



**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 de las infusiones de encino comestibles *Quercus sideroxylla*
y *Quercus durifolia* sobre marcadores histopatológicos y
moleculares en cáncer de colon**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Q.F.B. MARÍA FÁTIMA TRUJILLO ESQUIVEL

C.U.SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO, NOVIEMBRE 2010



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 de las infusiones de encino comestibles *Quercus sideroxylla* y *Quercus durifolia* sobre marcadores histopatológicos y moleculares en cáncer de colon

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta

Q.F.B MARÍA FÁTIMA TRUJILLO ESQUIVEL.

Dirigido por:

DRA. MINERVA RAMOS GÓMEZ

SINODALES

Dra. Minerva Ramos Gómez
Presidente

Dra. Nuria Elizabeth Rocha Guzmán
Secretario

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Vocal

Dr. Luis Miguel Salgado Rodriguez
Suplente

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Suplente



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


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma


Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y
-Posgrado

Centro Universitario, Santiago de Querétaro, Querétaro

Noviembre, 2010. México

*Este trabajo lo dedico a la persona más importante de mi vida, que me ha apoyado incondicionalmente y sin el cual este logro no hubiese sido una realidad: A mi esposo Jorge Mauricio Rangel Guerrero, gracias
Amor por estar a mi lado.*

Agradecimientos

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

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por ser la institución donde he podido cumplir mi desarrollo profesional.

A mi Directora de tesis, Dra. Minerva Ramos Gómez, por su apoyo en la realización del proyecto, por aceptarme como un miembro más de su grupo de trabajo, por la convivencia y además por compartirme sus conocimientos y por su ayuda en todos los aspectos.

A mi comité de tesis, Dra. Rosalía Reynoso, Dr. Luis M. Salgado, Dra. Nuria E. Rocha Guzmán y Dr. Eduardo Castaño por sus sugerencias y comentarios para la mejora de este proyecto y por su tiempo dedicado a la revisión de este escrito.

A los profesores del posgrado, por compartir sus conocimientos y ser pieza clave en la generación de nuestro espíritu como investigadores.

A mi familia por el apoyo moral que siempre me brindaron para seguir adelante y culminar esta etapa de mi formación como profesionista. A mi Padre (Raymundo) y a mi Madre (Norbertha) por sus palabras de aliento y por sus oraciones. Gracias.

A Estefanía, Alejandro (ñoñito), Jesús (ñoñis), Elisa por su amistad, ayuda y compañía durante todo este tiempo, gracias por ayudarme a ser mejor persona y compartir conmigo experiencias y conocimientos, por ser paño de lágrimas y apoyo durante los momentos de frustración y tristeza.

A mis compañeros de laboratorio Viri, Diego, Anita, Yuli por brindarme su amistad y permitirme compartir buenos momentos y pláticas amenas.

A todos mis compañeros de generación por todas las cosas buenas que pasamos juntos.

A todas las personas que no menciono pero que una forma u otra contribuyeron y estuvieron a mi lado.

RESUMEN

Las hojas de los encinos (*Quercus*, sp) son tradicionalmente usadas en México como alimento, y algunas infusiones tienen efectos anticancerígenos; sin embargo, esta propiedad aun no se ha comprobado. El objetivo fue estudiar el efecto anticancerígeno del consumo de infusiones de hojas de encino *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia* en un modelo de cáncer de colon. Se prepararon infusiones de *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia* y se determinó el contenido total de fenoles y flavonoides, y la capacidad antioxidante. La infusión de *Q. sideroxylla* mostró la mayor capacidad antioxidante (755.56 ± 29 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de hoja seca) y la mayor concentración de fenoles y flavonoides (35.15 ± 0.0 mg de ácido gálico y 22.34 ± 0.3 mg de (+)-catequina/g de hoja seca) comparado con *Q. durifolia*. Por HPLC, se identificaron en ambas infusiones tres de las principales catequinas reportadas para el té verde (epigalocatequina_galato, epicatequina y catequina). Posteriormente, las infusiones se administraron como única fuente de bebida a ratas macho Sprague-Dawley, en concentración de 1% (p/v) durante todo el periodo experimental. En la semana 4, las ratas recibieron 8 inyecciones s.c. de 1,2-dimetilhidrazina (21mg/kg de peso corporal) una vez por la semana. Después de 26 semanas, los animales fueron sacrificados y el colon fue removido para estudios histopatológicos y moleculares. Tanto la incidencia (31 y 73%) como el promedio de tumores (adenocarcinomas, 0.8 ± 0.41 y 2.0 ± 0.55) fueron significativamente más bajos en el grupo tratado con *Q. sideroxylla* comparado con el grupo 1,2-DMH, respectivamente ($p < 0.05$, por la prueba de χ^2), mientras que, la infusión de *Q. durifolia* no tuvo efecto protector en estos parámetros. Sin embargo, se observaron efectos adversos en el intestino delgado por el tratamiento con ambas infusiones. Por otro lado, la expresión de la proteína beta-catenina disminuyó significativamente (2.3 veces) en adenocarcinomas del grupo *Q. sideroxylla* comparado con los niveles encontrados en el grupo 1,2-DMH ($p < 0.05$, por la prueba de Dunnet). Los resultados sugieren que el consumo de infusiones de hojas de *Q. sideroxylla* posee efecto anticancerígeno contra el desarrollo de cáncer de colon; sin embargo, estudios toxicológicos posteriores son necesarios para descartar cualquier efecto adverso causado por el consumo regular de esta infusión.

