado a colitis o esporádico.

2.4.4 Principales plantas comestibles del estado de Querétaro y su caracterización

Resultados previos obtenidos por el grupo de investigación indican que de las plantas comestibles bajo estudio: *Amaranthus hybridus*, *Brassica rappa*, *Cnidoscolus chayamansa*, *Chenopodium murale*, *Melampodium perfoliatum*, *Malva parviflora*, *Rumex crispus*, *Portulaca oleraceae*, *Yucca fillifera*, *Nasturtium officinale* y *Porophyllum tagetoides*, la *Portulaca oleraceae* contiene cantidades importantes de fenoles y flavonoides (Cuadro 4). Para este análisis, los compuestos fenólicos fueron extraídos por medio del Soxhlet y el contenido de fenoles totales fue determinado mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (Dewanto y col., 2002). La cuantificación de flavonoides totales se realizó por el método descrito por Liu y colaboradores (2002). De acuerdo a los resultados, la *Portulaca oleraceae* (verdolaga) presenta los mayores niveles de compuestos fenólicos y flavonoides totales comparados con los otros extractos. A este respecto, varios estudios *in vitro* confirman la capacidad de los diversos flavonoides extraídos de vegetales para inducir significativamente enzimas de fase 2, como la QR (ó NQO1) (Yannai y col., 1998; Gohar y col., 2000).

Como parte de la caracterización de la actividad biológica de los extractos metanólicos de las plantas comestibles, también se llevó a cabo la determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo de DPPH, de acuerdo al procedimiento descrito por Fukumoto y Mazza (2000). El ensayo de DPPH consiste en determinar la capacidad antioxidante de una sustancia mediante el atrapamiento de radicales libres o especies oxidantes generados por el compuesto DPPH. De manera similar a los contenidos de fenoles y flavonoides totales, los resultados indican que el extracto de *Portulaca oleraceae* (verdolaga) posee la mayor capacidad antioxidante (Miranda, 2005).

Cuadro 4. Contenido de fenoles y flavonoides totales de los extractos metanólicos de plantas comestibles obtenidos mediante el método Soxhlet (Miranda, 2005).

MUESTRA	Fenoles	Flavonoides
	mg eq. ác. gálico/g de extracto	mg eq. (+) catequina/g de extracto
<i>Amaranthus hybridus</i>	155 ± 25	9.4 ± 0.35
<i>Yucca fillifera</i>	222 ± 18	4.4 ± 0.15
<i>Malva parviflora</i>	298 ± 3	10.9 ± 0.75
<i>Nasturtium officinale</i>	304 ± 6	4.3 ± 0.22
<i>Brassica rapa</i>	351 ± 15	7.4 ± 0.05
<i>Chenopodium murale</i>	363 ± 1	13.8 ± 0.24
<i>Rumex crispus</i>	456 ± 9	14.8 ± 0.73
<i>Porophyllum tagetoides</i>	516 ± 38	39.0 ± 3.32
<i>Melampodium perfoliatum</i>	626 ± 21	53.5 ± 2.70
<i>Portulaca oleraceae</i>	808 ± 14	61.2 ± 2.84

Por otro lado, se evaluó la capacidad antiproliferativa en células epiteliales de cáncer de mama, mediante la incorporación de timidina en presencia del extracto de verdolaga, demostrando tener el extracto de verdolaga una capacidad antiproliferativa significativa (Miranda, 2005). Sin embargo, cabe aclarar que aún no se han realizado los estudios correspondientes en los extractos acuosos de esta planta. No obstante, los resultados anteriores sugieren realizar estudios *in vivo* que fundamenten el efecto quimioprotector de los extractos de la verdolaga en un modelo de cáncer de colon.

2.4.5 Características de la verdolaga (*Portulaca oleraceae* L.)

La *Portulaca oleraceae*, “Verdolaga”, es originaria de la India y fue introducida a Europa y América, por lo que posee una gran distribución en regiones templadas y tropicales del mundo. La planta se distribuye en numerosos municipios de la parte baja del valle de México en altitudes de 2,250 a 2,650 msnm. La verdolaga crece tendida en el suelo como hierba, presenta tallos rojizos y jugosos. Las hojas son carnosas y rojizas con forma ovalada, sus flores tienen color amarillo con aspecto de estrellitas. Los frutos tienen forma de cápsula y semillas abundantes (Figura 12).

La verdolaga crece fácilmente en numerosos países de manera silvestre y se utiliza como alimento en varios países del mediterráneo, en China se la ha denominado como “el vegetal de la longevidad” (Xu y col., 2006). Estudios recientes indican que la verdolaga tiene mejores propiedades alimenticias al compararlo con la mayoría de los vegetales cultivados. Se ha identificado como una fuente rica en ácidos grasos omega-3 y antioxidantes (Simopoulos y Salem, 1986; Simopoulos y col., 1992). Cien gramos de hojas frescas aportan de 300 - 400 mg de ácido α -linolénico (LNA), 12.2 mg de α -tocoferol, 26.6 mg de ácido ascórbico, 1.9 mg de β -caroteno y 14.8 mg de glutatión (Simopoulos y col., 1992). Otros estudios reportan que algunas propiedades de la verdolaga ayudan a reducir las enfermedades de cáncer y del corazón, y que los flavonoides presentes en la verdolaga son los constituyentes biológicos activos que pueden ejercer un efecto benéfico para la salud (Chen y col., 2003). Los flavonoides identificados en la verdolaga son: kaempferol, apigenina, myricetina, quercitina y luteína (Xu y col., 2006).



Figura 12. Portulacaceae, *Portulaca oleraceae* L., “Verdolaga” (www.botanical-online.com).

En el estado de Querétaro, la verdolaga se encuentra distribuida en los municipios de Amealco, Colón, Cadereyta, El Marqués, Ezequiel Montes, Peñamiller y Tequisquiapan. En el municipio de El Marqués, así como en los municipios de Pedro Escobedo y Colón, se usa como alimento cuando está en estado tierno. Los brotes tiernos se consumen como verdura o en forma de guisos (Ramos y col., 2004).

Además de utilizarse ampliamente como alimento, a esta planta se le atribuyen algunos usos medicinales relacionados con problemas digestivos como infecciones intestinales, dolor en el estómago, estreñimiento, parasitosis, propiedades contra la diabetes, las várices e inflamaciones (Argueta y col., 1994). Diversos investigadores han reportado algunos efectos farmacológicos de la verdolaga que incluyen propiedades: antibacteriales (Zhan y col., 2002), analgésicas, anti-inflamatorias (Chan y col., 2000), relajante muscular (Parry y col., 1987; Parry y col., 1993) y procesos de cicatrización de heridas.

Los resultados obtenidos por el grupo de investigación sugieren que en base a los contenidos de fenoles y flavonoides totales, a la alta capacidad antioxidante y a la capacidad antiproliferativa, así como a los usos medicinales reportados en la literatura, resulta atractivo evaluar el efecto quimioprotector de los extractos de *Portulaca oleraceae* (verdolaga) en un modelo de cáncer de colon asociado a inflamación inducido con DMH y DSS.

III. JUSTIFICACIÓN

De manera tradicional en nuestro país se han utilizado diferentes plantas comestibles como parte importante de la dieta de la población. Así mismo, el estudio de algunas plantas ha permitido la identificación de diversos compuestos, como los fenoles y flavonoides, los cuales han demostrado ejercer un efecto protector o preventivo contra ciertos tipos de cáncer. De mayor interés resulta el hecho de que estos compuestos pueden modular el proceso carcinogénico a través de diferentes mecanismos.

En el estado de Querétaro se ingieren plantas propias de la región en la dieta, entre ellas la verdolaga (*Portulacaceae oleraceae*). Debido a su alto contenido en fenoles y flavonoides totales, a su alta capacidad antioxidante y antiproliferativa, se considera una fuente potencial importante para determinar su posible actividad quimioprotectora en un modelo de inflamación y cáncer de colon.

Se sugiere que en la medida que aumenten los conocimientos de los mecanismos de quimioprotección de ciertos compuestos presentes en las plantas, frutos y otros alimentos, se puede recomendar una ingesta alimentaria que contribuya a proporcionar mejor calidad de vida, disminuyendo sustancialmente el riesgo a padecer enfermedades crónico-degenerativas.

IV. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos y metanólicos de verdolaga tienen la capacidad de inducir enzimas de fase 2 y antioxidantes, en los órganos de rata, contribuyendo al efecto quimioprotector de la verdolaga en un modelo de cáncer-inflamación de colon.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

- Evaluar el efecto protector de los extractos acuoso y metanólico de la verdolaga (*Portulaca oleraceae*) en un modelo de inflamación y cáncer de colon inducido químicamente con dimetilhidrazina y dextrán sulfato de sodio en ratas cepa F-344.

5.2 Objetivos Específicos:

a) Determinar el contenido de fenoles y flavonoides en la verdolaga (*Portulaca oleracea*) cultivada en el municipio de Amazcala Querétaro.

b) Evaluar el efecto de los extractos acuoso y metanólico de la verdolaga a las dosis de 50, 100 y 200 mg/kg sobre la inducción de enzimas de fase 2 glutatión-S-transferasa (GST) y quinona reductasa (QR) en muestras de colon distal e hígado de ratas macho sanas.

c) Implementar y caracterizar el modelo de inflamación y cáncer de colon con DMH y DSS en ratas macho F344, mediante un estudio histopatológico del grado de displasia y la cuantificación de FCA en el colon de las ratas en estudio.

d) Evaluar el efecto protector del extracto de verdolaga con mayor potencia inductora de enzimas GST y QR, sobre el desarrollo del cáncer de colon asociado a inflamación inducido químicamente con la DMH y DSS.

e) Determinar la inducción de enzimas de fase 2 (GST y QR) y antioxidante (HO-1) en el colon distal e hígado de ratas tratadas con extracto de verdolaga en el modelo de inducción química con la DMH y DSS.

VI. METODOLOGÍA

6.1 MATERIAL

6.1.1 Compuestos químicos

La 1,2-dihidrocloruro de dimetilhidrazina (DMH) fue de la marca Fluka (Parque Industrial Toluca 2000, Edo. de México).

El dextrán sulfato de sodio (DSS) fue de la marca INC Biochemicals Inc. (Aurora, OH).

Los reactivos para la determinación de la enzima glutatión-S-transferasa; el clorodinitrobenzeno (CDNB) y el glutatión reducido (GSH) fueron marca Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MI). Para la quinona reductasa; la menadiona, el dicumarol, el tiazolil azul tetrazolium bromuro (MTT), el flavin adenina dinucleótido (FAD), la glucosa-6-fosfato (G6P), la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), β -nicotidamida adenina dinucleotido sal fosfato tetrasodium (NADP), el Tween 20 y la albúmina bovina, fueron adquiridos de la marca Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MI); el Tris-HCl fue de la marca J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México, México). Para la determinación de la enzima HO-1, la hemina fue marca Fluka (Parque Industrial Toluca 2000, Edo. de México), el β -nicotidamida adenina dinucleótido fosfato sal tetrasodio reducida (NADPH), la glucosa-6-fosfato (G6P), la glucosa-6-fosfato deshidrogenada (G6PDH) y el fenilmetanosulfonil fluoride (PMSF) fueron marca Sigma y el cloruro de magnesio marca J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México, México).

Los reactivos para la determinación de proteínas fueron por el método del ácido bicinónico (BCA) fueron de la marca Pierce (Rockford, IL). Las microplacas utilizadas fueron marca Corning.

Los solventes hexano, acetona y metanol para la extracción metanólica de la verdolaga fueron de la marca Fisher grado HPLC.

Los reactivos para la determinación de fenoles y flavonoides totales, Folin Ciocalteu, carbonato de sodio, ácido gálico, nitrato de sodio, cloruro de aluminio, hidróxido de sodio y catequina fueron de la marca Sigma.

Para el estudio histopatológico se empleó una solución amortiguadora de formaldehído al 10%, preparado con formol (37 %), fosfato monobásico de sodio y fosfato dibásico de sodio, alcohol etílico absoluto; estos reactivos fueron marca J.T.Baker (Xalostoc, Estado de México, México). La parafina para los cortes histológicos y el dicromato de potasio fueron de la marca Mallinckrodt Baker (Xalostoc, Estado de México, México).

Los reactivos para teñir las FCA fueron solución amortiguadora neutro de formalina al 10% y azul de metileno al 0.2 %.

6.1.2 Material biológico

Los extractos acuosos y metanólicos de la planta *Portulaca oleraceae* se prepararon a partir de verdolaga cultivada en el poblado de Amazcala, municipio del Marqués, Querétaro. Se adquirió en el mes de septiembre en la central de abastos de la ciudad de Querétaro y se encontró en estado tierno.

Para el estudio de carcinogénesis se emplearon ratas macho cepa F-344 de cinco semanas (80-90 g) de edad, las cuales fueron adquiridas del bioterio Rismart de México S.A. de CV. Los animales se aclimataron durante una semana con alimento y agua *ad libitum* y se mantuvieron ciclos de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad, con temperatura y humedad controladas.

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Preparación de los extractos acuosos y metanólicos

El material fue desecado en una estufa a 39 °C y posteriormente pulverizado manualmente. Para la preparación de los extractos se emplearon los métodos de extracción estandarizados en el laboratorio de Química de Nutracéuticos a cargo de la Dra. Mendoza Díaz. Para la obtención del extracto metanólico, se hizo una primera extracción hexano-acetona (1:1) en el Soxhlet, para extraer compuestos de mediana polaridad como la clorofila. Después se hicieron extracciones exhaustivas con metanol. Una vez obtenido el extracto a partir del material pulverizado, se evaporó al vacío en un rotoevaporador Büchi para finalmente obtener el extracto metanólico, el cuál fue almacenado en un vial a 4° C hasta su uso. Para la obtención del extracto acuoso, a la muestra de verdolaga pulverizada, se le agregó agua hirviendo y se filtró continuamente hasta obtener agua incolora. Posteriormente, el agua filtrada se eliminó a 47 ° C en un rotoevaporador Büchi, hasta evaporar prácticamente toda el agua. El concentrado que se obtuvo se congeló, se liofilizó y se almacenó en un vial a 4° C hasta su uso (Figura 13). A partir de los extractos anteriores, se determinó el contenido de fenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (Dewanto y col., 2002) y la cuantificación de flavonoides totales por el método descrito por Liu y colaboradores (2002).

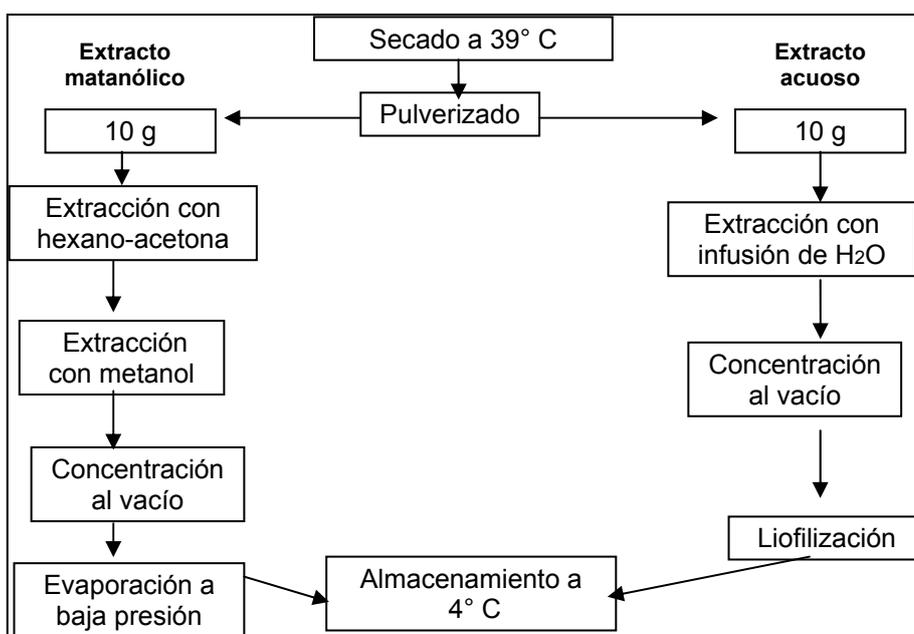


Figura 13. Diagrama de la elaboración de los extractos a partir de verdolaga.

6.2.2 Determinación de fenoles totales

Para la determinación del contenido de fenoles totales se utilizó ácido gálico como estándar, por lo que los resultados se reportaron como equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra. La curva estándar se realizó preparando mínimo 6 concentraciones diferentes de ácido gálico en el rango de 20 a 140 μl de una solución estándar de 0.1 mg/ml. El volumen fue completado a 500 μl con agua destilada. Posteriormente, se agregaron a cada tubo 250 μl de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N y finalmente 1250 μl de una solución de carbonato de sodio al 20 %, se dejaron reposar 2 horas y se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm.

Para determinar el contenido de fenoles totales de los extractos acuosos y metanólicos de verdolaga, se pesaron 25 mg de cada extracto y se disolvieron disuelto en 1 ml de metanol. Se tomaron 100 μl de esta solución, y se agregaron 900 μl de agua destilada (concentración final: 2.5 mg/ml). De esta última solución se tomaron 100 μl , se les agregaron 400 μl de agua destilada, 250 μl de reactivo de Folin Ciocalteu 1 N y finalmente 1250 μl de una solución de carbonato de sodio al 20 %; se procedió con las mismas condiciones que la curva estándar.

6.2.3 Determinación de flavonoides totales

Para la determinación del contenido de flavonoides totales de los extractos acuoso y metanólico de verdolaga, se realizó una curva estándar de (+) catequina y los resultados se reportaron como equivalentes de (+) catequina por gramo de extracto. Se prepararon 10 ml de una solución estándar de catequina a una concentración de 1 mg/ml de metanol. Debido a que el ensayo se adaptó a microplaca, para la curva se tomaron volúmenes en el intervalo de 2 a 14 μl de la solución de catequina para cada pozo, el volumen se completó a 52.5 μl con agua destilada. Se adicionaron a cada pozo 7.5 μl de solución de NaNO_2 al 5% y se dejaron incubar 6 minutos; posteriormente se adicionaron a cada pozo 15 μl de AlCl_3 al 10 % y se dejaron incubar 5 minutos.

Finalmente, se agregaron 50 µl de una solución de NaOH 1 M y la cantidad necesaria de agua destilada para obtener un volumen final de 250 µl. Las muestras se protegieron de la luz y se incubaron por 30 minutos. Las absorbancias se midieron a 510 nm en el lector de microplacas Tunable Versamax (Molecular Devices, CA, EUA) con el software SOFTmax®.