(Palabras clave: encino, *Quercus* sp, infusiones, polifenoles, efecto anticancerígeno)

SUMMARY

Oak leaves (*Quercus* sp.) are traditionally used as food in Mexico, and some infusions have anticancer effect; however, this property has been scientifically tested not yet. The aim was to study the anticancer effect of infusions of edible oak species *Q. sideroxylla* and *Q. durifolia* in a colon cancer model. Leaf infusions of *Q. sideroxylla* and *Q. durifolia* were prepared and the total phenol and flavonoid contents, and total antioxidant capacity were determined. *Q. sideroxylla* infusion showed the highest antioxidant capacity (755.56 ± 29 $\mu\text{mol Trolox/g}$ of dried leaf) and contained the highest phenol and flavonoid concentrations (35.15 ± 0.0 mg of gallic acid and 22.34 ± 0.3 mg de (+)-catechin/g dried leaf, respectively) compared to *Q. durifolia*. By HPLC analysis, three of the major catechins reported for green tea (epigallocatechin_gallate, epicatechin and catechin) were identified in both infusions. Later, these infusions were administered as the sole source of liquid to male Sprague-Dawley rats, at a 1% concentration (w/v) for the entire experimental period. On week 4, rats received 8 s.c. injections of 1,2-dimethylhydrazine (21 mg/kg body weight) once a week. After 26 weeks, animals were sacrificed and colon was removed for histopathological and molecular studies. Both the incidence (31 vs 73%) and mean tumor (adenocarcinomas, 0.8 ± 0.41 vs 2.0 ± 0.55) were significantly lower in *Q. sideroxylla*-treated group compared with 1,2-DMH group, respectively ($p < 0.05$, by the χ^2 test). On the other hand, *Q. durifolia* infusion did not show protective effect on these parameters. However, adverse effects by both infusions were observed in the small intestine of treated rats. On the other hand, the expression level of beta-catenin protein was also significantly reduced by 2.2-fold in adenocarcinomas of the *Q. sideroxylla*-treated group compared with level found in the 1,2-DMH group ($p < 0.05$, by the Dunnet's test). Overall results suggest that the consumption of the leaf infusion of *Q. sideroxylla* had an anticancer effect against the development of colon cancer; however, further toxicological studies are required in order to rule out any adverse effect caused by the regular consumption of this infusion.

(key words: oak, *Quercus* sp, infusions, polyphenols, anticancer effect)

ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Índice	iii
Índice de cuadros	vii
Índice de figuras	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Cáncer	4
2.1.1. Generalidades	4
2.1.2. Proliferación y diferenciación celular	4
2.1.3. Desarrollo del cáncer	5
2.1.4. Bases moleculares del cáncer	6
2.1.4.1. Oncogenes	7
2.1.4.2. Genes supresores de tumor	8
2.1.5. Causas del cáncer	8
2.1.6. Estadísticas de cáncer en México	9
2.2. Cáncer de colon	11
2.2.1. Morfología y función del colon	11
2.2.2. Epidemiología del cáncer de colon	11
2.2.3. Factores pre-disponentes	12
2.2.4. Desarrollo de cáncer de colon	12
2.2.5. Bases moleculares del cáncer de colon	13
2.2.6. Marcadores en cáncer de colon	14
2.2.6.1. β -catenina	14
2.2.6.2. Proteína K-ras	15
2.3. Carcinogénesis colónica experimental	16
2.4. Quimioprotección del cáncer	19
2.5. Polifenoles	19

2.5.1.	Compuestos fenólicos	19
2.5.2.	Fuentes de obtención de polifenoles	20
2.5.2.1.	Té	20
2.5.2.1.1.	Té verde	20
2.5.2.1.1.1.	Efectos biológicos de los polifenoles del té verde	21
2.5.2.1.2.	Encinos	22
2.5.2.1.2.1.	Uso de los encinos	23
2.5.2.1.2.2.	Efecto biológico de los componentes del encino	25
III.	JUSTIFICACIÓN	27
IV.	HIPÓTESIS	28
V.	OBJETIVOS	28
5.1.	General	28
5.2.	Específicos	28
VI.	METODOLOGÍA	29
6.1.	Materiales	29
6.1.1.	Biológicos	29
6.1.1.1.	Animales	29
6.1.1.2.	Plantas	29
6.1.2.	Reactivos químicos	29
6.2.	Métodos	30
6.2.1.	Preparación del material biológico	30
6.2.2.	Preparación de infusiones de hojas de encino	30
6.2.3.	Cuantificación de fenoles y flavonoides totales	31
6.2.3.1.	Determinación de fenoles	31
6.2.3.2.	Extracción y cuantificación de taninos condensados	31
6.2.3.3.	Cuantificación de flavonoides totales	32
6.2.4.	Determinación de la capacidad antioxidante de las infusiones	32
6.2.5.	Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del	

perfil fitofenólico.	33
6.2.6. Modelo de carcinogénesis	34
6.2.7. Sacrificio de animales y obtención de órganos	35
6.2.8. Análisis macroscópico	36
6.2.9. Análisis histopatológico	36
6.2.10. Extracción de proteína total de tejidos congelados de colon	37
6.2.11. Cuantificación de proteína total	38
6.2.12. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes	38
6.2.13. Determinación de los niveles de expresión de las proteínas K-ras y β -catenina en adenocarcinomas del colon de ratas tratadas	39
6.2.14. Análisis estadístico	39
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES	41
7.1. Cuantificación e identificación de fenoles y evaluación de la capacidad antioxidante de las infusiones	41
7.1.1. Determinación de fenoles totales, taninos condensados y flavonoides totales en las infusiones	41
7.1.2. Cuantificación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	44
7.1.3. Evaluación de la capacidad antioxidante de las infusiones	48
7.2. Efecto quimioprotector de las infusiones de <i>Q. sideroxylla</i> y <i>Q. durifolia</i> sobre el desarrollo de cáncer de colon inducido con 1,2-DMH en ratas Sprague-Dawley	49
7.2.1. Ganancia de peso, consumo de alimento, consumo de líquidos y sobrevivencia de las ratas inducidas con el carcinógeno 1,2-DMH y tratadas con las infusiones de <i>Q. sideroxylla</i> y <i>Q. durifolia</i> al 1% (p/v)	49
7.2.2. Evaluación macroscópica del colon de ratas tratadas con 1,2-DMH e infusiones de <i>Q. sideroxylla</i> y <i>Q. durifolia</i>	55
7.2.3. Clasificación de tumores encontrados en el colon de ratas de los grupos tratados con 1,2-DMH y las infusiones de <i>Q. durifolia</i> y <i>Q. sideroxylla</i> al 1%	56

7.2.4. Evaluación histopatológica del colon de ratas tratadas con 1,2-DMH e infusiones de <i>Q. durifolia</i> y <i>Q. sideroxylla</i> al 1%	59
7.2.5. Análisis de la expresión de los marcadores moleculares K-ras y β -catenina por Western blot	69
VIII. CONCLUSIONES	75
IX. BIBLIOGRAFÍA	77
X. ANEXO I	86
XI. ANEXO II	91

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales causas de cáncer.	8
2	Principales características de los modelos de carcinogénesis de colon en roedores más usados para el estudio de quimioprotección.	17
3	Análisis del contenido fenólico del té verde por HPLC.	20
4	Especies de encino que presentan uso no maderable en México.	23
5	Identificación de compuestos fenólicos por HPLC en infusiones de <i>Q. sideroxylla</i> .	26
6	Diseño experimental del modelo animal de cáncer de colon.	34
7	Contenido de fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados.	42
8	Concentración de fenoles en las infusiones en estudio.	47
9	Capacidad antioxidante de infusiones de <i>Q. sideroxylla</i> y <i>Q. durifolia</i> .	49
10	Peso corporal de ratas Sprague-Dawley durante el estudio de carcinogénesis.	50
11	Efecto de las infusiones sobre el porcentaje de sobrevivencia de ratas Sprague-Dawley inducidas con 1,2-DMH al final del periodo experimental.	55
12	Distribución por zona de tumores en el colon de ratas de los grupos tratados con 1,2-DMH y e infusiones al 1%.	56
13	Clasificación de tumores encontrados en el colon de ratas tratadas con el carcinógeno 1,2-DMH e infusiones al 1%.	58
14	Porcentajes de incidencia de inflamación, displasia y adenocarcinomas encontrados en el colon de ratas tratadas con 1,2-DMH e infusiones al 1%.	65
15	Porcentajes de incidencia, número promedio y multiplicidad	

de adenocarcinomas en el colon de ratas inducidas con 1,2-DMH e infusiones al 1%.

67

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura		Página
1	Esquema del ciclo celular, fases que lo conforman y puntos de restricción.	5
2	Etapas múltiples en el proceso de carcinogénesis química.	7
3	Porcentajes de defunciones por tumores malignos por sexo según año de ocurrencia, 1998-2007.	9
4	Porcentajes de defunciones según localización del cáncer por sexo, 2006-2007.	10
5	Anatomía del colon.	11
6	Cambios morfológicos y moleculares durante la progresión del cáncer de colon.	14
7	Metabolismo de activación y conjugación de 1,2-DMH en el hígado e intestino.	18
8	Número total de especies de encino utilizadas en las categorías de uso no maderable.	24
9	Relación entre la parte utilizada de los encinos y el número total de especies aprovechadas.	24
10	Diseño experimental. Tipo de tratamiento, tiempos de dosificación tanto de tratamientos como de inducción con 1,2-DMH.	35
11	Tipos de tumores inducidos por 1,2-DMH en roedores.	36
12	Cromatograma correspondiente a los estándares de fenoles.	45
13	Cromatograma de la infusión de <i>Q. durifolia</i> al 2%.	45
14	Cromatograma de la infusión de <i>Q. sideroxylla</i> al 2%.	45
15	Cromatograma de la infusión de té verde al 2%.	46
16	Efecto de las infusiones sobre el peso corporal (g) de las ratas durante el período experimental.	51
17	Consumo de alimento de ratas bajo los diferentes tratamientos.	52

18	Consumo de líquido de las ratas bajo los diferentes tratamientos.	54
19	Ejemplos de lesiones encontradas en colon de ratas inducidas químicamente con 1,2-DMH.	57
20	Características histológicas de tejido colónico sano.	60
21	Características histológicas de células de tejido colónico sano y tratado con 1,2-DMH H.	61
22	Cortes histológicos de tejido normal e inflamado de colon de ratas tratadas con el carcinógeno.	62
23	Características histológicas de los diferentes tipos de displasia.	63
24	Características histológicas de los diversos tipos de adenocarcinomas encontrados en colon de ratas tratadas con 1,2-DMH e infusiones.	64
25	Expresión de la proteína β -catenina en adenocarcinomas de colon de ratas Sprague-Dawley con 1,2-DMH.	71
26	Expresión de la proteína K-ras en adenocarcinomas de colon de ratas Sprague-Dawley inducidas con 1,2-DMH.	73

I. INTRODUCCIÓN

En México, las enfermedades crónico-degenerativas son un problema de salud pública y, dentro de éstas, el cáncer constituye la segunda causa de muerte entre la población.

Dentro de los diferentes tipos de cáncer se puede 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.

Este padecimiento se relaciona con algunos factores como son la dieta, el estilo de vida, la predisposición genética y algunas patologías; dentro las cuales cabe destacar a las infecciones crónicas, el estreñimiento y la inflamación.

Con respecto a la dieta, estudios epidemiológicos han documentado que el consumo frecuente de frutas y verduras disminuyen el riesgo de padecer diferentes tipos de cáncer incluyendo el de colon (Chen y col., 2000; Chan y col., 2001). El efecto quimioprotector de estos alimentos se atribuye principalmente a los compuestos polifenólicos, los cuales están presentes en cantidades importantes en dichos alimentos.

Aparte de las frutas y verduras, los tés constituyen otra fuente importante de polifenoles. El té se obtiene a partir de las hojas de la planta *Camellia sinensis* y sus beneficios se han atribuido, en gran parte, a su alto contenido de catequinas, las cuales ejercen su acción por medio de: inducción de enzimas involucradas en la desintoxicación de carcinógenos, atrapamiento de especies reactivas de oxígeno y modificación de las cascadas de señalización, entre otros mecanismos. Dentro de las catequinas la más importante es la epigalocatequingalato, la cual ha mostrado capacidad de inhibición de la proliferación celular a través de la modulación de diversas proteínas involucradas en dicho proceso, lo que le confiere al té propiedades anticancerígenas.