6.2.4 Tratamientos *in vivo*

El estudio se llevó a cabo en tres etapas experimentales, utilizando ratas macho F-344 de 5 semanas de edad (80 a 90 g). En el primer experimento se determinó el extracto de verdolaga (acuoso o metanólico) y la dosis (50, 100 o 200 mg/kg) para obtener la mayor inducción de enzimas de fase 2 (GST y QR) en el colon distal e hígado de ratas. Estas dosis de extractos fueron elegidas en base a la literatura, en donde se reporta que dosis de 40 y 200 mg/kg de peso corporal de extractos vegetales inhiben la inducción de carcinógenos en ratas (Rajeshkumar y Kuttan, 2000). En el segundo experimento se indujo el cáncer de colon de acuerdo al modelo reportado por Onose y colaboradores (2003) utilizando DMH y DSS en ratas F-344. La DMH se disolvió en solución fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 %) ajustando el pH a 7.1 y a temperatura ambiente a la dosis de 40 mg/kg de peso. El DSS se disolvió en 100 ml de agua (1%) y se preparó diariamente. En el tercer experimento se evaluó si el extracto seleccionado en el primer experimento, puede proteger en el modelo de cáncer de colon implementado en ratas macho F-344.

6.2.4.1 Experimento uno: elección de dosis y tipo de extracto de verdolaga

Para este experimento se utilizaron 32 ratas macho F-344 de 5 semanas de edad. Después de una semana de aclimatación, los animales fueron divididos en 8 grupos, cada grupo experimental tuvo 4 animales como se muestra en la figura 14.

El grupo 1 o control positivo recibió sulfurofano (SFN) vía intragástrica a una concentración de 500 µM/kg/día durante una semana.

El grupo 2 o control negativo recibió 3 administraciones de agua vía intragástrica durante una semana.

En los grupos 3 al 8, las ratas recibieron durante una semana 3 administraciones vía intragástrica del extracto acuoso o metanólico a las dosis de 50, 100 y 200 mg/kg. Durante el período experimental, todos los grupos recibieron agua y alimento *ad libitum*; su peso fue registrado semanalmente y los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

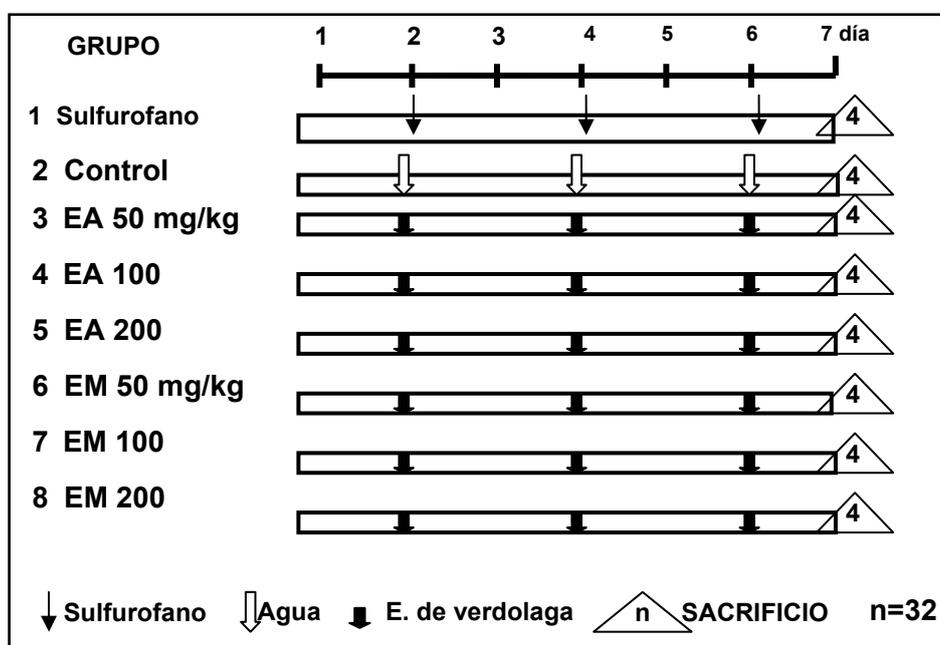


Figura 14. Diagrama de los grupos en el experimento uno: grupo 1 sulfurofano (SFN); grupo 2 control, grupo 3, 4 y 5 extracto acuoso (EA) de verdolaga a las dosis de 50, 100 y 200 mg/kg; grupos 6, 7 y 8 extracto metanólico (EM) de verdolaga a las dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg.

Una vez sacrificados, se les practicó una incisión vertical desde el tórax hasta el ano, separando la piel y el músculo para tener acceso a las vísceras abdominales. El intestino grueso fue extraído y abierto longitudinalmente, lavado con solución fisiológica estéril; el hígado también fue extraído y lavado con solución fisiológica estéril; ambos órganos fueron congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -70 °C para su posterior análisis.

6.2.4.2 Experimento dos: inducción de cáncer de colon con DMH y DSS

En este experimento se implementó el modelo de inflamación y cáncer de colon en un experimento de 15 semanas, utilizando 42 ratas que fueron divididas en 2 grupos, 12 animales para el grupo control negativo y 30 animales para el grupo con tratamiento (Figura 15).

Los animales del grupo control negativo recibieron 3 inyecciones vía subcutánea de solución fisiológica durante la primera semana del experimento (días 1, 3 y 5). Durante el periodo experimental los animales recibieron agua y alimento *ad libitum* y su peso fue registrado semanalmente.

Los animales del grupo con tratamiento recibieron 3 inyecciones vía subcutánea de DMH a la dosis de 40 mg/kg durante la primera semana del experimento (días 1, 3 y 5). En la segunda semana experimental los animales no recibieron tratamiento. En la tercera semana las ratas recibieron el DSS al 1% en el agua de beber. Durante el resto del periodo experimental, los animales recibieron agua y alimento *ad libitum* y su peso fue registrado semanalmente.

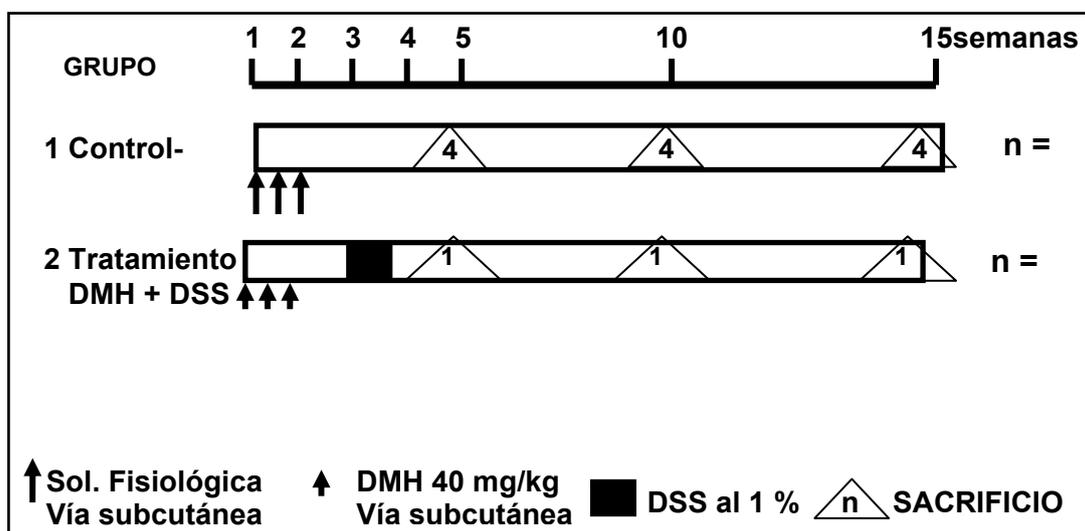


Figura 15. Diagrama de los grupos en el experimento dos: grupo 1 control – y grupo 2 con tratamiento de DMH y DSS.

Con la finalidad de caracterizar este modelo de cáncer de colon, 10 animales del grupo con tratamiento y 4 del grupo control fueron sacrificados bajo anestesia con éter dietílico a las 5, 10 y a las 15 semanas.

Posterior al sacrificio, se les practicó una incisión vertical desde el tórax hasta el ano, separando la piel y el músculo para tener acceso a las vísceras abdominales. Una vez identificado el intestino grueso, éste fue extraído y abierto longitudinalmente, lavado en una solución fisiológica estéril para posteriormente fijarse en un corcho y evaluar las lesiones. Finalmente, el colon fue almacenado en una solución de formaldehído al 4 % durante 12 horas para su posterior inmersión en parafina, microdissección y tinción con hematoxilina-eosina para su observación al microscopio y evaluación del grado de displasia, grado de inflamación y tasa de regeneración.

El hígado fue extraído y lavado con solución fisiológica estéril e inmediatamente congelado con nitrógeno líquido; todas las muestras fueron almacenadas a -70 °C, para su posterior análisis.

Habiendo implementado el modelo de inflamación y cáncer de colon y teniendo el resultado del extracto y la dosis con mayor respuesta enzimática, se realizó el tercer experimento del proyecto.

6.2.4.3 Experimento tres: efecto protector del extracto seleccionado en el modelo de cáncer de colon

Para este experimento se utilizaron 60 ratas macho F-344 de 5 semanas de edad, las cuales fueron divididas en 4 grupos como se muestra en la figura 16 y tratadas por un periodo experimental de 11 semanas.

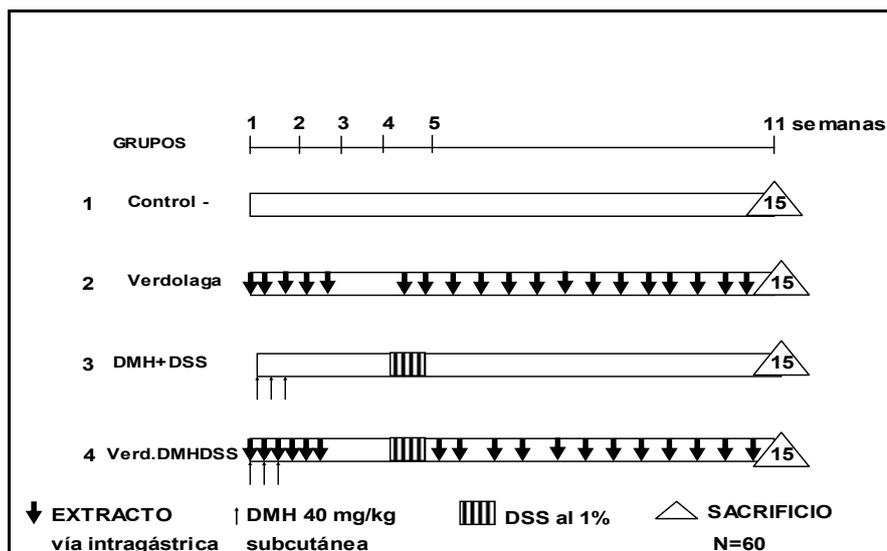


Figura 16. Diagrama de los grupos en el experimento tres: grupo 1 control; grupo 2 verdolaga; grupo 3 DMH/DSS; grupo 4 DMH/DSS/verdolaga.

El grupo 1 (control, n= 15) recibió 3 administraciones de agua vía intragástrica, durante la primera semana experimental (días 1, 3 y 5). En la segunda semana, los animales recibieron agua 24 horas antes de una inyección subcutánea de solución fisiológica (0.9% NaCl) descansando durante la tercera semana. El resto del periodo experimental que comprende de la semana 4 a la semana 11, los animales recibieron 3 administraciones de agua vía intragástrica cada semana. Durante el periodo experimental los animales recibieron agua y alimento *ad libitum*.

El grupo 2 (verdolaga, n=15) recibió 3 administraciones vía intragástrica del extracto de verdolaga durante la primera semana experimental (días 1, 3 y 5). En la segunda semana, los animales recibieron el extracto de verdolaga 24 horas antes de una inyección subcutánea de solución fisiológica (0.9% NaCl), descansando durante la tercera semana. El resto del periodo experimental, que comprende de la semana 4 a la semana 11, los animales recibieron 3 administraciones del extracto de verdolaga vía intragástrica cada semana. Durante el periodo experimental los animales recibieron agua y alimento *ad libitum*.

Las ratas del grupo 3 (DMH/DSS, n=15) recibieron 3 administraciones vía intragástrica de agua durante la primera semana experimental (días 1, 3 y 5).

En la segunda semana, los animales recibieron agua 24 horas antes de una inyección subcutánea de DMH (40 mg/kg) descansando la tercera semana. Durante la cuarta semana se les administró DSS al 1% disuelto en el agua de beber. El resto del periodo experimental que comprende de la semana 5 a la semana 11, los animales recibieron 3 administraciones de agua vía intragástrica los días 1, 3 y 5, así como agua y alimento *ad libitum*.

El grupo 4 (verdolaga/DMH/DSS, n=15) recibieron 3 administraciones vía intragástrica del extracto de verdolaga durante la primera semana experimental (días 1, 3 y 5). En la segunda semana, los animales recibieron el extracto de verdolaga (vía intragástrica) 24 horas antes de la inyección subcutánea de DMH (40 mg/kg) descansando la tercera semana. En la cuarta semana se les administró DSS al 1% disuelto en el agua de beber. El resto del periodo experimental que comprende de la semana 5 a la semana 11, los animales recibieron 3 administraciones del extracto de verdolaga vía intragástrica cada semana así como agua y alimento *ad libitum*.

Durante todo el período experimental, el peso de los animales fue registrado semanalmente. Los animales fueron sacrificados bajo anestesia con éter dietílico a la semana 11.

Una vez sacrificados, se les practicó una incisión vertical desde el tórax hasta el ano, separando la piel y el músculo para tener acceso a las vísceras abdominales. El intestino grueso fue extraído y abierto longitudinalmente, lavado con solución fisiológica estéril; el hígado también fue extraído y lavado con solución fisiológica estéril; ambos órganos fueron congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -70 °C para su posterior análisis.

El colon de 5 animales de cada grupo experimental fue fijado en una solución de formaldehído al 4 % durante 12 horas para su posterior inmersión en parafina, microdisección y tinción con hematoxilina-eosina para su observación al microscopio y evaluar el grado de displasia.

Así también el colon de otros 5 animales de cada grupo experimental fue fijado en una solución de formaldehído durante 12 horas para su posterior tinción con azul de metileno y observación al microscopio para evaluar FCA.

6.2.5 Preparación de las muestras

6.2.5.1 Fracción citosólica

Los tejidos fueron descongelados en hielo. Se pesaron 0.5 g de cada muestra de tejido y se colocaron en tubos cónicos con 2 ml de solución amortiguadora Tris-Sacarosa. Las muestras se homogenizaron en un politrón (Kinemática AG) y centrifugaron a 8,750 g durante 20 minutos a 4 °C en una centrífuga (Hettich). Una vez centrifugadas, se tomó el sobrenadante para ser centrifugado a 100,000 g durante 60 minutos a 4 ° C en una ultracentrífuga (Beckman Optima L-90K). El citosol se recuperó con una pipeta Pasteur, se alicuotó en tubos eppendorf de 1 ml y almacenó a - 70 ° C, para posteriormente ser utilizado para la determinación de la GST y la QR. Si se quiere tener un resultado confiable de actividad enzimática, el citosol no debió de ser descongelado más de 3 veces.

6.2.5.2 Fracción microsomal

Los tejidos fueron descongelados en hielo. Se pesó 0.5 g de cada muestra de tejido y se colocaron en tubos cónicos con 1.5 ml de solución amortiguadora de homogenizado y el hígado con un volumen de solución amortiguadora de homogenizado de 1 ml. Las muestras se homogenizaron en un politrón (Kinemática AG) y posteriormente se centrifugaron a 8,750 g durante 20 minutos a 4 °C en una centrífuga (Hettich), una vez centrifugadas se tomó el sobrenadante para ser ultracentrifugado a 100,000 g durante 60 minutos a 4°C en una ultracentrífuga (Beckman Optima L-90K). Para la determinación de la enzima HO-1 fue necesario obtener tanto la fracción microsomal (pastilla) como la fracción citosólica. La fracción citosólica debió ajustarse a un contenido de

proteína de 10 mg/ml, mientras que la pastilla a un contenido de proteína de entre 6 y 9 mg/ml, mediante diluciones. La pastilla se resuspendió en 400 µl del solución amortiguadora de homogenización por medio del sonicador y el vortex, manteniendo la temperatura de 4 ° C. Una vez resuspendida la muestra fue utilizada para la determinación de la actividad enzimática de la HO-1.

6.2.6 Determinaciones enzimáticas

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

La actividad total de la enzima GST se determinó mediante la conjugación del compuesto 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) con el glutatión reducido (GSH). La GST cataliza la formación de CDNB-GSH y este producto se monitoreó a una longitud de onda de 340 nm a 25°C durante 2 minutos de reacción (Habig y col., 1974). Este método determina la actividad enzimática de numerosas isoformas de la GST . La actividad de GST fue expresada en µmol/minuto/mg proteína.

Brevemente, las muestras de hígado y colon fueron diluidas (1:150 y 1:2, respectivamente) con solución amortiguadora de fosfatos 1 M y pH 6.5. A cada pozo de la microplaca, se le adicionaron 50 µl del citosol ya diluido por triplicado, posteriormente a cada pozo se le agregaron 100 µl de solución amortiguadora de GSH y finalmente 150 µl de solución amortiguadora de CDNB. Inmediatamente, se colocó la microplaca en el lector de microplacas Turnable Versamax conectado a una computadora externa con el software SOFTmax®, con un tiempo total de 2 minutos con intervalos de 20 seg. a 340 nm, incluyendo el blanco sin muestra citosólica.

La actividad específica de la enzima GST se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{nmol/min mg prot.} = \frac{\text{abs min 2} - \text{abs min 1}}{(0.0096) (\text{mg de proteína})}$$

donde:

abs min 2: es la absorbancia a 340 nm en el minuto 2

abs min 1: es la absorbancia a 340 nm en el minuto 1

mg proteína: son los mg de proteína en el citosol

0.0096: coeficiente de extinción de CDNB en $\text{mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$

6.2.6.2 Determinación de la actividad de la quinona reductasa (QR)

La determinación de la actividad de QR se basa en la reducción enzimática del colorante tetrazolium, dando como resultado un precipitado azul-café, el cual puede medirse a una longitud de onda de 610 nm (Prochaska y col., 1992). Para este ensayo se emplean menadiona y β -nicotidamida adenina dinucleótido sal fosfato tetrasodio (NADP) como sustratos.

Para evaluar la actividad enzimática, se prepararon diluciones dependiendo del órgano, con solución amortiguadora de fosfatos 1 M y pH 6.5. A cada pozo de la microplaca se le adicionaron 50 μl del citosol ya diluido por triplicado. A la solución de trabajo (FAD, NADP, G6P, G6PD y MTT) se adicionó la menadiona (8.6 mg/ml) disuelta en acetonitrilo. La reacción se detuvo a los 5 minutos adicionando 50 μl de solución amortiguadora de fosfatos 0.025 M a pH de 7.4, el cual contiene dicumarol disuelto en NaOH 1 N. La microplaca se colocó en el lector de microplacas Turnable Versamax con el software SOFTmax®, a una longitud de onda de 610 nm.

La actividad específica de la enzima QR se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

Coeficiente de extinción para MTT:

ϵ : 11,300 /M cm = 11.3/ mM cm

t: 5 minutos

A: es la absorbancia a 610 nm

mg proteína = mg de proteína en la muestra

$$\frac{\text{nmol}}{\text{mg} \times \text{min}} = \frac{\text{cambio en } A_{610} \text{ por minuto}}{\epsilon \times \text{mg proteína}}$$

Por lo tanto:

$$\frac{\text{nmol.}}{\text{min mg prot}} = \frac{A_{610}}{(0.1833) (\text{mg de proteína})}$$

6.2.6.3 Determinación de la actividad de la hemo-oxigenasa (HO-1)

El ensayo para la determinación de la HO -1 se basa en la medición de la cantidad de bilirrubina formada en una reacción enzimática de dos pasos (Toth y col., 2003). A cada pozo de la placa, se le adicionaron 100 µl de la fracción microsomal previamente diluída (diluido 1:60 para colon y 1:30 para hígado), 40 µl de citosol (diluido 1:20 para colon y 1:80 para hígado) y 160 µl de un sistema reductor (15 ml de solución amortiguadora de homogenizado, 100 µl de MgCl₂ 2mM, 100 µl NADPH 0.8mM, 100 µl glucosa 6-fosfato 0.8 mM, 28.8 unidades de G6PDH y 1 ml de hemina 2.5 mM). Posteriormente, la mezcla de reacción se incubó en oscuridad y con agitación a 37 °C durante 60 minutos. La microplaca se midió en el lector de microplacas Turnable Versamax con el software SOFTmax®, a 460 y 530 nm. La actividad de la HO-1 se expresó en nanomoles de bilirrubina por 60 min por miligramo de proteína.

La actividad de la enzima HO-1 se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{nmol/ 60 min mg prot.} = \frac{A1-A2}{(0.66) (\text{mg de proteína})}$$

donde:

A1: absorbancia a 460 nm

A2: absorbancia a 530 nm

0.66: es el coeficiente de extinción de la bilirrubina a los 60 minutos

mg proteína: mg de proteína en la muestra

6.2.6.4 Cuantificación de proteínas totales

El contenido de proteína se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), cuantificado con el kit de BCA (Pierce, Inc.), empleando albúmina bovina como estándar (1 mg/mL).

6.2.7 Análisis histológicos

6.2.7.1 Evaluación de fosas crípticas aberrantes (FCA) en el colon

Una vez extraído el colon de los animales, se enjuagó con solución fisiológica estéril y se fijó en una superficie plana con una solución de solución amortiguadora de formalina al 10 % durante 24 horas, para su posterior tinción con azul de metileno al 0.2 %. El número de FCA se contó al microscopio empleando la lámpara y con un aumento de 40x. Para este análisis, se contó con la participación de las Dras. Guadalupe García Alcocer y Laura Berumen Segura del laboratorio de Biología Celular Genética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

6.2.7.2 Evaluación del daño histopatológico

El colon se extrajo, se enjuagó con solución fisiológica estéril y posteriormente se tomaron muestras al azahar del colon distal que se fijó en una solución de formaldehído al 4 % durante 12 horas para su posterior inmersión en parafina, microdissección y tinción con hematoxilina-eosina (HIE). La observación se realizó en un microscopio Olympus PX40 con aumentos de 100x y 400x y la evaluación estuvo a cargo del Dr. Gallegos del departamento de Histopatología de la Unidad Multidisciplinaria de Laboratorios de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro. Para determinar el daño epitelial, se evaluaron los siguientes parámetros: inflamación y displasia. Para la displasia, la evaluación se hizo de acuerdo a la escala establecida por

Riddell y colaboradores (1983), en donde se clasifica la displasia como negativa y positiva (bajo grado, alto grado y carcinomas); para la inflamación se hizo de acuerdo a la escala establecida por Cooper y colaboradores (1993), dependiendo del daño evaluado.

6.2.8 Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como las medias \pm el error estándar (EE) o desviación estándar (DE). Para determinar las diferencias estadísticas en la ganancia de peso, las actividades enzimáticas, el número de nódulos linfáticos y de fosas cripticas aberrantes se aplicó el estadístico de ANOVA ($P < 0.05$), seguido de una comparación de medidas por los métodos de Dunnet o Tukey.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Contenido de fenoles y flavonoides en los extractos acuosos y metanólicos

Se evaluó el contenido de fenoles y flavonoides de los extractos acuosos y metanólicos de la verdolaga cultivada en el municipio de Amazcala, Querétaro. Los resultados obtenidos indican que el contenido de fenoles totales en el extracto acuoso y metanólico fue de 96.24 ± 3.84 y 176.72 ± 24.64 mg eq. ácido gálico/g de extracto respectivamente. El contenido de flavonoides totales en el extracto acuoso y metanólico fue de 11.57 ± 1.41 y 24.85 ± 1.91 mg eq. (+) catequina/g de extracto, respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 5. Contenido de fenoles y flavonoides totales en el extracto acuoso y metanólico de verdolaga cultivada.

Extracto	Fenoles mg eq. ácido gálico/g	Flavonoides mg eq. (+) catequina/g
Acuoso	96.24 ± 3.84	11.57 ± 1.41
Metanólico	176.72 ± 24.64	24.85 ± 1.91

Los resultados son la media de 2 experimentos independientes por triplicado \pm la DE.

Estudios previos en los cuales se determinó el contenido de fenoles y flavonoides totales en extractos metanólicos de verdolaga silvestre del municipio de Amealco, Querétaro, reportaron que el contenido de fenoles totales fue de 808 ± 14 mg de ácido gálico por gramo de extracto metanólico, mientras que el contenido de flavonoides fue de 61.2 ± 2.84 mg equivalentes de (+) catequina/ gramo de extracto (Miranda, 2005). El contenido de fenoles y flavonoides del extracto metanólico de verdolaga cultivada es menor que el reportado para verdolaga silvestre. Sin embargo Kirakosyan y colaboradores (2004) sometieron a dos especies de tejocotes (*Crataegus laevigata* y *C. monogyna*) a diversas condiciones ambientales de estrés, observando que el estrés por frío y por déficit de agua, o la combinación de ambos, proporcionan un incremento significativo en los niveles de polifenoles en las hojas de ambas

especies. Una posible explicación por la cual los extractos de verdolaga silvestre tienen un mayor contenido de fenoles y flavonoides en comparación con los extractos de verdolaga cultivada, puede ser debido a las condiciones de estrés a las que estuvieron sometidas las plantas durante su crecimiento, factores que se encuentran controlados para las especies domesticadas y cultivadas.

Se ha demostrado que los fenoles y flavonoides presentes en algunos alimentos, principalmente de origen vegetal, tienen algunos efectos biológicos como por ejemplo, el atrapamiento de radicales libres, la modulación de la actividad enzimática, la inhibición en la proliferación celular, así como cierto potencial al ser usados como agentes antibióticos, antialérgicos, antidiarreicos, anti-ulcerativos y anti-inflamatorios (Ross y Kasum, 2002). Por lo que en este proyecto resultó de gran interés conocer el contenido de fenoles y flavonoides de los extractos acuosos y metanólicos de la verdolaga cultivada, para posteriormente relacionar un posible efecto benéfico en la modulación de la inflamación y el cáncer de colon inducido químicamente en animales.

Primera Etapa:

7.2 Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de la verdolaga en la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) y quinona reductasa (QR) en hígado y colon distal de ratas F344

En la primera etapa de este proyecto, se evaluó la capacidad de los extractos de verdolaga para inducir las enzimas GST y QR, tanto en el hígado como en el colon distal de ratas F344, a las cuales se les administraron los extractos acuosos o metanólicos a las dosis de 50, 100 y 200 mg/kg de peso corporal vía intragástrica, en un total de 3 administraciones en un periodo de 7 días. Al final del período experimental, se extrajo el hígado y el colon para determinar la actividad enzimática en la fracción citosólica de estos órganos según los protocolos anteriormente citados.

De manera general se observó que la inducción de estas enzimas de fase 2 por los extractos vegetales varía dependiendo del tipo de extracto y de la dosis empleada. Los niveles basales de GST muestran que hay una mayor actividad de esta enzima en el hígado al ser comparado con el colon. Similarmente, Munday y Munday (2004a) observaron que la enzima GST tiene una mayor actividad en hígado que en colon. En cuanto a la inducción enzimática, la GST también obtuvo una mayor respuesta con ambos extractos en el hígado, mientras que en colon únicamente con el extracto acuoso (Figura 17). Estos resultados coinciden con los reportados por Gutiérrez (2006), en donde sugiere que los extractos metanólicos podrían ser evaluados a dosis más bajas para obtener un mejor resultado en colon.

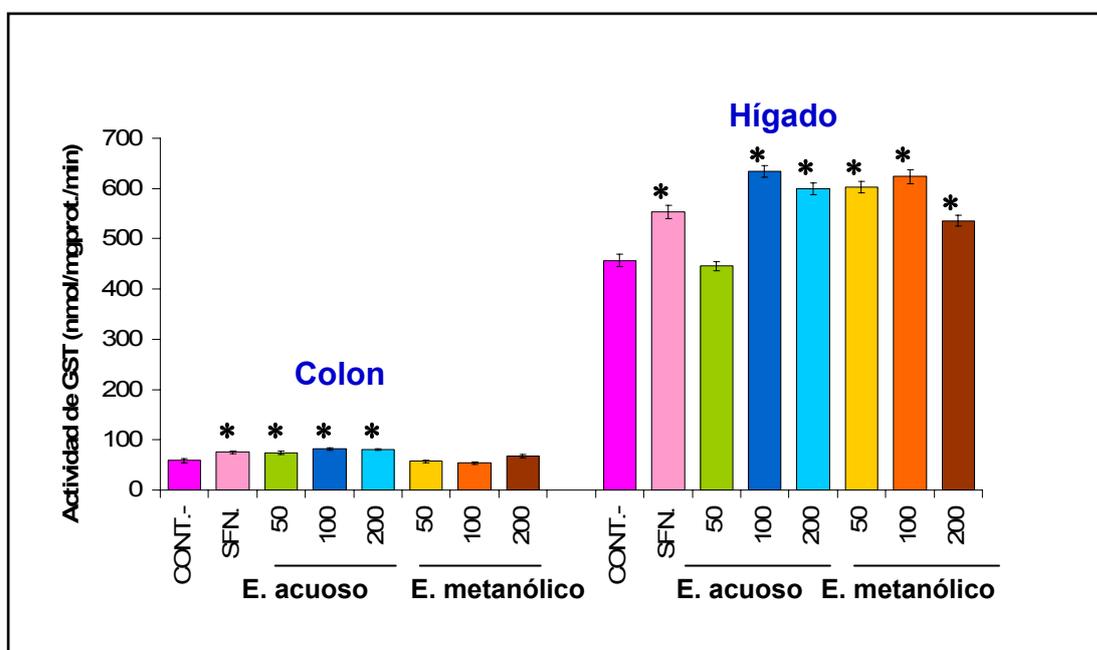


Figura 17. Actividad de la enzima GST en colon distal e hígado de ratas tratadas con los extractos acuosos y metanólicos a las dosis de 50, 100 y 200 mg/kg de peso corporal vía intragástrica. SFN dosis 500 μ mol/kg peso corporal vía intragástrica.

* Diferencia estadística comparado con el control por la prueba de Dunnett ($p < 0.05$). Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado \pm el EE.

En el presente trabajo se utilizó al SFN (500 μ mol/kg) como control positivo para confirmar que el sistema de enzimas de fase 2 (medido como la actividad de la enzima GST) se eleva en respuesta a agentes inductores

(Munday y Munday, 2004b). Los resultados obtenidos en ambos órganos con SFN demuestran la respuesta inductora del sistema (Figura 17).

Las ratas tratadas con el extracto acuoso de verdolaga a dosis de 100 mg/kg mostraron la mayor inducción significativa (39 %) de la enzima GST con respecto al control negativo, tanto en el hígado como en el colon. Estos resultados confirman que la inducción de la GST (*Gsta1/2*) por diversos fitoquímicos es muy similar en los diferentes tipos de órgano y depende principalmente del factor de transcripción Nrf2 (McMahon y col., 2001). Así mismo, los niveles de inducción pueden atribuirse a que con este extracto y a esta dosis, la concentración de ciertos flavonoides, entre otros compuestos, presentes en la verdolaga pueden activar las cascadas de señalización de las MAP cinasas involucradas en la activación del complejo Nrf2/Keap1 y su unión a elementos de respuesta a antioxidantes o electrófilos (ARE/EpRE), que se encuentran localizados en la región promotora de los genes que codifican para enzimas de fase 2, como la GST. Además, existen reportes en donde se demuestra que algunos compuestos presentes en vegetales como los isotiocianatos, los alil sulfuros, el EGCG y el SFN estimulan las cascadas de señalización de las MAPKs, fosforilando Nrf2 para su disociación de Keap1 (Chen y col. 2003, Motohashi y col., 2002). Así también, Surh (2003) reporta a los polifenoles, el SFN, la curcumina, el ácido éster cafeico y los isotiocianatos como inductores de enzimas de fase 2 a través del complejo Keap1/Nrf2.

Cabe resaltar que en hígado, la actividad de GST a la dosis de 100 mg/kg es estadísticamente mayor comparada con la dosis 200 mg/kg para ambos extractos. Lo anterior sugiere que a la dosis de 200 mg/kg ambos extractos contienen compuestos con un mecanismo de activación diferente sobre Nrf2/Keap1, o que estos compuestos activen rutas alternas de las MAPK que regulen negativamente el complejo (p38) (Huang y col., 2000), o bien que se activen factores de transcripción que dimericen con Nrf2 y regulen negativamente la transcripción de genes de enzimas de fase 2, como Fra y Fos (Venugopal y Jaiswall, 1996) o bien Bach1 (Dhakshinamoorthy y col., 2005) en presencia de inductores.

Para fines comparativos, los datos de la actividad enzimática de GST en el hígado y el colon distal se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Actividad de la enzima glutatión-S-transferasa (GST) en colon distal e hígado de ratas tratadas con extractos acuoso (EA) y metanólico (EM) de verdolaga (50, 100 y 200 mg/kg).

Tratamiento (n = 4)	Colon distal Glutatión-S-transferasa (nmol/mg de proteína x min)	Hígado Glutatión-S-transferasa (nmol/mg de proteína x min)
Control Negativo	59 ± 4	457 ± 12
Sulfurofano 500 µmol/kg	75 ± 2 *	554 ± 13 *
EA		
50 mg/kg	74 ± 3 *	446 ± 9
100 mg/kg	82 ± 3 *	635 ± 12 *
200 mg/kg	80 ± 2 *	599 ± 11 *
EM		
50 mg/kg	57 ± 3	602 ± 12 *
100 mg/kg	82 ± 3 *	624 ± 14 *
200 mg/kg	68 ± 3	536 ± 10 *

* Diferencia estadística comparado con el control por la prueba de Dunnett ($p < 0.05$). Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado ± el EE.

En cuanto a la actividad de la enzima QR, se observa que los niveles basales de esta enzima son similares tanto en el colon como en el hígado. Estos resultados también coinciden con los reportados por Munday y Munday (2004a), entre otros autores, en donde se muestra que los niveles basales de cada enzima varían dependiendo del órgano, y de manera similar observaron que la enzima QR tiene una actividad similar en hígado y colon de rata. Por otro lado, se muestra que la administración intragástrica de los extractos acuosos y metanólicos de la verdolaga afecta negativamente la actividad enzimática de la QR, tanto en el hígado como en el colon a ciertas dosis (Figura 18).

En hígado, se observó que las ratas tratadas con el extracto acuoso a la dosis de 100 mg/kg de peso corporal mostraron la mayor inducción significativa

(46 %) de la enzima QR con respecto al control negativo; mientras que con el extracto metanólico la mayor inducción se obtiene a la dosis de 200 mg/kg de extracto. Lo anterior sugiere que algún o algunos compuestos de estos extractos pueden ser inductores directos del complejo Keap1/Nrf2, permitiendo su disociación como se explica anteriormente. En base a la dosis-respuesta en hígado, es probable que el extracto metanólico pueda incrementar aún más la inducción de la enzima QR al aumentar la dosis del extracto metanólico.

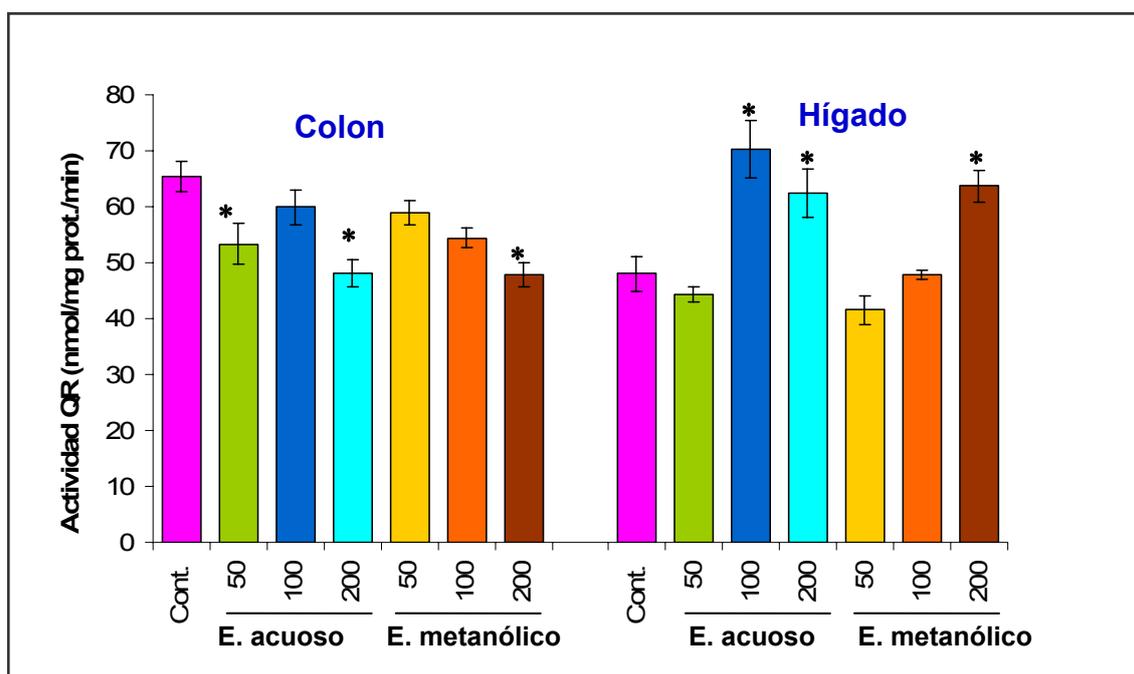


Figura 18. Actividad de la enzima QR en colon distal e hígado de ratas tratadas con extractos acuosos y metanólicos a las dosis de 50, 100 y 200 mg/kg.