Por otro lado, México posee una gran diversidad de plantas comestibles a partir de las cuales se pueden obtener infusiones con aparentes propiedades anticancerígenas; sin embargo, tales propiedades no se han comprobado sistemática y científicamente *in vitro* o *in vivo*, por lo que existe información limitada al respecto. Una de estas plantas son los árboles de encino (*Quercus* sp) o también conocidos como árboles de té. Las hojas del

encino *Quercus resinosa* son usadas en el norte de México para la preparación de una bebida refrescante, mientras que otros encinos se han utilizado por nativos mexicanos como Tepehuanos (rarámuri) con fines alimenticios; éstos recolectan las hojas de algunos encinos para hervirlas y secarlas para hacer tortillas o pinole (http://.piaichinh.org/index.php?page/el_alimento/2).

Recientemente, Rocha-Guzmán y colaboradores (2009) iniciaron investigaciones para determinar el efecto anticancerígeno de infusiones liofilizadas del encino *Q. resinosa* para lo cual evaluaron la capacidad antioxidante de estas infusiones, así como su efecto citotóxico *in vitro* en células HeLa de cáncer cérvico-uterino, encontrando que las infusiones poseen capacidad antioxidante alta e inducen degradación del DNA, efectos atribuibles a su contenido de compuestos fenólicos. Adicionalmente, estudios previos indican que infusiones de la corteza de la especie comestible *Q. durifolia* posee capacidad de atrapamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) mayor que la catequina lo que implica que el conjunto de polifenoles presentes en la corteza tienen mayor capacidad antioxidante que la catequina por si sola (Datos no publicados).

Otros estudios preliminares realizados por este mismo grupo de investigación muestran que el tipo de polifenoles de infusiones de hojas de la especie *Q. sideroxylla* es muy similar al observado para *Q. resinosa*. Lo anterior sugiere que las especies de uso normalmente alimenticio (*Q. sideroxylla* y *Q. durifolia*) podrían ser empleadas con fines nutraceuticos, lo cual sería de gran importancia dado que actualmente se busca incrementar el consumo de alimentos que no sólo poseen propiedades nutritivas sino que además proporcionen efectos benéficos a la salud.

Por lo anterior, las hojas del encino puede ser consideradas una fuente potencial de polifenoles y hasta ahora han sido poco estudiadas, por lo que es importante ampliar el conocimiento sobre sus posibles efectos biológicos realizando estudios *in vitro* e *in vivo* que nos ayuden a demostrar si el consumo de una infusión de las hojas de encino ejerce un efecto quimioprotector contra el cáncer de colon.

Para el estudio de las propiedades quimioprotectoras de algunos alimentos o sus componentes se han utilizado diferentes marcadores moleculares involucrados en el desarrollo de cáncer que se consideran blancos potenciales en la terapia contra esta patología, por lo que la modulación de estos marcadores por diversos componentes de la

dieta como los polifenoles ha sido el objetivo principal de un gran número de estudios *in vitro* e *in vivo*. Algunos de estos marcadores moleculares son las proteínas K-ras y β -catenina, cuya alteración está completamente ligada al proceso carcinogénico por lo que su modulación es pieza-clave para la prevención, bloqueo o tratamiento del cáncer.

II. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer

2.1.1. Generalidades

El cáncer es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células que no responden a los mecanismos que regulan el crecimiento celular y que tienen la capacidad de invadir y destruir otros tejidos. El cáncer se caracteriza por presentar múltiples mutaciones que provocan daños con los cuales una sola célula o grupo de células provenientes de un tejido particular pierden la habilidad para responder a los mecanismos de control que son muy importantes en el mantenimiento y desarrollo de los tejidos y del organismo completo (Clayson, 2000).

2.1.2. Proliferación y diferenciación celular

Las células de organismos multicelulares tienen como objeto mantener la integridad de los organismos, por medio de la proliferación y diferenciación celular. La proliferación es necesaria para crear un nuevo individuo o bien, reemplazar las células perdidas por desgaste, mal funcionamiento o por muerte celular programada (apoptosis). La base para que se lleve a cabo lo anterior es el ciclo celular. La progresión ordenada del ciclo celular se mantiene mediante una serie de mecanismos y, sobre todo, por un reloj interno (Biggs y col., 2000; Geoffrey, 2000).

El reloj del ciclo celular se regula por puntos de control o de restricción, en donde el ciclo celular puede detenerse temporalmente en respuesta a factores extrínsecos e intrínsecos (Albert y col., 1994) (Figura 1). Diversos cambios genéticos pueden presentarse cada vez que una célula se divide y dichos cambios tienen que ser reparados para evitar alteraciones en la replicación celular; de lo contrario, el cáncer puede surgir de la proliferación anormal de células con mutaciones (De Vita y col., 1999).