* Diferencia estadística comparado con el control por la prueba de Dunnett ($p < 0.05$). Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado \pm el EE.

En el colon, aunque la actividad de QR no aumenta con ningún extracto a ninguna dosis, la menor disminución en la actividad de esta enzima (10 % menos) con respecto al control negativo se obtiene con el extracto acuoso a la dosis de 100 mg/kg, siendo esta disminución no estadísticamente significativa. Se observa que con otras dosis, sí hay una disminución significativa de la actividad enzimática con respecto al control negativo. En general, la respuesta de esta enzima en colon se ve reprimida con ambos extractos independientemente de la dosis empleada.

Una posible explicación a esta respuesta inhibitoria 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 QR en este órgano. En 1996, Venugopal y Jaiswal 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, inhibiendo de esta manera la expresión de algunos genes. Así mismo, Dhakshinamoorthy y colaboradores (2005) reportaron la competencia entre Bach1 (factor de transcripción que dimeriza con las proteínas small Maf) y Nrf2 por los ARE presentes en la región promotora de enzimas de fase 2, en respuesta al compuesto fenólico *tert*-butil hidroquinona (tBHQ) en células transformadas de hígado de rata HepG2. Así mismo, en este extracto pueden estar presentes compuestos que activen rutas alternas de MAPK, como p38 que regule negativamente la actividad de ARE (Huang y col., 2000).

En general, estos resultados sugieren la presencia de mecanismos o factores que regulan negativamente las enzimas de fase 2 y que pudieran estar presentes en nuestro estudio. Por lo que es necesario llevar a cabo estudios moleculares donde se determine la expresión de genes de fase 2 o enzimas antioxidantes bajo las condiciones del presente estudio, así como el empleo de inhibidores específicos para las MAPKs involucradas en la regulación negativa del complejo Keap1/Nrf2.

Para fines comparativos, los datos de actividad enzimática en el hígado y el colon distal se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Actividad de la enzima quinona reductasa (QR) en colon distal e hígado de ratas tratadas con extractos acuoso (EA) y metanólico (EM) de verdolaga (50, 100 y 200 mg/kg).

Tratamiento n = 4	Colon distal Quinona Reductasa (nmol/mg de proteína x min)	Hígado Quinona Reductasa (nmol/mg de proteína x min)
Control Negativo	65 ± 3	48 ± 3
EA		
50 mg/kg	53 ± 4	44 ± 1
100 mg/kg	60 ± 3 *	70 ± 5 *
200 mg/kg	48 ± 2	63 ± 4 *
EM		
50 mg/kg	59 ± 2 *	42 ± 3
100 mg/kg	54 ± 2 *	48 ± 1
200 mg/kg	48 ± 2	64 ± 3 *

* Diferencia estadística comparado con el control por la prueba de Dunnett ($p < 0.05$). Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado ± el EE.

Segunda Etapa

7.3 Ganancia de peso en ratas tratadas con DMH/DSS

En la segunda etapa del experimento se implementó el modelo de inducción de cáncer de colon con DMH y DSS en ratas F344. Todos los animales sobrevivieron a este experimento y su peso fue registrado semanalmente (Figura 19). El peso promedio inicial de las ratas control y del grupo tratado con DMH/DSS fue de 92.2 ± 9.5 y 102 ± 11.6 g, respectivamente.

El peso promedio al final de las 15 semanas experimentales fue de 304 ± 42 y 292 ± 32 g para los grupos control y tratado, respectivamente. A este respecto, las ratas que recibieron la DMH/DSS tuvieron una menor ganancia de peso durante el periodo experimental, comparadas con el grupo control, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa ($P = 0.578$).

En el 2005, Onose y colaboradores reportaron en un estudio con ratas que recibieron el mismo tratamiento (DMH/DSS), el peso fue evaluado en las

semanas 10 y 26, no encontrando diferencias significativas en el peso de los animales tratados comparados con el grupo control. Estos resultados demuestran que la DMH y el DSS a las dosis empleadas para inducir inflamación-cáncer de colon no son letales, ni tienen efecto en el desarrollo de los animales, lo que sugiere que actúan directamente en el colon, provocando inicialmente inflamación y en etapas tardías cáncer. Sin embargo, a la edad a la que fueron sacrificadas las ratas, todavía no se presentaron carcinomas.

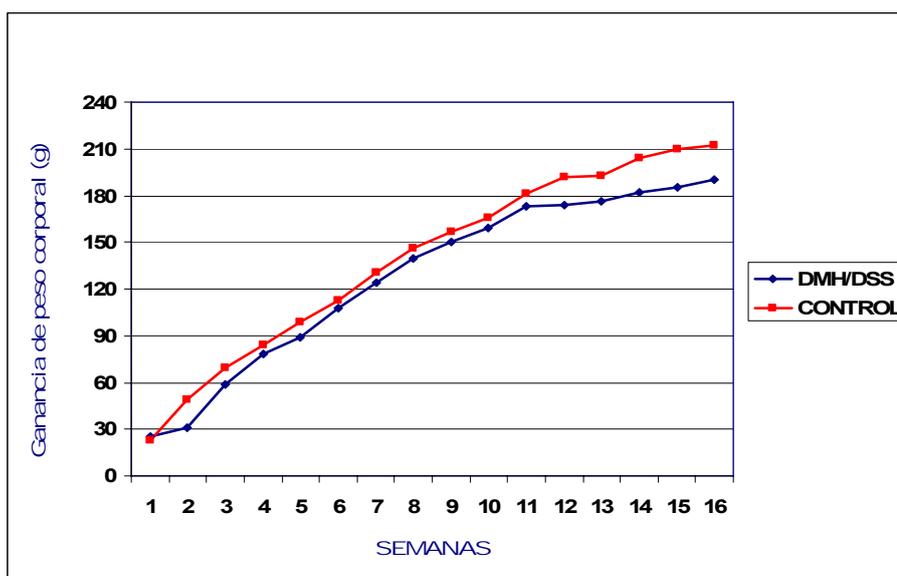


Figura 19. Ganancia de peso de ratas F344 tratadas con DMH/DSS. No hay diferencia estadística significativa entre ambos grupos ($P = 0.58$).

7.4 Evaluación macroscópica del colon en ratas tratadas con DMH/DSS

Para la caracterización del modelo de inflamación-cáncer de colon, los animales se sacrificaron a las 5, 10 y 15 semanas y se les extrajo el colon para evaluarlo tanto macroscópicamente como microscópicamente. La figura 20 muestra el resultado de los nódulos linfoides por rata, observándose un incremento de nódulos linfoides en el colon de las ratas control conforme aumenta la edad. Fenoglio-Preiser y colaboradores (1989) reportan un incremento de células linfoides acelerado después del nacimiento, por lo que se considera parte de la morfología de colon encontrar un aumento en el número de células con respecto al incremento en la edad de los animales. Así mismo, en las ratas tratadas con DMH/DSS se observó un aumento significativo en el número de

nódulos linfoides en el colon a la semana 10, comparado con el grupo control a esta misma edad, así como con respecto a los animales con el mismo tratamiento a las 5 semanas. Este incremento pudiera indicar una respuesta citotóxica por efecto del DSS utilizado para la inducción de la inflamación que posteriormente conlleva a cáncer.

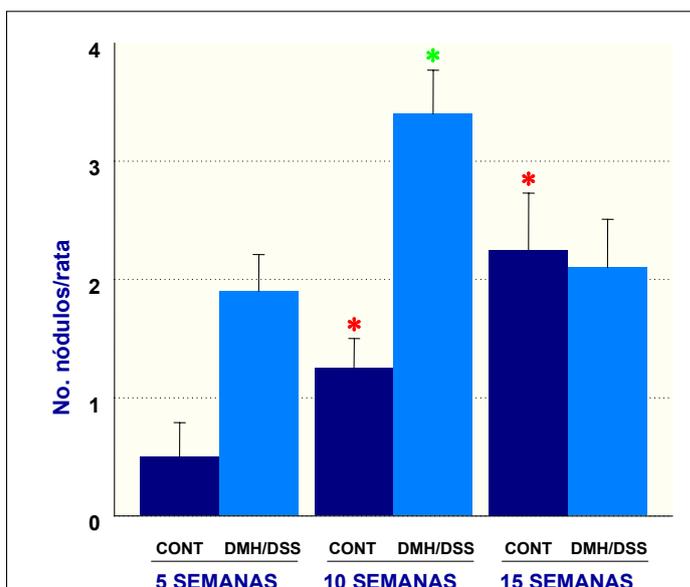


Figura 20. Efecto del tratamiento con DMH/DSS en el número de nódulos linfoides en el colon de ratas F344. Los animales fueron tratados con DMH (40 mg/kg p.s., 3 dosis) y DSS (1% en el agua de beber) y sacrificados a las 5, 10 y 15 semanas de tratamiento. *P < 0.05, comparado con control 5 semanas. *P < 0.05, comparado con DMH/DSS 5 semanas.

Se ha observado que durante períodos de infecciones entéricas, hay un incremento en el número de células linfoides como respuesta a la infección (Fenoglio-Preiser y col., 1989). Sin embargo, la observación macroscópica del colon de las ratas tratadas, a las diferentes semanas no parece ser un indicador confiable para este modelo, ya que a las 5, 10 y 15 semanas experimentales, se observaron nódulos linfoides que pueden ser originados por diversos factores, como la propia edad de los animales, o como una respuesta directa al tratamiento con DSS. Así también, se observaron lesiones que se denominan placas, las cuales generalmente son precursoras de carcinomas. Sin embargo, macroscópicamente no es posible precisar el tipo de lesión que desarrollarán,

por lo que se pueden confundir con los nódulos linfoides o con las fosas crípticas aberrantes (FCA).

7.5 Evaluación microscópica del colon en ratas tratadas con DMH/DSS

La evaluación de los cortes fue realizada en un microscopio Olympus PX40 con aumentos de 100x y 400x y éstos fueron previamente teñidos con hematoxilina-eosina (HIE) y finalmente evaluados por el Dr. Gallegos a cargo del Laboratorio de Histopatología de la Unidad Multidisciplinaria de Laboratorios de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

El grado de inflamación se realizó de acuerdo al criterio morfológico descrito por Cooper y colaboradores (1993) (Figura 4).

De manera general se observa que, independientemente de la edad y del tratamiento, el 100 % de los animales presentó inflamación (Cuadro 8). Esta inflamación se presentó con o sin displasia adicional en el colon de las ratas.

Cuadro 8. Incidencia y grado de inflamación del colon de ratas F344 a las 5, 10 y 15 semanas de tratamiento DMH (40 mg/kg) y DSS (1 %).

Tratamiento (no. de ratas)	Total	Incidencia de inflamación (%)		
		Grado		
		1	2	3
5 semanas				
Control (4)	100	50	50	0
DSS/DMH (10)	100	10	30	60
10 semanas				
Control (4)	100	75	25	0
DSS/DMH (10)	100	0	30	70
15 semanas				
Control (4)	100	50	50	0
DSS/DMH (10)	100	0	20	80

En los grupos control, la inflamación fue de grado 1 y 2 (Figura 21 y 22), en donde de acuerdo al criterio de Copper y colaboradores (1993), el grado 1 corresponde a un acortamiento o pérdida de 1/3 parte de la parte basal de la cripta, así como una ligera infiltración de neutrófilos, linfocitos y células de plasma en la mucosa; mientras que el grado 2 corresponde a una pérdida de 2/3 partes de la cripta con infiltración moderada en la mucosa.

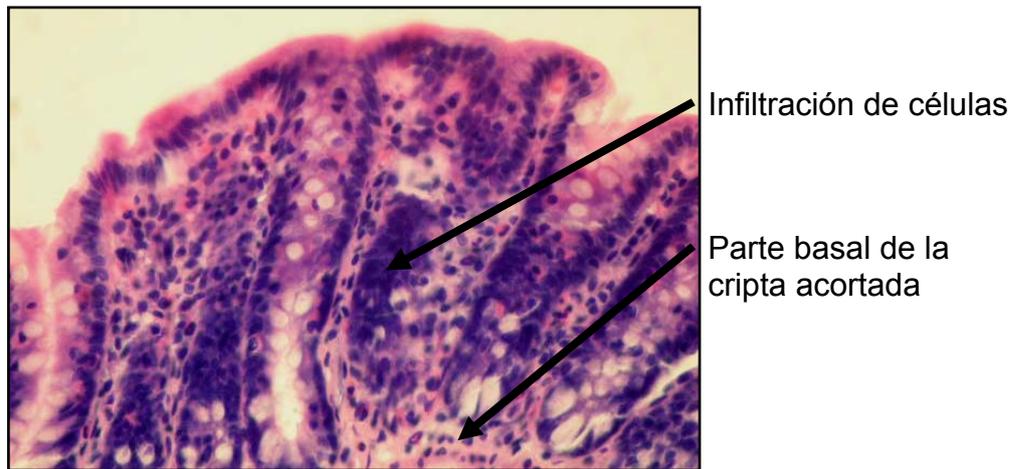


Figura 21. Corte de colon de rata control, tinción con HIE. 400x. En la imagen observada al microscopio se aprecia inflamación de grado 1, acortamiento o pérdida de 1/3 parte de la parte basal de la cripta, así como ligera infiltración de linfocitos y células de plasma en la lamina propia.

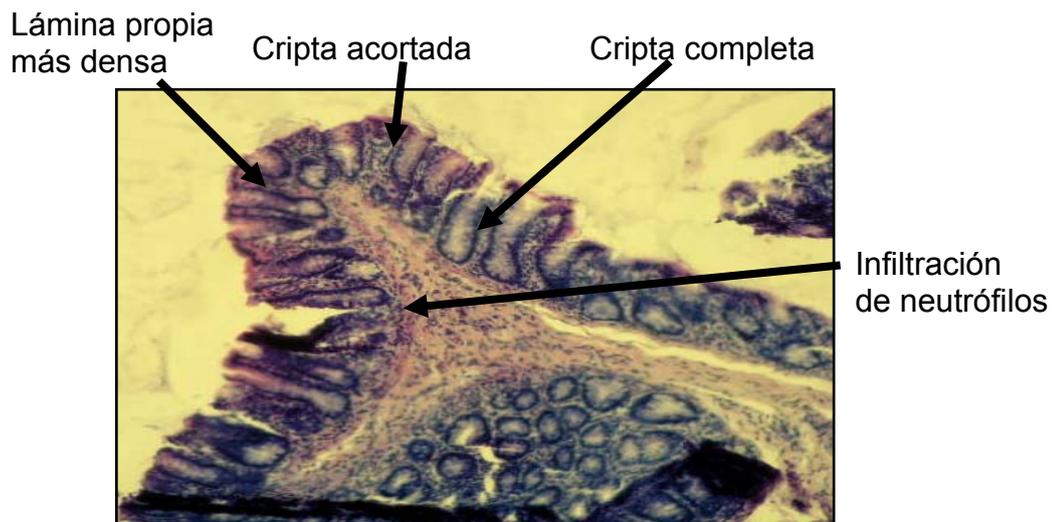


Figura 22. Corte de colon de rata control, tinción con HIE. 100x. En la imagen observada al microscopio se aprecia inflamación de grado 2, pérdida de 2/3 partes de la cripta con infiltración moderada en la mucosa, así como aumento en la densidad de la lámina propia.

Aunque no existe literatura al respecto, es posible distinguir histopatológicamente diferencias en el grado de inflamación del colon de ratas y de humanos. A este respecto, el análisis histopatológico indica que el colon de ratas se encuentra “normalmente” inflamado; mientras que en el colon de humanos, el grado de inflamación es menor y ésta se presenta cuando existe una patología en el mismo.

En las ratas tratadas con DMH/DSS se observó que hubo un aumento en el grado de inflamación al compararlas con los controles y, además, una tendencia a incrementarse conforme aumenta la edad de los animales. El grado de inflamación fue de grado 2 y 3 para los grupos DMH/DSS a las diferentes edades evaluadas (Figura 23 y 24). Probablemente, este incremento en el grado de inflamación de los animales que recibieron DSS/DMH conforme aumenta la edad, se atribuye a una falta de regeneración de la mucosa del colon y un incremento del daño debido a la presencia de mutaciones en el DNA de las células de la mucosa por el tratamiento. Sin embargo, estos resultados difieren a los reportados por Suzuki y colaboradores (2004), quienes observaron un mayor grado de inflamación en la parte media y distal del colon de ratones ICR tratados con AOM (metabolito de la DMH, 10 mg/kg) y DSS (2%) en la semana 2, y posteriormente el grado de inflamación fue disminuyendo a la largo del estudio. Los autores atribuyen este incremento en el grado de inflamación en la semana 2 a la reciente exposición del colon al DSS, afectando principalmente la parte media y distal del colon, sin afectar la parte proximal del colon. Por el contrario, en el presente experimento la inflamación fue incrementando con respecto al tiempo. Esto puede atribuirse a que en cada uno de los experimentos se utilizaron carcinógenos diferentes a dosis diferentes (AOM vs. DMH), dosis diferentes de DSS (2% vs. 1%), entre otros factores. A este respecto, Ross (1982) reportó que la presencia de adenocarcinomas colorectales inducidos con DMH en ratones, frecuentemente invade la submucosa y la capa muscular; sin embargo, la inducción con AOM y metilazoximetanol no presenta el mismo efecto biológico e histológico.

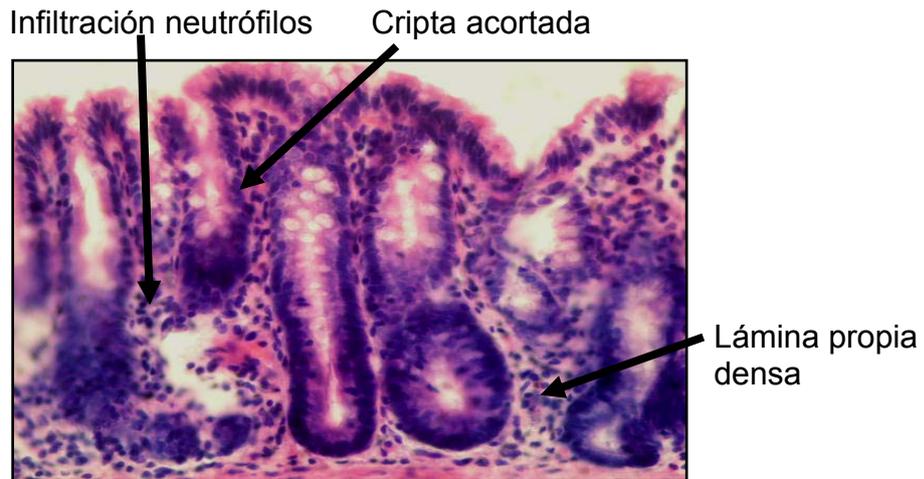


Figura 23. Corte de colon de ratas con tratamiento DMH (40 mg/kg) y DSS (1%), con tinción HIE. 400x. En la imagen observada al microscopio se aprecia inflamación de grado 2, pérdida de 2/3 partes de la cripta con infiltración moderada en la mucosa.

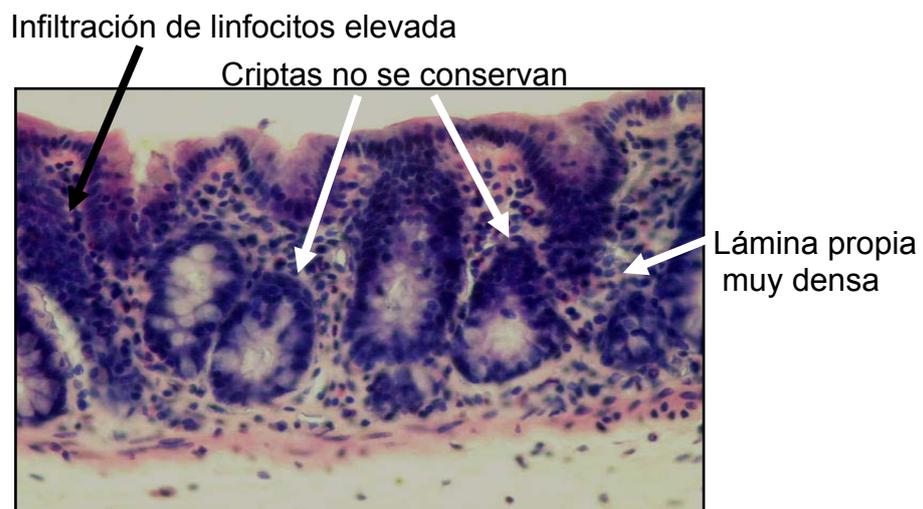


Figura 24. Corte de colon de ratas con tratamiento DMH (40 mg/kg) y DSS (1%), tinción con HIE. 400x. En la imagen observada al microscopio se aprecia inflamación de grado 3, pérdida entera de la cripta, con infiltración celular severa, pero se mantiene la superficie epitelial.

El grado de displasia fue realizado de acuerdo al criterio morfológico de Riddell y colaboradores (1983) (Cuadro 2) como se mencionó anteriormente y esta escala se adaptó por conveniencia de un grupo de patólogos eliminando el grado de indefinida. Se observó que las ratas del grupo control presentaron una incidencia del 25 % a las 5, 10 y 15 semanas de experimentación. Además, en estos grupos control el 100 % de la displasia fue de grado bajo (Cuadro 9).

Cuadro 9. Incidencia de displasia en el colon de ratas F344 a las 5, 10 y 15 semanas de tratamiento DMH (40 mg/kg) y DSS (1 %).

Tratamiento (no. de ratas)	Incidencia de displasia (%)				
	negativa	Total	positiva		
			bajo	alto	carcinoma
5 semanas					
Control (4)	75	25	100	-	-
DMH/DSS (10)	30	70	62.5	37.5	-
10 semanas					
Control (4)	75	25	100	-	-
DMH/DSS (10)	50	50	100	-	-
15 semanas					
Control (4)	75	25	100	-	-
DMH/DSS (10)	30	70	86	-	14

En los cortes del colon de ratas control de 5, 10 y 15 semanas que presentan displasia positiva de grado 1, se observa que la arquitectura de la cripta tiende a preservarse con cierto grado de distorsión, particularmente en la base de la cripta, aunque esta estratificación no alcanza el lumen de la cripta; el núcleo se agrupa y se ve hiper cromado, hay mitosis presente en la parte superior de la cripta (Figura 25).

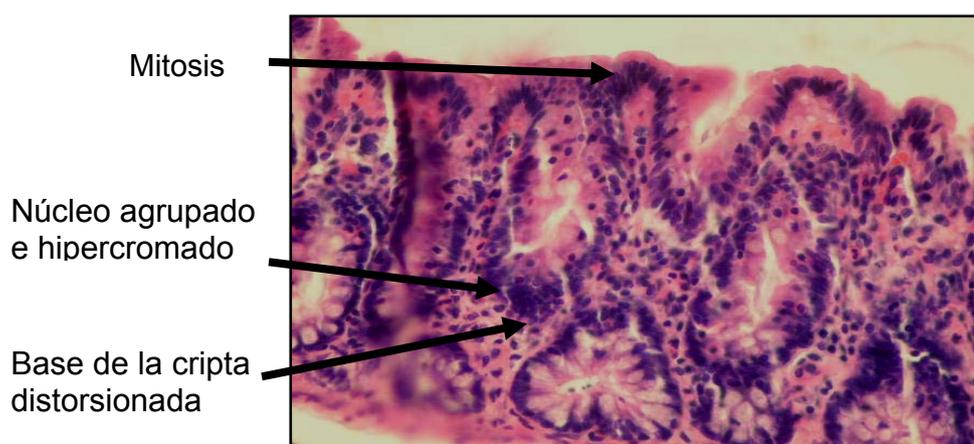


Figura 25. Corte de colon de rata control de 10 semanas, tinción con HIE. 400x. En la imagen observada al microscopio se aprecian displasia positiva de grado 1; resultados similares se obtuvieron a las 5 y 15 semanas.

Los grupos tratados con DMH/DSS a las diferentes edades tuvieron una mayor incidencia de displasia al compararlos con sus controles respectivos. Los animales tratados con DMH/DSS por 5 semanas presentaron 70 % de incidencia de displasia (Cuadro 9). Dentro de este porcentaje, el 62.5 % fue de bajo grado y el 37.5 % fue de alto grado (Figura 26). A las 10 semanas se reportó una menor incidencia de displasia (50 %) en comparación con las 5 semanas (70 %); también se reportó que a las 10 semanas el 100 % de los animales presentó displasia positiva de grado bajo (Figura 27). A las 15 semanas hubo una incidencia de displasia del 70 % de los animales, dentro de los cuales el 86 % presentó displasia de bajo grado y un 14 % displasia de alto grado (Figura 28).

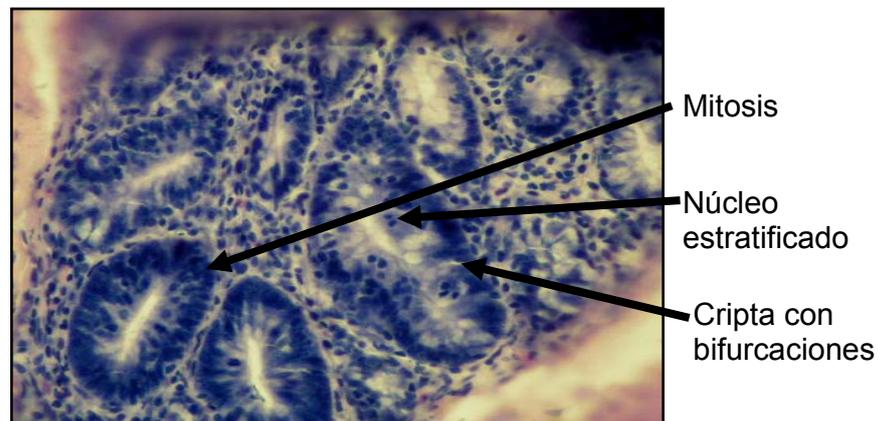


Figura 26. Corte de colon de rata con tratamiento DMH (40 mg/kg) y DSS (1 %) a las 5 semanas, tinción con HIE. 400x. En la imagen observada al microscopio se aprecian displasia positiva grado alto.

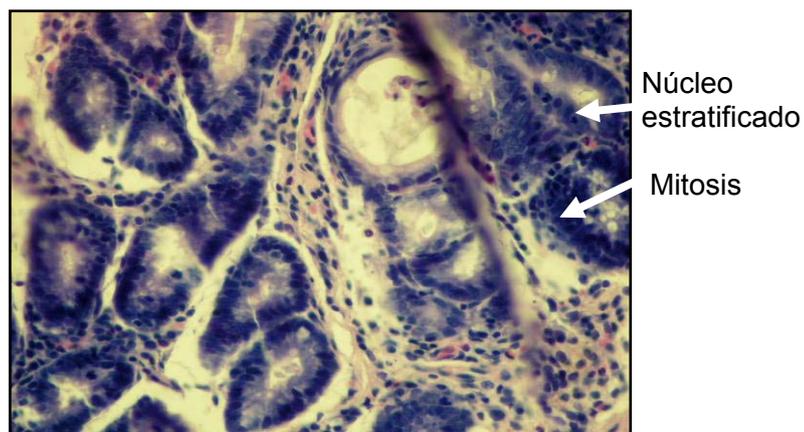


Figura 27. Corte de colon de rata con tratamiento DMH (40 mg/kg) y DSS (1%) a las 10 semanas, tinción con HIE. 400x. En la imagen observada al microscopio se aprecian displasia positiva de grado bajo.

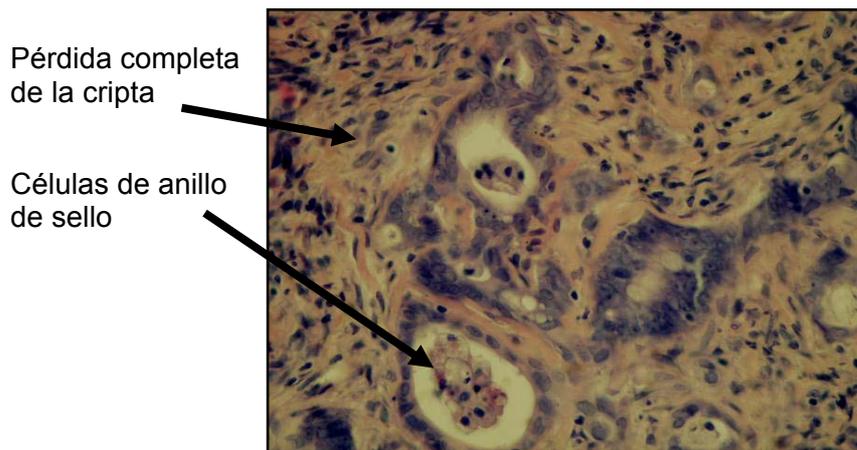


Figura 28. Corte de colon de ratas con tratamiento DMH (40 mg/kg) y DSS (1%) a las 15 semanas, tinción con HIE. 400x. En la imagen observada al microscopio se aprecian un adenocarcinoma.

El grado de inflamación muestra un aumento en el colon de las ratas tratadas con DSS/DMH conforme aumenta la edad de los animales, mientras que el grado de displasia no tiene un patrón definido, aumentando a las 5 semanas, disminuyendo a las 10 y nuevamente aumentando a las 15 semanas. Debido a los resultados observados, se considera necesario realizar una nueva evaluación en donde se caracterice tanto la incidencia como el grado de displasia e inflamación de acuerdo a la zona del colon (proximal, media y distal) y edad de los animales, para determinar si existe una correlación entre ambos o si se relacionan inversamente. También es necesario incluir la evaluación de adenocarcinomas a lo largo de todo el colon, como parte de la caracterización morfológica de este modelo.

7.6 Actividad enzimática de la glutatión-S-transferasa (GST) en hígado de ratas tratadas con DMH/DSS

En cuanto a la actividad de la enzima GST, se observa que esta enzima no tiene un patrón definido por efecto del tiempo. Sin embargo, esta enzima tiende a aumentar en las 5 y 15 semanas por efecto del tratamiento, confirmando su papel protector como respuesta a carcinógenos (Figura 29). Rejeskumar y Kultan (2003) obtuvieron un aumento del 16 % en la actividad de GST en el hígado de ratas Sprague-Dawley que recibieron DMH con respecto a

su control. De manera similar, Hahn-Obercyger y colaboradores (2005) evaluaron la actividad enzimática de GST en ratas Sprague-Dawley tratadas con DMH a la dosis de 30 mg/Kg de peso corporal, 2 inyecciones intramusculares, obteniendo un aumento del 54 % en la actividad con respecto a su control. Tanto a las 5 como a las 15 semanas, la GST sí responde a los estímulos fisiológicos normales de inducción de enzimas de fase 2 por efecto del carcinógeno (DMH) o del promotor de cáncer de colon (DSS). Estos resultados sugieren el papel del hígado como el principal órgano de detoxificación de carcinógenos a través de la enzima GST en el modelo de estudio.

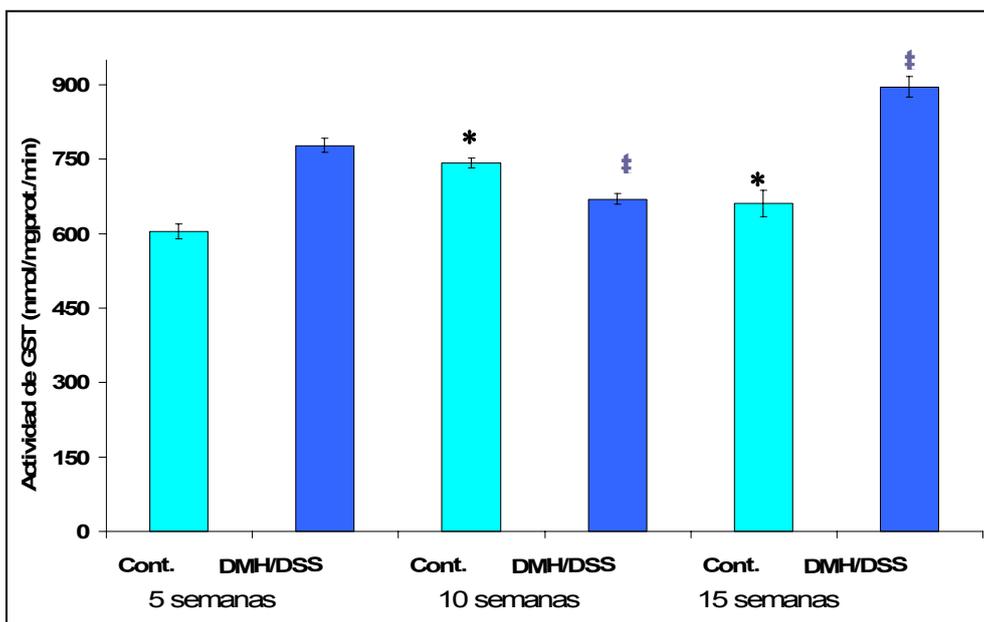


Figura 29. Actividad de la enzima GST en hígado de ratas tratadas con DMH/DSS.

* Estadísticamente diferente con respecto al control 5 semanas. ‡ Estadísticamente diferente con respecto a DMH/DSS 5 semanas. Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado \pm el EE.

7.7 Actividad enzimática de la quinona reductasa (QR) en hígado de ratas tratadas con DMH/DSS

En esta etapa del proyecto se evaluó la actividad de la enzima QR en hígado, como un marcador de inducción de enzimas de fase 2. La actividad de QR tiende a aumentar a la semana 10 (21.2%) y 15 (16.2 %) en los animales

tratados con respecto a su control, confirmando su papel quimioprotector en respuesta a la DMH y al DSS (Figura 30). Hahn-Obercyger y colaboradores (2005) obtuvieron un aumento de 58 % en la actividad de QR en el hígado de ratas Sprague-Dawley tratadas con DMH, con respecto a su control, a las 6 semanas de tratamiento. Sin embargo, en el presente estudio se emplearon ratas macho de la cepa F344 y recibieron, además de la DMH (40 mg/kg), el DSS (1 %). En base a lo anterior, no existe literatura que reporte la inducción en la actividad de la QR en animales que recibieron ambos compuestos, por lo que los resultados no pueden ser comparados con otros similares. En el grupo control 5 semanas se observa una mayor actividad de QR en comparación con las semanas 10 y 15, lo que sugiere que la QR no está respondiendo a los estímulos fisiológicos normales por efecto del tratamiento a estas edades.

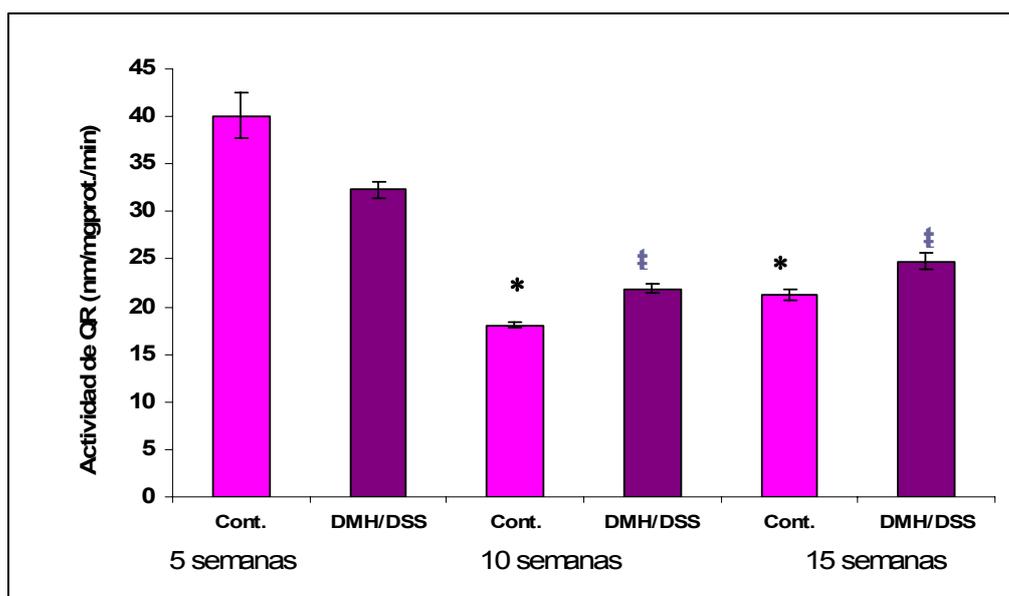


Figura 30. Actividad de la enzima QR en hígado de ratas tratadas con DMH/DSS.