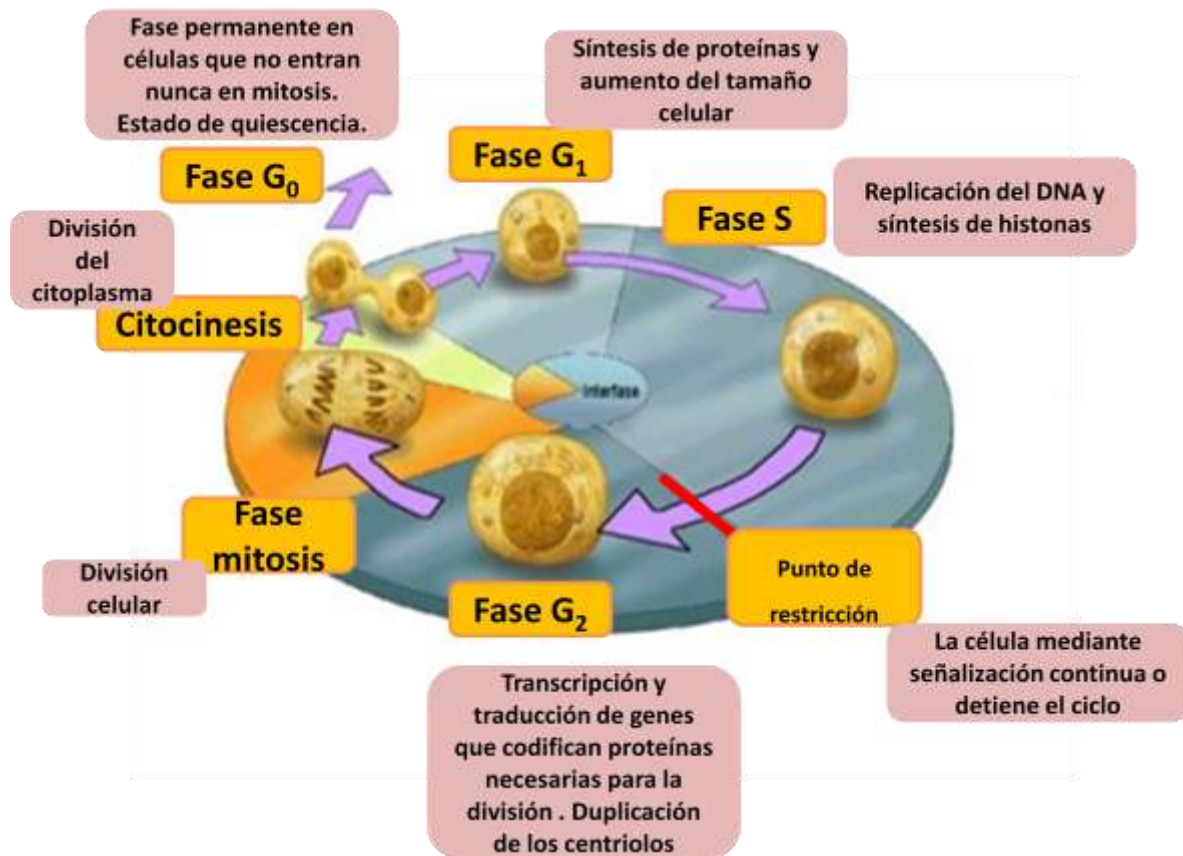


Figura 1. Esquema del ciclo celular, fases que lo conforman y puntos de restricción (http://biogenmol.blogspot.com/2008_08_10_archive.html).

2.1.3. Desarrollo del cáncer

La carcinogénesis es un proceso que involucra varias etapas y se origina después de que un gen es alterado por un carcinógeno o por errores en la copia y reparación de genes. Típicamente estos errores traen como consecuencia mutaciones en genes implicados en la regulación de la proliferación y crecimiento celular, lo que causa una rápida y progresiva proliferación de células que escapan a las restricciones del crecimiento normal creando una oportunidad para mutaciones adicionales y eventualmente esta clona de células crece originando un tumor.

En el modelo de carcinogénesis química la simple exposición a un carcinógeno no conduce inmediatamente al desarrollo de un tumor, sino que se requiere de una serie de cambios después del paso de iniciación inducido por el carcinógeno. Los pasos subsiguientes pueden ser producidos por el carcinógeno o bien por otra sustancia

conocida como agente promotor, el cual no causa cáncer por sí mismo, sino sólo promueve a las células iniciadas a dividirse. Por lo anterior, las etapas sugeridas del proceso de carcinogénesis son: exposición a un carcinógeno, iniciación, promoción, transformación y progresión (Figura 2) (Klaassen y col., 1996).

En la etapa de iniciación, la célula se expone a un carcinógeno a nivel de DNA, dando como resultado una alteración genética. Los carcinógenos biológicos (virus) también alteran el DNA pero por mecanismos menos conocidos (Fornos, 1997; Mazzocca y col., 2010).

La mayoría de los carcinógenos químicos a los que el hombre está expuesto son pro-carcinógenos y, por lo tanto, deben ser activados a carcinógenos finales. Las enzimas que intervienen en este metabolismo de activación están localizadas en las vías de acceso al organismo, como son la respiratoria y la digestiva, pero principalmente en el hígado (Arias, 2000).

Durante la etapa de promoción o expansión clonal, se presentan defectos en la diferenciación y crecimiento celular, así como resistencia a la toxicidad, lo que da como resultado una lesión pre-neoplásica. En la etapa de transformación, la lesión pre-neoplásica, debido a alteraciones adicionales en el DNA, da lugar a un tumor maligno (Curtis y col., 1998; Arias, 2000). La transformación y la progresión son etapas determinadas por células que tienen una gran inestabilidad genética, anomalías cromosómicas, expresión de sustancias en la superficie y actividad oncogénica (Darrell y col., 2006). La angiogénesis y los cambios en el estroma del tumor también son componentes de la progresión tumoral. Específicamente, en el cáncer de colon existe una evolución ordenada de lesiones pre-neoplásicas a tumores benignos y, finalmente, a cánceres invasivos.

2.1.4. Bases moleculares del cáncer

El cáncer se caracteriza por alteraciones heterogéneas en el cariotipo celular, las cuales incluyen la pérdida total o parcial de cromosomas, duplicaciones y translocaciones (Pretlow y col., 1994). El blanco principal del daño genético lo constituyen genes encargados de control del crecimiento celular y supervivencia celular como los proto-

oncogenes, que estimulan la proliferación celular, y los genes supresores de tumor, que la inhiben (Helen y Barnes, 2000).