* Estadísticamente diferente con respecto al control 5 semanas. ‡ Estadísticamente diferente con respecto a DMH/DSS 5 semanas. Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado \pm el EE.

La inducción o respuesta de ambas enzimas difiere en el hígado a pesar de tratarse del mismo órgano, ya que la GST tiene una respuesta más favorable en el hígado que la QR. Similarmente, Kohno y colaboradores (2002) reportan hay una mayor inducción de la actividad hepática de GST que de QR con la

administración de silymarina (100 y 500 ppm), compuesto polifenólico con capacidad antioxidante extraído de la planta *Silybum marianum*, en un modelo de cáncer de colon inducido con AOM (metabolito de la DMH) en ratas F344.

Para fines comparativos, los datos de actividad enzimática de GST y QR en hígado se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 10. Actividad de las enzimas glutatión-S-transferasa y quinona reductasa en hígado de ratas tratadas con DMH/DSS a las 5, 10 y 15 semanas de tratamiento.

Tratamiento	Glutatión- S-transferasa (nmol/mg de proteína x min)	Quinona reductasa (nmol/mg de proteína x min)
5 semanas		
Control (n = 4)	605 ± 15	40.1 ± 2.3
DMH/DSS (n = 10)	778 ± 14	32.3 ± 0.9
10 semanas		
Control (n = 4)	742 ± 10 *	18.1 ± 0.3 *
DMH/DSS (n = 10)	670 ± 11 †	21.9 ± 0.4 †
15 semanas		
Control (n = 4)	661 ± 27 *	21.3 ± 0.6 *
DMH/DSS (n = 10)	896 ± 20 †	24.7 ± 0.9 †

Tratamiento con DMH (40 mg/kg) y DSS (1 %)

*Estadísticamente diferente con respecto al control 5 semanas. † Estadísticamente diferente con respecto a DMH 5 semanas.

Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado ± el EE.

En general, los resultados de la actividad enzimática de GST y QR en hígado no muestran un patrón definido en los niveles basales de estas enzimas conforme aumenta la edad del animal o el periodo experimental. Además, se observa un incremento en la actividad hepática de QR a las 10 y 15 semanas por efecto del tratamiento con DMH/DSS; mientras que el incremento en la actividad de GST se observa a las 5 y 15 semanas de tratamiento. Diversos estudios han demostrado que la inducción en la actividad de enzimas de fase 2 comúnmente se observa 24 a 48 h después del tratamiento con fitoquímicos y/o carcinógenos (Talalay, 2000; Ramos-Gomez y col., 2001; Kwak y col., 2004). Por lo anterior, se sugiere evaluar el efecto del carcinógeno y del agente

promotor, así como de agentes inductores, sobre la actividad de estas enzimas a tiempos más cortos en el modelo de inflamación-cáncer de colon.

Considerando los resultados de la inducción de las enzimas GST y QR en colon e hígado de la etapa 1, se determinó utilizar el extracto acuoso de verdolaga a la dosis de 100 mg/kg de peso corporal en la etapa 3 del presente proyecto. En cuanto a la implementación del modelo de cáncer con DMH/DSS los resultados muestran que a las 10 semanas se observa un mayor grado de inflamación con respecto al control a esa misma edad y también mayor que el grupo de 5 semanas tratado con DMH/DSS. Si bien, a las 5 semanas se observa un mayor grado de displasia, para el momento de comenzar la tercera etapa del proyecto no se contaba con los resultados completos del estudio histopatológico, así como tampoco se tenía la información precisa acerca del origen o sección del colon donde se tomó la muestra para el estudio histopatológico. A este respecto, la literatura reporta un aumento gradual del grado de displasia en el colon conforme se incrementa el periodo experimental (Susuki y col., 2004), por lo que en la tercera etapa de este proyecto se consideraron 10 semanas de experimentación.

Tercera Etapa:

En base a los resultados anteriormente mencionados, se eligió el extracto acuoso de verdolaga a la dosis de 100 mg/kg de peso para evaluar su efecto protector en el modelo de inflamación-cáncer de colon en ratas macho F344, a lo largo del período experimental de 10 semanas.

7.8 Efecto del extracto acuoso de verdolaga en la ganancia de peso en ratas tratadas con DMH/DSS

En cuanto a la tercera etapa del proyecto, los grupos recibieron los siguientes tratamientos: el grupo 1 = control; el grupo 2 = verdolaga (100 mg/kg); el grupo 3 = DMH (40 mg/kg) y DSS (1 %) y el grupo 4 = DMH (40 mg/Kg), DSS (1 %) y verdolaga (100 mg/kg) (ver Figura 14). De acuerdo a los

resultados se puede observar que todos los animales sobrevivieron a este experimento.

Las ratas que recibieron la DMH y el DSS tuvieron una menor ganancia de peso durante la segunda semana del experimento; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa, recuperándose conforme transcurrió el periodo experimental. Por otro lado, se observa una ligera tendencia a una mayor ganancia de peso en los animales que consumieron únicamente verdolaga durante todo el periodo experimental, aunque esta ganancia no fue estadísticamente significativa (Figura 31).

Estudios similares realizados por Onose y colaboradores (2003), tampoco reportan diferencia significativa en el peso de los animales tratados con respecto a los controles, por lo que se demuestra que el efecto del tratamiento no afecta significativamente el desarrollo y crecimiento de los animales al compararlos con su control.

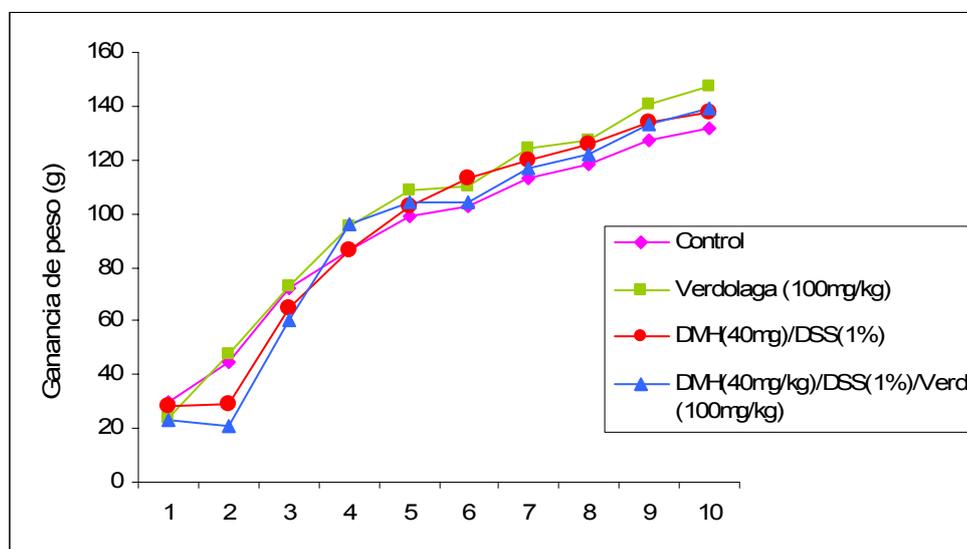


Figura 31. Ganancia de peso durante las 10 semanas experimentales. DMH (40 mg/kg), DSS (1% en el agua de beber), verdolaga (100 mg/kg p.c., vía intragástrica). No hay diferencia estadística significativa entre los grupos tratados.

7.9 Efecto del extracto acuoso de la verdolaga en la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en colon distal e hígado de ratas F344 tratadas con DMH/DSS

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; sin embargo, no se observa inducción de la GST en ninguno de los órganos evaluados (Figura 32). Los resultados observados en hígado muestran que las ratas que consumieron verdolaga tienen una menor actividad de GST con respecto al grupo control, siendo ésta estadísticamente significativa.

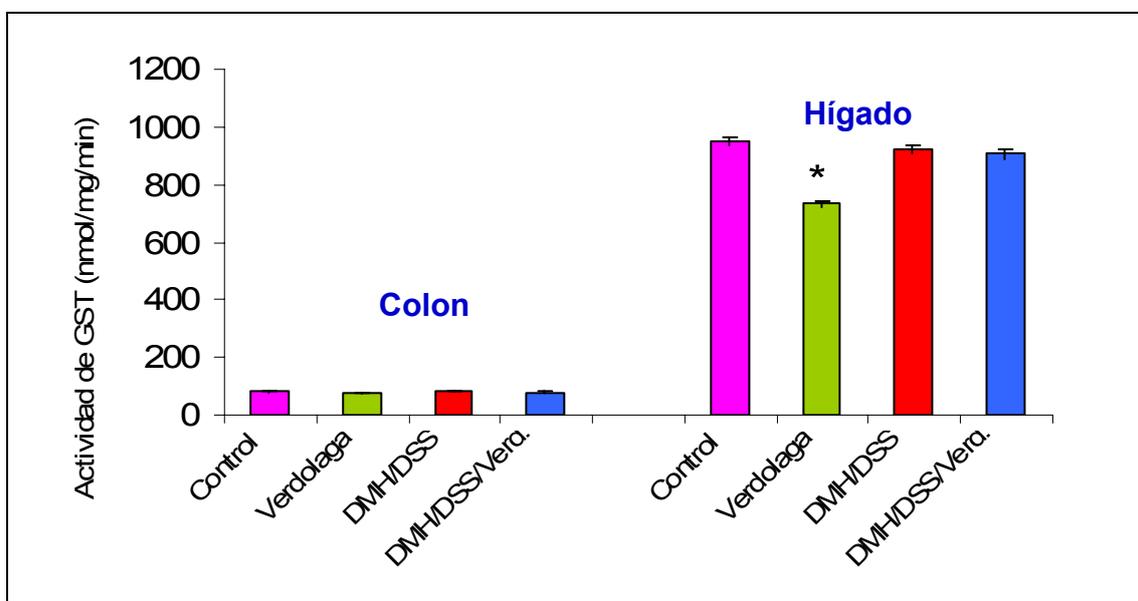


Figura 32. Actividad enzimática de GST en colon distal e hígado de ratas F344 DMH (40 mg/kg), DSS (1% en el agua de beber), verdolaga (100 mg/kg p.c., vía intragástrica). * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control $P < 0.5$. Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado \pm el EE.

Esta regulación negativa en la actividad de la GST en el hígado con el tratamiento de extracto acuoso de verdolaga a la dosis de 100 mg/kg indica que probablemente durante el tratamiento crónico (10 semanas) con dicho extracto, se pudo incrementar la concentración de algún compuesto que compite con el mismo elemento de respuesta para esta enzima y, por lo tanto, disminuir la actividad de la enzima. Otra posible explicación es que después de 10 semanas

de tratamiento con verdolaga (100 mg/kg) puede presentarse un mecanismo suicida que inhiba a la enzima; resultados de este posible mecanismo suicida ya han sido previamente reportados en la actividad de la QR. Krajka-Kuzniak y Baer-Dubowska (2003), utilizando diferentes concentraciones de ácido tánico (compuesto fenólico), observaron que la actividad enzimática de QR disminuyó hasta en un 60 % con respecto al control a medida que se aumentaba la concentración de dicho compuesto. Por otro lado, el tratamiento con verdolaga durante 10 semanas puede decrecer de manera selectiva la expresión inducida del gen *gst* y, sin embargo, no afectar otros genes blanco de Nrf2 como *qr*. En el 2006, Zhang y colaboradores reportaron que BRG1, la subunidad catalítica del complejo remodelador de cromatina SWI2/SNF, puede decrecer de manera selectiva la expresión inducida (con dietilmalato) del gen *ho-1*, sin afectar la expresión del gen *qr* en células SW480. Lo anterior indica que existen mecanismos complejos de regulación de la actividad de enzimas de fase 2 en este modelo, los cuales a su vez son afectados por la complejidad en la composición del extracto de la verdolaga.

Para fines comparativos, los datos de actividad enzimática de GST en colon distal e hígado se muestran en el cuadro 11.

Cuadro 11. Efecto del extracto acuoso de la verdolaga en la actividad de la enzimática de glutatión-S-transferasa en hígado y colon distal de ratas tratadas con DMH/DSS.

Tratamiento n = 15	Colon distal Glutatión-S-transferasa (nmol/mg de proteína x min)	Hígado Glutatión-S-transferasa (nmol/mg de proteína x min)
Control Negativo	80 ± 2.0	948 ± 13
Verdolaga	76 ± 1.1	732 ± 12*
DMH/DSS	82 ± 1.2	924 ± 13
DMH/DSS/ Verdolaga	79 ± 1.4	906 ± 15

* Diferencia estadística comparado con el control por la prueba de Dunnett ($p < 0.05$). Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado ± el EE.

7.10 Efecto del extracto acuoso de la verdolaga en la actividad enzimática de quinona reductasa (QR) en colon distal e hígado de ratas F344 tratadas con DMH/DSS

También se evaluó la actividad de la enzima QR en colon e hígado, observándose que los niveles basales de esta enzima son similares en ambos órganos (Figura 32). En cuanto a la actividad enzimática de QR en hígado, las ratas tratadas con extracto acuoso de verdolaga (100 mg/kg) y las del grupo DMH (40 mg/kg), DSS (1%) y verdolaga (100 mg/kg) tuvieron una actividad enzimática significativamente mayor (17 %) con respecto a su control. Esta inducción puede ser por efecto del tratamiento con la DMH y el DSS, ya que se sabe que estos compuestos elevan las ROS y, como respuesta a este estímulo, se eleva la actividad de enzimas de fase 2. Por otro lado, la respuesta más favorable de inducción se obtuvo en el colon distal de las ratas tratadas con el extracto acuoso de verdolaga (100 mg/kg), mostrando una inducción del 19 % en la actividad de la QR, con respecto a su control.

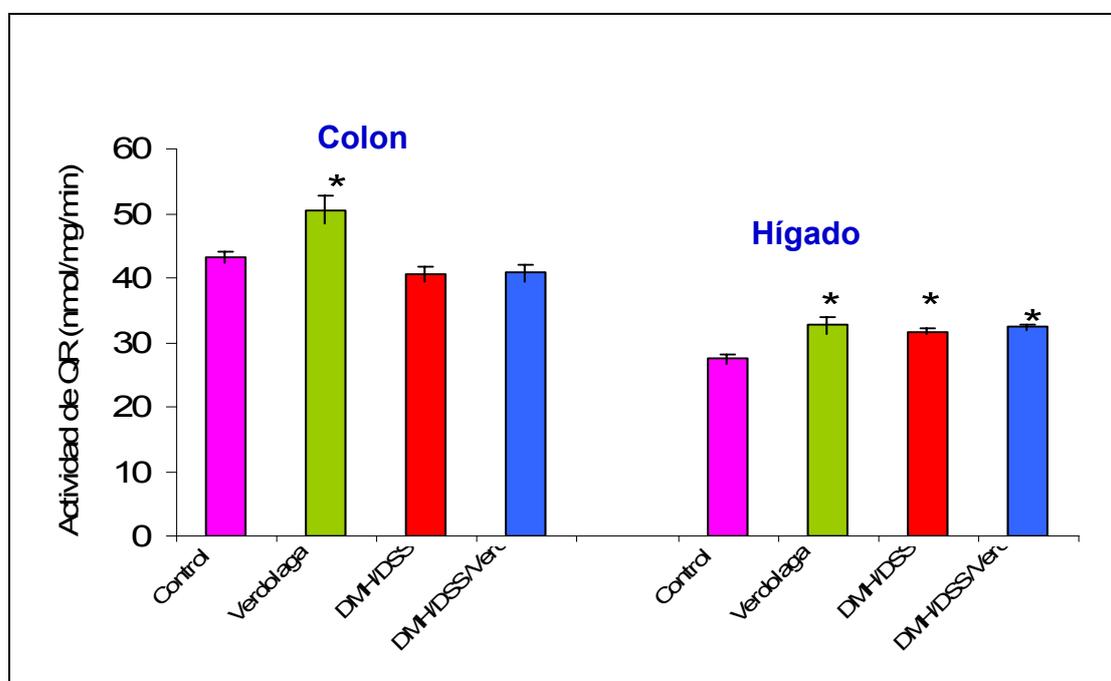


Figura 33. Actividad de QR en colon distal e hígado de ratas F344, DMH (40 mg/kg), DSS (1% en el agua de beber), verdolaga (100 mg/kg p.c., vía intragástrica). * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control $P < 0.5$. Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado \pm el EE.

Así también, la inducción de QR indica que probablemente algún compuesto presente en el extracto acuoso de verdolaga actúa como inductor directo de Nrf2 o activa la cascada de señalización de las cinasas efectuando la regulación positiva de Nrf2 o favorece la dimerización de Nrf2 con las small Mafs y su unión a elementos de respuesta a antioxidantes o electrófilos (ARE/EpRE), que se encuentran localizados en la región promotora de los genes que codifican para enzimas QR.

Para fines comparativos, los datos de actividad enzimática de QR en colon distal e hígado se muestran en el cuadro 12.

Cuadro 12. Efecto del extracto acuoso de la verdolaga en la actividad de la enzimática de quinona reductasa en colon distal e hígado de ratas tratadas con DMH/DSS.

Tratamiento n = 15	Colon distal Quinona reductasa (nmol/mg de proteína x min)	Hígado Quinona reductasa (nmol/mg de proteína x min)
Control Negativo	43 ± 0.8	28 ± 0.7
Verdolaga	51 ± 2.2*	33 ± 1.3*
DMH/DSS	41 ± 1.1	32 ± 0.5*
DMH/DSS/ Verdolaga	41 ± 1.3	32 ± 0.4*

* Diferencia estadística comparado con el control por la prueba de Dunnett ($p < 0.05$). Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado ± el EE.

7.11 Efecto del extracto acuoso de verdolaga en la actividad enzimática de hemo-oxigenasa (HO-1) en hígado de ratas F344 tratadas con DMH/DSS

En esta etapa del proyecto también se evaluó la actividad de la enzima HO-1 en hígado y colon. Los datos obtenidos en el primer experimento demostraron que hay una regulación negativa estadísticamente significativa de HO-1 en el hígado de las ratas tratadas con el extracto acuoso de verdolaga (100 mg/kg) (Figura 33). Por otro lado, no se observaron diferencias

significativas entre los grupos DMH/DSS y DMH/DSS/verdolaga con respecto al control.

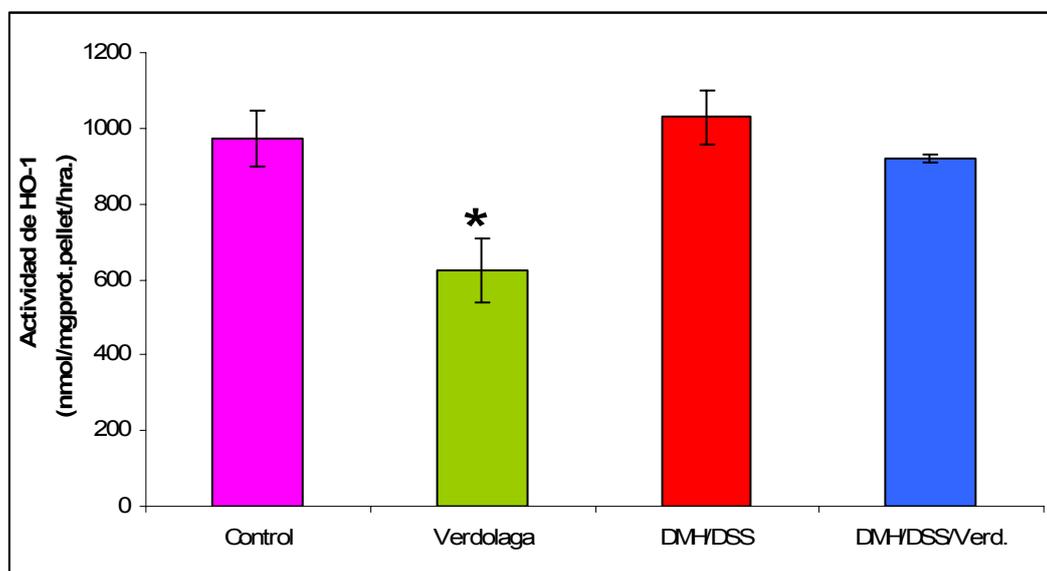


Figura 34. Actividad de HO-1 en hígado de ratas F344, DMH (40 mg/kg), DSS (1% en el agua de beber), verdolaga (100 mg/kg p.c., vía intragástrica).

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control $P < 0.5$.

Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado \pm el EE.

La actividad de esta enzima en el hígado tiene un comportamiento similar al reportado para la actividad de GST (ver figura 31). Estos resultados sugieren que ambas enzimas, tanto la GST como la HO-1, son reguladas de manera negativa en hígado por algún o el mismo compuesto del extracto acuoso de verdolaga. Shen y colaboradores (2004) reportaron en un estudio molecular realizado en células HepG2, que la ruta de p38 regula negativamente a Nrf2, inhibiendo su activación y, por lo tanto, disminuyendo la expresión de la proteína HO-1.

Al realizar una repetición de este experimento, se observó una disminución del 40% en la actividad de HO-1 en las muestras homogeneizadas de hígado almacenadas a -70°C durante 8 semanas (con respecto a la actividad inicial medida en hígado) (Cuadro 12). En lo que respecta a la actividad de HO-1 en el colon distal, la determinación inicial se vio afectada por la baja concentración de proteína y la poca cantidad de la muestra, por lo que tampoco se pudieron reportar.

Para fines comparativos, los datos de actividad enzimática de la HO-1 en el homogeneizado de hígado recién preparado y almacenado se muestran en el cuadro 13.

Cuadro 13. Efecto del extracto acuoso de la verdolaga en la actividad de la enzima hemo-oxigenasa en hígado de ratas F344 tratadas con DMH/DSS.

Tratamiento n = 15	Actividad de hemo-oxigenasa en hígado (nmol/mg de proteína homogenado x hr)	
	Homogenado fresco	Homogenado almacenado – 70 °C
Control Negativo	972 ± 73	670 ± 36
Verdolaga	624 ± 84*	443 ± 17*
DMH/DSS	1028 ± 69	596 ± 16
DMH/DSS/ Verdolaga	920 ± 9	567 ± 13

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control P<0.5.
Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado ± el EE.

7.12 Efecto del extracto acuoso de verdolaga en la evaluación de fosas crípticas aberrantes (FCA) en el colon de ratas F344 tratadas con DMH/DSS

Se observó que el 25 % de los animales del grupo control presentaron en promedio 0.75 de FCA por colon; mientras que el 100 % de los animales de los grupos con DMH/DSS y DMH/DSS/Verdolaga presentaron FCA, con un promedio de 22.2 ± 15.7 y 20.6 ± 11.8 FCA por colon, respectivamente. El grupo tratado con DSS/DMH/verdolaga mostró una disminución no significativa del 8 %, con respecto al DMH/DSS, en cuanto al número total de FCA. Así también se observó que el grupo de ratas tratadas con verdolaga no presentaron FCA en el colon (Cuadro 14). Lo anterior sugiere que algún compuesto presente en la verdolaga es capaz de inhibir la formación de FCA

“espontáneas” en el colon de las ratas tratadas con verdolaga o inducidas con DMH/DSS.

Cuadro 14. Efecto del extracto de verdolaga en el peso, % de ratas con FCA y no. total de FCA en colon distal de ratas F344 tratadas con DMH/DSS.

Tratamiento	Peso (g)	No. de ratas con FCA (%)	No. de FCA por rata
Control –	250 ± 22	1 (25)	0.75 ± 1.5
Verdolaga	232 ± 24	0 (0)	0 ± 0
DMH/DSS	238 ± 20	5 (100)*	22.2 ± 15.7*
DMH/DSS/Verdolaga	238 ± 19	5 (100)*	20.6 ± 11.8*

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

7.13 Efecto del extracto acuoso de verdolaga en la evaluación microscópica del colon de ratas F344 tratadas con DMH/DSS

En cuanto a la evaluación microscópica del colon, los cortes histológicos analizados corresponden a una fracción de 1.25 cm de colon distal de las ratas. Similarmente, el grado de inflamación se realizó de acuerdo al criterio morfológico descrito por Cooper y colaboradores 1993 (Figura 4).

De manera general se observa que, independientemente del tratamiento, el 100 % de los animales presentó inflamación (Cuadro 15), presentándose con o sin displasia adicional en el colon de las ratas.

Cabe resaltar que el grupo de ratas sanas que recibieron el extracto acuoso de verdolaga (100 mg/Kg) durante el periodo experimental, muestran un menor grado de inflamación al ser comparado con los otros grupos experimentales (incluso en control negativo), ya que el 100 % de los animales tuvo inflamación de grado 1. De manera similar, el grupo que recibió el tratamiento de verdolaga, DMH y DSS mostró que el 40 % de los animales tiene grado 1 de inflamación y el 60 % grado 2; mientras que en el grupo control

positivo (DMH/DSS), el 40 % de los animales tienen inflamación grado 2 y el 60 % grado 3.

Cuadro 15. Incidencia y grado de inflamación del colon distal de las ratas con verdolaga, DMH/DSS y DMH/DSS/verdolaga.

Tratamiento (no. de ratas)	Incidencia de inflamación (%)			
	Total	Grado		
		1	2	3
10 semanas				
Control (5)	100	80	20	-
Verdolaga (5)	100	100	-	-
DMH/DSS (5)	100	-	40	60
DMH/DSS/ Verdolaga (5)	100	40	60	-

En general, los resultados indican que el grupo control positivo muestra el mayor grado de inflamación, mientras que los grupos tratados con verdolaga tiene el menor grado de inflamación comparados con su control. Estos resultados indican que probablemente algún compuesto presente en la verdolaga pueda tener propiedades farmacológicas, entre las que se encuentran la propiedad anti-inflamatoria, de desintoxicación y anti-oxidante. Xu y colaboradores (2006) reportaron que los flavonoides presentes en la verdolaga son los componentes biológicamente activos, a los cuales se les atribuyen funciones de anti-oxidación, anti-bacterianos, anti-virus, anti-ulcerogénicos y anti-inflamatorios, entre otras. De manera similar Chan y colaboradores (2000) reportaron varias propiedades farmacológicas de la verdolaga entre las que destacan propiedad anti-inflamatoria.

En cuanto al grado de displasia, se observó que los grupos a los que se les administró la verdolaga no presentaron displasia (Cuadro 16). El grupo DMH/DSS presentó una incidencia del 40 % de animales con displasia, siendo ésta positiva de grado bajo. De manera similar a los resultados de la etapa de

caracterización del modelo (etapa 2), el grupo control presentó una incidencia del 20 % y también fue reportada como positiva de bajo grado.

Cuadro 16. Incidencia de displasia en el colon distal de las ratas con verdolaga, DMH/DSS y DMH/DSS/verdolaga.

Tratamiento (no. de ratas)	Incidencia de displasia (%)			
	Negativa	Positiva		
		Total	Bajo	Grado Alto
10 semanas				
Control (5)	80	20	100	-
Verdolaga (5)	100	-	-	-
DMH/DSS (5)	60	40	100	-
DMH/DSS Verdolaga (5)	100	-	-	-

Los resultados evaluados en esta parte del proyecto muestran que el extracto acuoso de la verdolaga, a la dosis de 100 mg/kg de peso, tiene un efecto quimioprotector en el modelo de inflamación-cáncer de colon inducido químicamente en ratas F344. Lo anterior se basa en la disminución del número de FCA, un menor grado de inflamación y no se observó displasia por efecto del tratamiento con verdolaga. Aunque el desarrollo de adenocarcinomas no fue observado en el grupo control positivo a las 10 semanas del periodo experimental, lo anterior pudo atribuirse a que no se evaluó histológicamente el colon completo, sino únicamente un corte de 1.25 cm del colon distal de las ratas tratadas. Estos resultados también revelan que el mecanismo quimioprotector de la verdolaga aparentemente no se basa en la inducción de enzimas de fase 2 (QR y GST) y enzimas antioxidantes (HO-1) en este periodo experimental. Sin embargo, los resultados obtenidos de la inducción de enzimas de fase 2 por administración de la verdolaga (a la misma dosis) en ratas sanas, no permite descartar este mecanismo en etapas tempranas de nuestro modelo.

También es importante resaltar que los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran el efecto preventivo o benéfico de la verdolaga, ya que las ratas sanas a las que se les administró el extracto acuoso (100 mg/kg) tienen un peso ligeramente mayor, un menor número de FCA (“espontáneas”), y un menor grado de inflamación y de displasia propias de estos roedores, al ser comparadas con el grupo control negativo. Lo anterior sugiere que el consumo de verdolaga puede mejorar el estado de salud de un individuo y que puede protegerlo aún en condiciones no patológicas.

VIII. CONCLUSIONES

- La administración intragástrica de los extractos acuosos y metanólicos de la verdolaga (50, 100 y 200 mg/kg de peso corporal) induce enzimas de fase 2 (GST y QR), obteniéndose la mayor inducción con el extracto acuoso a la dosis de 100 mg/kg, tanto en hígado como en colon.
- Bajo las condiciones empleadas en el presente estudio, la administración del DMH (40mg/kg) y DSS al 1 % permitió observar un incremento en el grado de la inflamación y la incidencia de displasia en el colon, con respecto al grupo control.
- El extracto acuoso de verdolaga (100 mg/kg) muestra un efecto quimioprotector contra la actividad carcinogénica de la DMH y el efecto promotor del DSS, al disminuir significativamente el número de FCA (8 %), así como el grado de inflamación y la incidencia de displasia, con respecto al control positivo.
- El consumo de verdolaga en individuos sanos resulta benéfico para la salud, ya que disminuye el número de FCA, el grado de inflamación y la incidencia de displasia que se presenta comúnmente en estos roedores.

Los resultados del presente estudio confirman los efectos benéficos de la verdolaga en un modelo de inflamación-cáncer de colon, al disminuir las fosas crípticas aberrantes en el colon, aumentar la actividad de QR en hígado y colon, y reducir la inflamación y la displasia en el colon distal.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Ames, B.N. 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Sci.* 221: 1256-1264.

Anuario Estadístico, 2004. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. www.inegi.gob.mx

Argueta, A., Cano, L.M., y Rodarte, M.E. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. 1a. ed., Instituto Nacional Indigenista. México: 898-899, 1351, 1196, 1379-1380.

Balogun, E., Hogue, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C., Foresti, R., Alam, J., and Montterlini, R. 2003. Curcumin activates the hoem oxigenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J.* 371: 887-895.

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

Barrera, G., Pizzinenti, S., Laurora, S., Moroni, E., Giglioni, B., and Dianzani, M. 2002. 4 Hydroxy nonenal affects pRb/E2F pathway in HL-60 human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 295: 267-275.

Bazo, A., Marchesan, M., Sforcin, J., Viana de Camargo, J., Ribeiro, L., and Fávero, D. 2002. *Teratog Carcinog Mutag.* 22: 183-194.

Begleiter, A., Sivananthan, K., Curphey, T., and Bird, R. 2003. Induction of NAD(P)H quinone: oxidoreductase1 inhibits carcinogen-induced aberrant crypt foci in colons of Sprague-Dawley rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Res.* 12: 566-572.

Bin, H., Ahmed, S., Wang, N., Gupta, S., Zhang, A., and Haqqi, T. 2006. Green tea polyphenols-induced apoptosis in human osteosarcoma SAOS-2 cells

involves a caspase-dependent mechanism with down regulation of nuclear factor kB. *Toxicol Applied Pharmacol.* 1: 11-19.

Bird, R., and Good, C. 2000. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol Letters.* 112-113: 395-402.

Boguski, M., Mc Cormick, F. 1993. Proteins regulation Ras and its relatives. *Nat.* 366: 643-654.

Blum, C., Xu, M., Orner, G., Fong, A., Bailey G., Stoner, G., Horio, D., and Dashwood, R. 2001. β -Catenin mutation in rat colon tumors initiated by 1,2-dimethylhydrazine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and the effect of post-initiation treatment with chlorophyllin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis.* 22: 315-320.

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

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

Chan, K. and Kan, Y.W. 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., Zakaria, M., Habibullah, M., and Attas, A. 2000. The analgesic and anti-inflammatory effect of *Portulaca oleraceae* L. subsp. *sativa*. *J Ethnopharmacol.* 3: 445-451.

Chandra, S., and Gonzalez de Mejia, E. 2004. Polyphenolic compound antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of

Ardisia compressa in comparison to Mate (*Ilex paraguarienses*) and green (*Camellia sinesis*) teas. J Agric Food Chem. 10: 3583-3589.

Chang, C., Kimer, L., and Mabry, T. 1974. Biogenesis of betalamic acid. Phytochem. 13: 2771-2775.

Chen, Ch., and Kong, A. 2005. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. Trends Pharmacol Sci. 26: 318-326.

Chen, J., Shi, J., and Liu, J. 2003. Chromatogr. 1003: 127-132. páginas

Chiao, J.W., Chung, F.L., Kancherla, R., Ahmed T., Mittelman, A., and Conaway, C.C. 2002. Sulforaphane and its metabolite mediate growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. Int J Oncol. 20: 631-636.

Chung, D. 2000. The Genetic Basis of Colorectal Cancer: Insights into critical pathways of tumorigenesis. Gastroenterol. 119: 854-865.

Davidson, N.E., Eger, P.A., and Kensler, T.W. 1990. Transcriptional control of glutathione S-transferase gene expression by the chemoprotective agent 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiole-3-thione (oltipraz) in rat liver. Cancer Res. 50: 2251-2255.

De Flora, S. 1997. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mut Res. 402: 151-158.

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K., and Lui, R. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. J Agric Food Chem. 50: 3010-3014.

Dhakshinamoorthy, S., Jain, A., Bloom, D., and Jaiswal, A. 2005. Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response

element (ARE)-mediated NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants. *J Biol Chem.* 17: 16891-16900.

Eskin, M., and Tamir, S. 2006. *Dictionary of Nutraceuticals and Functional Foods.* CRC Press. New York. USA, 332-334.

Fenoglio-Preiser, C., Lantz, P., Listrom, M., Davis, M., and Rilke F. 1989. *Gastrointestinal Pathology.* Raven Press, Ltd., New York, USA, 2,4,7,383-397.

Fuchs, J., and Podda, M. 2004. *Redox-Genome interactions in health and disease.* Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 497-512.

Fukumoto, L. and Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 48: 594-598.

Gao, X., Dinkova-Kostova, A., and Talalay, P. 2003. Prevention and treatment of oxidative stress disorders by glutathione and phase II detoxification enzymes. *Int Appl.* 139: 30866.

Gariglio, P., y Orozco, E. 2000. *Genética y biomedicina molecular.* 1ra. Ed., Limusa, México, D.F.: 181-198.

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

Griffiths, A., Gelbart, W., Miller, J., y Lewontin, R. 2000. *Genética Moderna.* Mc Graw Hill-Interamericana, México, D.F.:465-487.

Guo, Sh., and Sonenshein, G. 2006. Green tea polyphenols and cancer prevention. *Nutr Genom.* 146: 177-206.

Gutiérrez, G. 2006. Evaluación de la actividad quimioprotectora de extractos acuosos y metanólicos de plantas medicinales y comestibles en el estado de

Querétaro como inductores de enzimas de fase 2. Tesis para obtener el título de licenciado en químico farmacéutico biólogo. UAQ. Querétaro. México.

Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid. *J Biol Chem.* 249: 7130-7139.

Hahn-Obercyger, M., Stark, A., and Madar, Z. 2005. Grapefruit and oro blanco enhance hepatic detoxification enzyme in rats: possible role in protection against chemical carcinogenesis. *J Agric Food Chem.* 53: 1828-1832.

Hirono, I. 1987. Naturally occurring carcinogens of plant origin. *Toxicology phatology and biochemistry.* *Biol Pharm Bull.* 2: 120-158.

Huang, H.C. 2000. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:12475-12480.

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. 1997. An Nrf2/Small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant responsive element. *Biochem Biophys Res Commun.* 236: 313-322.

Itoh, N., Semba, S., Ito, M., Takeda, H., Kawata, and S., Yamakawa, M. 2002. Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma. *Cancer.* 94: 3127-3134.

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.

Jackson, P., Cooper, D., O'Connor, J. and Povey, A. 1999. The relationship between 1,2-dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumours: Tumour development in female SWR mice does not require a *K-ras* mutational event. *Carcinogenesis*. 20: 509-513.