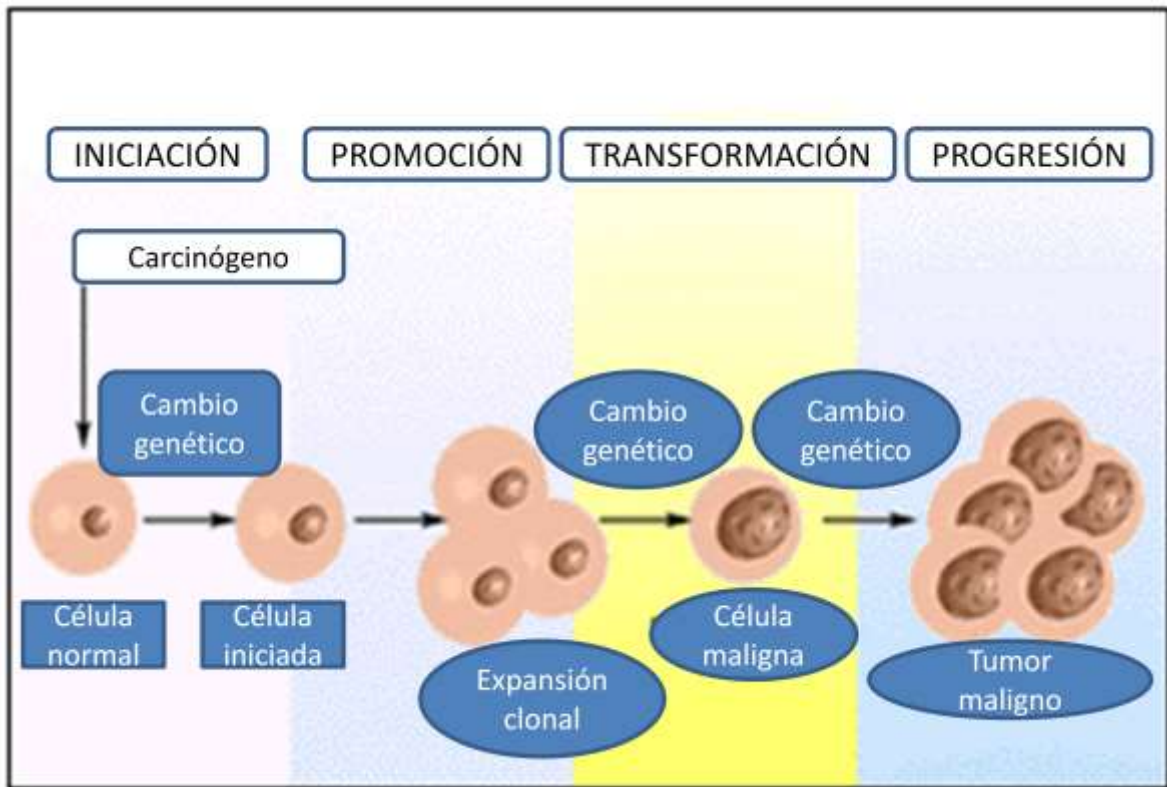


Figura 2. Etapas múltiples en el proceso de carcinogénesis química (Tomado de Klaassen y col., 1996; Peralta y col., 1997).

2.1.4.1. Oncogenes

Las células de los mamíferos son funcionalmente inertes hasta que reciben una señal extracelular que modifica algunas vías específicas, con alguna función también específica. Los proto-oncogenes codifican para proteínas con papeles fundamentales para controlar el crecimiento normal y el desarrollo, por lo tanto, la mutación, duplicación y la traslocación de estos genes que están relacionados con el control del crecimiento conducen, en la mayoría de los casos, al desarrollo de cáncer. Entre éstos se encuentran algunos receptores de factores de crecimiento, proteínas implicadas en traducción de señales y algunos factores de transcripción (De Vita y col., 1999; Griffiths y col., 2000).

Los oncogenes suelen ser alelos mutantes de los proto-oncogenes. Los oncogenes codifican para formas aberrantes de proteínas las cuales provocan funciones

celulares o actividades constitutivas no deseadas, tales como la proliferación celular no controlada característica de las células cancerosas (Pawson y Bernstein, 1990).

2.1.4.2. Genes supresores de tumor

Se ha sugerido que las células cancerosas presentan mutaciones que inducen inestabilidad genómica y, por tanto, aceleran la tasa de mutaciones de la misma. Algunas de estas mutaciones afectan a genes que codifican para componentes de los mecanismos de control del ciclo celular, llamados genes supresores de tumor. Estos genes determinan el orden de los eventos, así como la fidelidad e integridad de los sistemas de replicación y reparación del DNA que, de no llevarse a cabo adecuadamente, podría provocar un descontrol en la proliferación celular que a su vez se relaciona con el proceso de tumorigénesis (Peralta y col., 1997).

2.1.5. Causas del cáncer

Las causas del cáncer son multifactoriales, pero los cuatro factores más importantes en la carcinogénesis humana son: 1) el tabaquismo, 2) el alcoholismo, 3) las infecciones crónicas que conducen a inflamación y 4) la dieta (Cuadro 1) (Doll y Peto, 1981; Sugimura, 2000).

Cuadro 1. Principales causas de cáncer (Tomado de la Organización Mundial de la Salud. OMS, 2007).

Factor	Número de muertes estimadas por año
Tabaco	1.5 millones
Alcohol	351,000
Infecciones	340, 000
Dieta/inactividad física/obesidad	274, 000
Ocupacional	152, 000
Contaminación	71, 000
Sobreexposición a la luz UV	60, 000

2.1.6. Estadísticas de cáncer en México

A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de mortalidad y se le atribuyen 7.9 millones de las defunciones ocurridas en el 2007. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre 2005 y 2015 (Anuario Estadístico, 2007).

En México, se registraron 514,420 defunciones durante el 2007, 55.4% fueron hombres y 44.6% correspondió a mujeres; en general, los tumores malignos ocuparon el tercer lugar entre las principales causas de muerte del país con 68,815 casos (13.4% del total de defunciones registradas en el año) (Anuario Estadístico, 2007).

Con respecto a la tasa de mortalidad, de 1998 a 2007 se observa que las defunciones por tumores malignos tienden a incrementarse, siendo las mujeres las que presentan los porcentajes más altos en el periodo (Figura 3). En el 2007, el cáncer representó la tercera causa de muerte para las mujeres con 35,303 defunciones (15.4%), mientras que en los hombres representó la cuarta causa con 33,509 muertes (11.8%) del total de defunciones entre los varones.

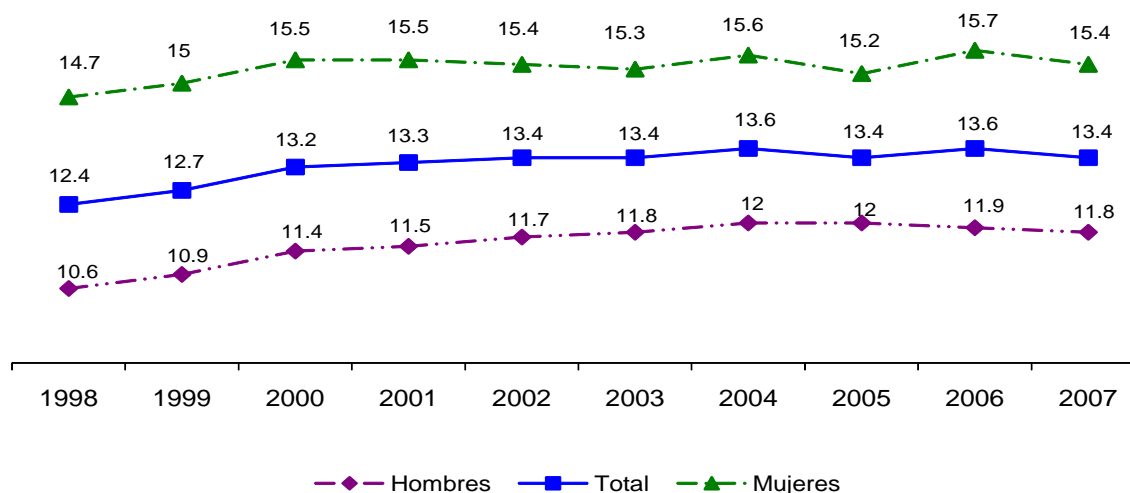


Figura 3. Porcentajes de defunciones por tumores malignos por sexo y por año de ocurrencia, 1998-2007. Nota: El porcentaje está relacionado con el total de defunciones registradas en cada año, en general y por sexo. Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales, 1998-2007. Bases de datos.

Algunos tipos de cáncer se localizan de forma diferenciada en mujeres y hombres, ya sea por factores biológicos o de riesgo, lo que influye en su prevalencia (Figura 4). En el año 2007, los tres principales tipos de cáncer que causaron fallecimientos en mujeres fueron: el de mama (13.8%), cuello del útero (12.1%) e hígado (7.6%) y en hombres cáncer próstata (15.7%), de tráquea, bronquios y pulmón (14%) y de estómago (9%). Si se comparan los porcentajes registrados durante el año 2006, se puede apreciar una ligera disminución de las muertes causadas por estos tipos de cáncer; sin embargo, en otros cánceres como el de colon hubo un ligero incremento (Figura 4).

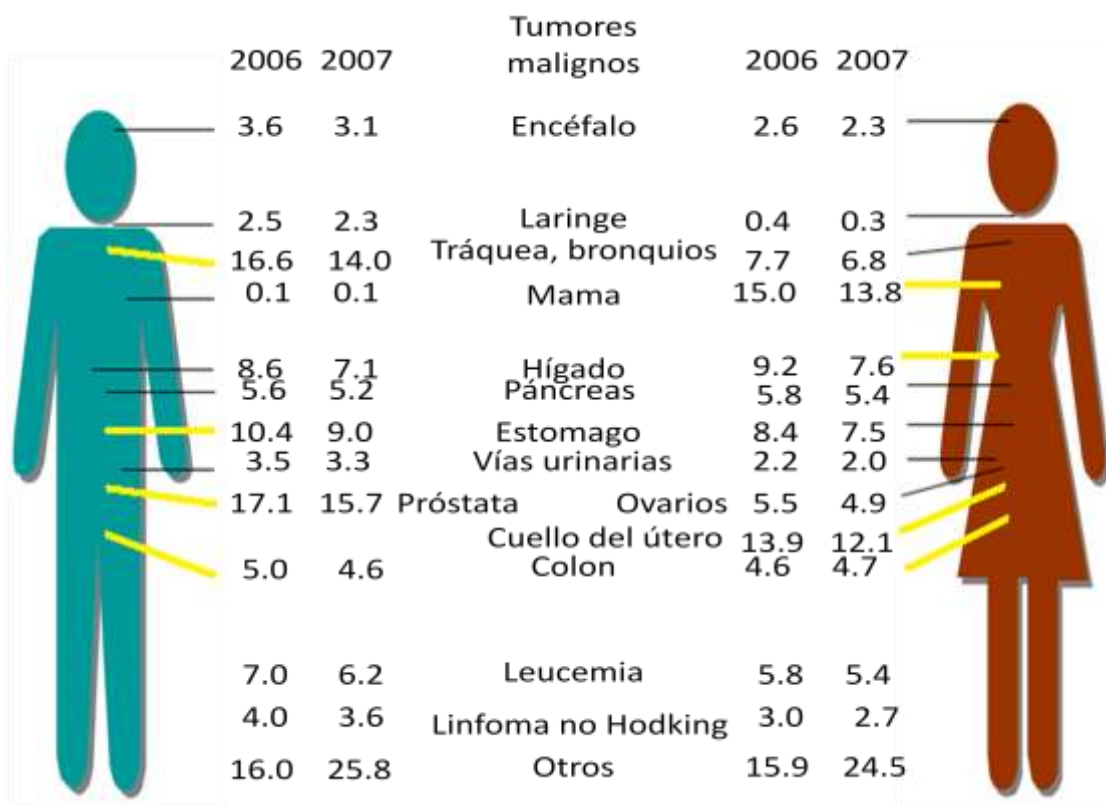


Figura 4. Porcentajes de defunciones según localización del cáncer por sexo 2006-2007 (Anuario Estadístico, 2007).

Por otro lado, la edad de la población está relacionada con el tipo de cáncer que padece. Los hombres mayores de 60 años presentan mayor incidencia de casos de cáncer de órganos digestivos como lo es el cáncer de colon y recto (CCR) que se presentan con mayor frecuencia a partir de los 50 años de edad, seguido del aparato respiratorio y órganos genitales; en la población menor de 20 años, resalta el cáncer del

tejido linfático, de órganos hematopoyéticos y tejidos afines, así como las lesiones en ojo, encéfalo y otras partes del sistema nervioso central y órganos genitales masculinos.