Jackson, S.J., and Singletary, K.W. 2004. Sulforaphane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization. *J Nutr*. 134: 2229-2236.

Jemal, A., Thomas, A., Murray, T., and Thun, M. 2002. 2002. Cancer Statistics. *Cancer J Clin*. 52: 23-47.

Kang, K., Choi, S., and Kim, S. 2002. Peroxynitrite activates NF-E2-related factor 2/antioxidant response element through the pathway of phosphatidylinositol 3-kinase: the role of nitric oxide synthase in rat glutathione S-transferase A2 induction. *Nitric Oxide*. 7: 244-253.

Kazerouni, N., Sinha, R., Hsu, C.H., Greenberg, A., and Rothmann, N. 2001. Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem Toxicol*. 39: 423-36.

Kennedy, K., Kandel, E., Cross, T., Hay, N. 1999. Akt/protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Med*. 45: 439-456.

Keum, Y., Jeong, W., and Kong, A. 2004. Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mut Res*. 555: 191-202.

Kirakosyan, A., Seymour, E., Kaufman, P., Warber, S., Bolling, S., and Chang, S. 2004. Applied environmental stresses to enhance the levels of polyphenolics in leaves of hawthorn plants. *Physiol Plant*. 121: 182-186.

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

Kohno, H. Tanaka, T., Kawabata, K., Hirose, Y., Sugie, S., Tsuda, H., and Mori H. 2002. Silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Int J Cancer*. 101: 461-468.

Krajka-Kuzniak, V., and Baer-Dubowska, W. 2003. The effects of tannic acid on cytochrome P450 and phase II enzymes in mouse liver and kidney. *Toxicol Letters*. 143: 209-216.

Kwak, M., Wakabayashi, N., Motohashi, H., Yamamoto, M., and Kensler, T. 2003. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem*. 278: 8135-8145.

Kwak, M., Ramos-Gomez, M., Wakabayashi, N., and Kensler, T.W. 2004. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mut Res*. 555: 133-148.

Lee, J., Calkins, M., Chan, K., Johnson, J. 2003. Identification of NF-E2 related Factor-2 dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem*. 270: 12029-12038.

Lodish, B., Berk, A., Zipurskt, S, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. 2003. *Biología Celular y Molecular*. 4a. Ed. Edit. Med Panamericana. pp: 1054-1081.

Liu, M., Weber, C., Lee, C., and Liu, R. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J Agric Food Chem*. 50: 2956-2930.

Mazzon, E., Muia, C., Di Paola, R., Genovese, T., Menegazzi, M., De Sarro, A., Suzuki, H., and Cuzzocrea, S. 2005. Green tea polyphenol extract attenuates colon injury induced by experimental colitis. *Free Radical Res.* 39:1017-1025.

Mc Cance, K., and Huether, S. 1994. Pathophysiology, the biologic basis for disease in adult and children. Mosby. 2: 322-327.

McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Chanas, S., Henderson, C., McLellan, L., Wolf, C., Cavin, C., and Haydes, J. 2001. The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res.* 61: 3299-3307.

Miranda, N. 2005. Estudio químico y evaluación del potencial quimioprotector de plantas comestibles en zonas rurales queretanas. Tesis de Maestría. UAQ. Querétaro, México.

Motohashi, H., O'Connor, T., Katsuoka, Douglas, J., and Yamamoto, M. 2002. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factor. *Gene* 294: 1-12.

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

Munday, R. and Munday, C. 2004b. Induction of phase II detoxification enzymes in rats by plant-derivatives isothiocyanates: comparison of an allyl isothiocyanate with sulforaphane and related compounds. *J Agric Food Chem.* 52: 1867-1871.

Mutoh, M., Takahashi, M, Fukuda, K., Matsushima-Hibiya, Y., Mutoh, H., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. 2000. Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcinol-type structure. *Carcinogenesis.* 21: 959-963.

Negrette, S., Montenegro, M., Borda, J.T., and Burna, A.N. 2000. Lesiones neoplásicas tempranas (LNT) y tumores del colon inducidos con 1,2-Dimetilhidrazina (DMH) en ratas. *Rev Vet.* 1: 1-4.

Onose, J., Imai, T., Hasumura, M., Ueda, M., and Hirose, M. 2003. Rapid induction of colorectal tumors in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine followed by dextran sodium sulfate treatment. *Cancer Lett.* 198: 145-152.

Onose, J., Imai, T., Hasumura, M., Cho, Y., and Hirose, M. 2005. A new medium-term rat colon bioassay applying neoplastic lesions as endpoints for detection of carcinogenesis modifiers-validation with known modifiers. *Cancer Lett.* 232: 272-278.

Parry, O., Okwuasaba, F., and Ejike, C. 1987. Preliminary clinical investigation into the muscle relaxant action of an aqueous extract of *Portulaca oleracea* applied topically. *J Ethnopharmacol.* 21: 99-106.

Parry, O., Marks, J., and Okwuasaba, F. 1993. The skeletal muscle relaxant action of *Portulaca oleraceae*: role of potassium ions. *J Ethnopharmacol.* 40: 187-194.

Pietta, P. 2000. Flavonoids as antioxidant. *J Nat Prod.* 63: 1035-1042.

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.

Potter, J. 1993. Colon cancer: review of the epidemiology. *Epidemiol Rev.* 15: 499-545.

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

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

Rajeshkumar, N.V., Kuttan, R. 2002. Inhibition of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis by Picroliv, J. Exp Clin Cancer Res. 19: 459-464.

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

Ramos, G., Serrana, V., Balderas, P., Pelz, R. 2004. Atlas de malezas Arvenses del estado de Querétaro. 1a ed., Ediciones UAQ, México: 34-35, 90-91, 210-213, 222-223.

Ramos-Gómez, M., Kwak, M., Dolan, P., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., and Kensler, T. 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.

Ramos-Gómez, M., Dolan, P., Itoh, K., Yamamoto, M., and Kensler, T.W. 2003. Interactive effects of *nrf2* genotype and oltipraz on benzo[a]pyrene-DNA adducts and tumor yield in mice. Carcinogenesis. 24: 461-467.

Riddell, R.H., Goldman, H., Ransohoff, D.F., Appelman, H.D., Fenoglio, C.M., Haggitt, R.C., Ahren, C., Correa, P., Hamilton, S.R. and Morson, B.C. 1983. Dysplasia inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. Hum Pathol. 14: 931-968.

Ross, J. 1982. Experimental large intestinal adenocarcinoma induced by hydrazines and human colorectal cancer: a comparative study. *Colonic Carcinogenesis*. 187-207.

Ross, J. and Kasum, C. 2002. Dietary flavonoides: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Ann Rev Nutr*. 22: 19-34.

Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., and Giacomo D. 2000. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol*. 16: 91-98.

Santana, C., and García, A. 2001. Los genes Ras, el ciclo celular y el desarrollo de tumores. *BEB*. 16:86-91.

Sawa, T., and Ohshima, H. 2006. Nitritive DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis. *Nitric Oxide Biol Chem*. 14: 91-100.

Shen, G., Hebbar, V., Nair, S., Xu, Ch., Li, W., Lin, W., Keum, Y., Han, J., Gallo, M. and Kong, T. 2004. Regulation of Nrf2 Transactivation Domain Activity. *J Biol Chem*. 279: 23052-23060.

Shinohara, N., and Koyanagi, T. 2002. Ras signal transduction in carcinogenesis and progression of bladder cancer: molecular target for treatment. *Urol Res*. 30: 273-281.

Simopoulos, A., and Salem, H. 1986. Purslane: a terrestrial source of omega-3 fatty acids. *N Engl J Med*. 315:833.

Simopoulos, A., Norman, H., Gillaspay, J. and Duke, J. 1992. Common purslane: a source of omega-3 fatty acids and antioxidants. *J Am Coll Nutr*. 11: 374-382.

Soon, Y., and Tan, B. 2002. Evaluation of the hypoglycemic and anti-oxidant activities of *Morinda officinalis* in streptozotocin-induced diabetic rats. Singapore Med J. 43: 77-85.

Sparnins, V.L., Venegas, P.C., and Wattenberg, L.W. 1982. Glutathione S-transferase activity: enhancement by compounds inhibiting chemical carcinogenesis and dietary constituents. J Natl Cancer Inst. 68: 492-496.

Srivastava, S., Verma, M., and Henson, D. 2001. Biomarkers for early detection of colon cancer. Clin Cancer Res. 7: 1118-1126.

Subías, Diego. 2006.. Potencia inductora de enzimas de fase 2 en células hepáticas tratadas con extractos de plantas rurales queretanas. Tesis para obtener el título de licenciado en químico de alimentos, UAQ Querétaro, México.

Surh, Y. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer. 3: 768-777.

Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., and 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.

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

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

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

Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Hata, K., Sugie, S., Niho, N., Sakano, K., Takahashi, M., and Wakabayashi, K. 2005. Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in Apcmin/+ mice: inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Internatl J Cancer*. 118: 25-34.

Tesoriere, L., Butera, D., Pintaudi, A., Allegra, M., and Livrea, M. 2004. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C 1-3. *Am J Clin Nutr*. 80: 391-395.

Toth, B., Yokoyama, Y., Kuebler, J., Schwacha, M., Rue, L., Bland, K., and Chaudry, T. 2003. Sex differences in hepatic hemoxygenase expression and activity following trauma and hemorrhagic shock. *Arch Surg*. 138: 1375-1382.

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

Tremblay, C., Armstrong, B., Theriault, G., and Brodeur, J. 1995. Estimation of risk of developing bladder cancer among workers exposed to coal tar pitch volatiles in the primary aluminum industry. *Am J Ind Med*. 27: 335-348.

Venugopal, R. and Jaiswal, A. 1996. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene. *Pharmacol*. 93: 14960-14965.

Watterberg, L., 1985. Chemoprevention of Cancer. *Cancer Res*. 45: 1-8.

www.botanical-online.com

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

Xu, X., Yu, L., and Chen, G. 2006. Determination of flavonoides in *Portulaca oleracea* by capillary electrophoresis with electrochemical detection. J Pharmaceut Biomed Annal. 41: 493-499.

Yannai, S., Day, A.J., Williamson, G., and Rhodes, J.C. 1998. Characterization of flavonoids as monofunctional or bifunctional inducers of quinone reductase in murine hepatoma cell lines. Food Chem Toxicol. 36: 623-630.

Yen, G-Ch., and Chen, H.Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J Agric Food Chem. 43: 27-32.

Yu, R., Lei, W., Mandlekar, S, Weber, M.J., Der, C.J., and Wu, J. 2000. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. J Biol Chem. 274: 27545-27552.

Zaveri, N. 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. Life Sci. 18: 2073-2080.

Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G and Posner, G.H. 1992. Proc Natl Acad Sci USA. 89: 2399-2403.

Zhang, Y., Kensler, T.W., Cho, Ch., Posner, G., and Talalay, P. 1994. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. Biochem. 91: 3147-3150.

Zhang, Y., and Talalay, P. 1998. Mechanism of differential potencies of isothiocyanates as inducers of anticarcinogenic phase 2 enzymes. Cancer Res. 58: 4632-4639.

Zhang, X., Ji, Y., Qu, Z., Xia, J., and Wang, L. 2002. Experimental studies on antibiotic functions of *Portulaca oleracea* L. *in vitro*. Chinese J Microecol. 5: 277-280.

Zhang, J., Ohta, T., Maruyama, A., Hosoya, T., Nishikawa, K., Maher, J., Shibahara, S., Itoh, K., and Yamamoto, M. 2006. BRG1 interacts with Nrf2 to selectively mediate HO-1 induction in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 26: 7942-7952.

Zipper, L., and Mulcahy, T. 2003. Erk activation is required for Nrf2 nuclear localization during pyrrolidine dithiocarbamate induction of glutamate cysteine ligase modulatory gene expression in HepG2 cells. *Toxicol Sci.* 73: 124-134.

X. ANEXOS

9.1 Obtención de la fracción citosólica

Para la obtención de las fracciones citosólicas a partir de tejido sano y con lesiones, se procedió de acuerdo al protocolo establecido (Ramos-Gómez y col., 2003).

a) Las muestras de tejido fueron homogenizadas en un en un politrón con una solución amortiguadora que para 1 litro contiene:

-7.9 g de Tris-HCl

-2.1 g de MgCl₂

-1.9 g de KCl

- 85,6 g de sacarosa ultra pura

Se afora con H₂O y se ajusta el pH a 7.0

Por cada 0.5 g de tejido se agregaron 4 volúmenes de solución amortiguadora.

b) Las muestras ya homogenizadas se centrifugaron a 8750 g durante 20 minutos, se tomó el sobrenadante y se colocó con pipetas Pasteur en tubos para ultracentrífuga.

c) Se ultracentrifugaron a 100,000 g durante 60 minutos y el citosol se almacenó en viales a - 70° C.

9.2 Obtención de la fracción microsomal

Para la obtención de la fracción microsomal, se procedió de acuerdo al protocolo de (Roche, Basilea; Suiza).

a) Las muestras de tejido fueron homogenizadas en un politrón con una solución amortiguadora que para cada 100 ml contiene:

- 40 µl de un stock de PMSF 0.5 M (0.0871 g de PMSF y aforar con isopropanol)

- 0.115 g de KCl

- 0.06055 g de Tris HCl

- 1.5 ml de glicerol

Se afora con H₂O y se ajusta el pH a 7.4

Por cada 0.5 g de tejido se agregaron 1.5 ml de solución amortiguadora.

b) Las muestras se centrifugaron a 8750 g durante 20 minutos, se tomó el sobrenadante y se colocó con pipetas Pasteur en tubos para ultracentrifuga.

c) Se ultracentrifugaron a 100,000 g durante 60 minutos, el citosol se guardó en un vial para posteriormente utilizarse como fuente de bilirrubina.

d) El pellet se resuspendió en 400 µl de la misma solución amortiguadora, siendo necesario sonicar y agitar con el Vortex; las muestras se colocaron en hielo cuidando que no se elevara la temperatura.

9.3 Determinación de la actividad de glutatión S-transferasa

(De acuerdo al protocolo de Habig y col., 1974).

Preparación de reactivos:

a) Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y pH 6.5.

Para preparar 200 ml de solución amortiguadora de fosfatos:

68.5 ml de NaH_2PO_4 (0.2M) ó 1.89 g/68.5 ml.

31.5 ml de Na_2HPO_4 (0.2M) ó 0.895 g/31.5 ml

100 ml + 100ml H_2O = 200 ml de volumen total

b) Stock de GSH 150 mM: 6.15 mg por 1.0 ml de H_2O

c) Stock de CNDB 60 mM: 4.04 mg por 1.0 ml de etanol

A partir de estos stocks se prepararon las soluciones que se agregaron a la microplaca.

d) Solución de trabajo de GSH 3 mM: 140 µl del stock de GSH + 6.86 ml de solución amortiguadora de fosfato.

e) Solución de trabajo de CDNB 2 mM: 300 µl del stock de CDNB + 8.7 ml de solución amortiguadora de fosfato.

Procedimiento:

a) Descongelar en hielo los citosoles almacenados a -70°C . Diluir los citosoles de hígado (1:80) y colon (1:2) con solución amortiguadora de fosfato.

b) Programar el lector para microplaca a 345 nm, seleccionar la lectura de cinética enzimática a intervalos de 20 s con un tiempo total de 2 minutos.

c) Agregar a cada pozo 50 µl del citosol ya diluido

d) Agregar a cada pozo 100 µl de solución de GSH

e) Agregar a cada pozo 150 μ l de solución de CDNB, determinar la absorbancia a 340 nm a los 20 segundos después de agregar el último reactivo.

9.4 Determinación de la actividad de quinona reductasa

De acuerdo al protocolo de (Prochaska y Santamaría, 1992).

Preparación de reactivos:

a) Solución amortiguadora de trabajo pH 7.4 y 0.025M

Para preparar 500 ml de solución amortiguadora de trabajo:

1.97 g Tris-HCl

333 BSA (albúmina bovina)

3.3 ml de Tween 20 al 1.5%

500 ml de H₂O

Esterilizar la solución amortiguadora a través de filtración (poro de 0.22 micras) y almacenar a 4 °C.

b) Los cofactores fueron adicionados en fresco a 18 ml de solución amortiguadora de trabajo (para una placa):

10 μ l de FAD 6.2 mg/ml

9 μ l de NADP 38.3 mg/ml

100 μ l de G6P 42.3 mg/ml

30 unidades de G6PD

4.5 mg de MTT

Procedimiento:

a) Descongelar en hielo los citosoles almacenados a -70 ° C. Diluir los citosoles de hígado (1:80) y colon (1:2) con solución amortiguadora de fosfato.

b) Agregar 50 μ l de citosol ya diluido a cada pozo

c) Inmediatamente antes de la medición, adicionar 15 μ l de menadiona en acetonitrilo (8.6 mg/ml) a cada 15 ml del solución amortiguadora de trabajo y, una vez, disuelto adicionar cada pozo 200 μ l de la solución amortiguadora con los cofactores y la menadiona.

d) La reacción se detiene a los 5 minutos con 50 μ l de solución amortiguadora de fosfatos 0.025 mM (pH 7.4) conteniendo 20 μ l de dicumarol preparado en NaOH 1 N a una concentración de 20 mg/ml.

e) Se lee en el lector para microplaca a 610 nm

9.5 Determinación de hemo-oxigenasa 1

De acuerdo al protocolo de (Toth y col., 2003).

Preparación de reactivos:

a) Solución amortiguadora de homogenizado para 10 ml:

40 μ l de PMSF del stock (0.5 M)

0.115 g de KCl

0.0605 g Tris HCl

1.5 ml de glicerol pH 7.4

Procedimiento:

a) La pastilla se diluye para tener una concentración de 6-9 mg/ml de proteína y se agregan 100 μ l de esta solución a cada pozo de la microplaca.

b) Se adicionan 40 μ l de citosol proveniente de ratas sanas diluido apropiadamente para obtener una concentración de 10 mg/ml de proteína.

c) Se adicionan 160 μ l de un sistema reductor que contiene:

15 ml de solución amortiguadora de homogenizado, 100 μ l de MgCl 2 mM, 100 μ l NADPH 0.8 mM, 100 μ l G6P, 28.8 unidades de G6PDH y 1 ml de hemina 2.5 mM.

d) Se deja incubar 60 minutos, en oscuridad a 37 ° C y en agitación.

e) Se lee en el lector para microplaca a 460 y 530 nm.