2.2. Cáncer de colon

2.2.1. Morfología y función del colon

El colon forma parte del aparato digestivo y se divide en apéndice, colon ascendente, transverso, descendente, sigmoideo y recto, y mide aproximadamente 1.5 m de largo (Figura 5). Los alimentos digeridos parcialmente entran en el colon procediendo del intestino delgado. El colon extrae agua y nutrientes de los alimentos y convierte el resto en desechos (materia fecal); los cuales pasan del colon al recto y luego al exterior del cuerpo por el ano (OMS, 2007).

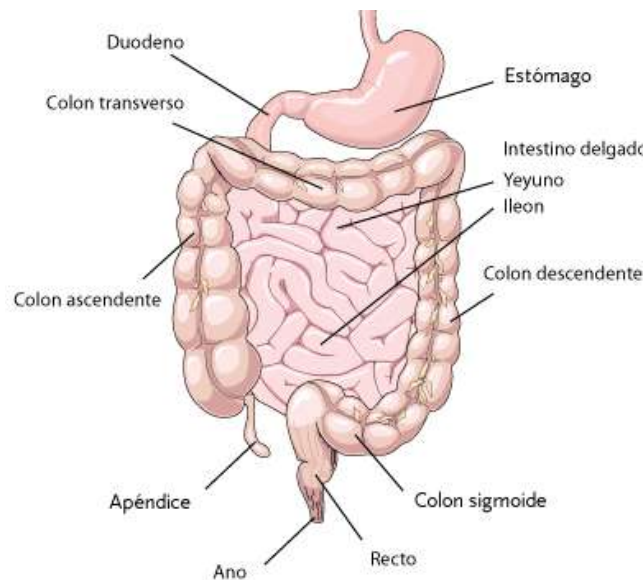


Figura 5. Anatomía del colon (<http://www.darmcontrole.nl> 2007).

2.2.2. Epidemiología del cáncer de colon

El cáncer de colon está asociado al nivel de desarrollo socioeconómico y al grado de occidentalización de los estilos de vida. La frecuencia de cáncer de colon varía de un modo notable entre diferentes poblaciones. Las tasas de incidencia son más elevadas en

los países desarrollados como los Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda, son intermedias en áreas de Europa y bajas en regiones de Asia, América del Sur y África.

El riesgo de cáncer de colon incluye tanto factores hereditarios como ambientales. Algunos de los factores ambientales que favorecen el desarrollo de este padecimiento son: el tabaquismo, el estrés, el sedentarismo y el consumo excesivo de bebidas alcohólicas; sin embargo, la dieta se considera como uno de los factores que más impacto tienen en el desarrollo de esta malignidad. Existen otros factores o condiciones fisiopatológicas, como la reactivación de carcinógenos o la inflamación, que también tienen un impacto importante sobre el desarrollo de esta patología.

Datos epidemiológicos sugieren que la ingesta de alimentos, como vegetales y plantas medicinales, reduce el cáncer de colon en animales de experimentación y humanos. La identificación de constituyentes de la dieta que ayuden a prevenir el cáncer de colon es un área de investigación muy importante.

2.2.3. Factores pre-disponentes

La investigación ha mostrado que personas con ciertos factores de riesgo tienen más probabilidad que otras de padecer cáncer de colon. Estos estudios han encontrado los siguientes factores de riesgo: 1) edad mayor de 50 años, 2) presencia o desarrollo de pólipos colorrectales, 3) antecedentes familiares de cáncer de colon, 4) alteraciones genéticas, 5) antecedentes personales de cáncer, 6) colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, 7) dieta inadecuada y 8) tabaquismo.

2.2.4. Desarrollo del cáncer de colon

La carcinogénesis de colon es un proceso que se lleva a cabo en varias etapas e inicia a partir de células colónicas o colonocitos normales, los cuales sufren mutaciones en genes relevantes (oncogenes y supresores de tumor) como resultado de la deficiencia de los sistemas de reparación de DNA dañados por genotóxicos. En el desarrollo del cáncer de colon se pueden distinguir las siguientes fases: displasia, adenomas, carcinoma *in situ* y metástasis. La primera indicación de un posible desarrollo de cáncer es una alteración ligera o moderada de la morfología de las células, denominada displasia. La lesión puede desaparecer espontáneamente en esta fase, e incluso a veces en la siguiente (adenoma).

La expresión carcinoma *in situ* se aplica cuando aparecen células con ciertas características como alteraciones en los núcleos y multiplicación celular anormal, pero sin que haya penetración de la membrana subyacente que las mantiene en el tejido de origen. Cuando el crecimiento celular anormal alcanza zonas situadas por debajo del tejido de origen, se considera que el cáncer es invasivo. A menudo el cáncer de colon se extiende a los ganglios linfáticos que drenan la zona y puede difundirse por sangre y propagarse al hígado o a los pulmones (Teague, 1990; OMS, 1995).

2.2.5. Bases moleculares del cáncer de colon

El desarrollo evidente de una lesión precursora “pólipo adenomatoso” ha permitido construir un modelo de los eventos genéticos secuenciales en el proceso de iniciación y progresión del cáncer de colon. 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).

El cáncer de colon esporádico (Figura 6) es el resultado de inestabilidad genómica; los dos principales tipos de inestabilidad genómica que contribuyen a la carcinogénesis de colon son la inestabilidad cromosomal y la inestabilidad microsatelital en un 85 y 15%, respectivamente. La inestabilidad cromosómica se deriva de la segregación anormal de cromosomas y contenido de DNA anormal (aneuploidia). Como consecuencia de lo anterior, la pérdida de material cromosomal (pérdida de heterocigosidad (LOH por sus siglas en inglés)) frecuentemente ocurre, contribuyendo a la pérdida de función de algunos genes importantes como los genes supresores de tumor siendo el caso el gen adenomatosis poliposis coli (*APC*, por sus siglas en inglés) y el gen *p53*, los cuales además pueden perder su funcionalidad por mutación. La pérdida de gen *APC* ocurre en etapas tempranas, por lo que a este gen se le ha denominado el “guardián” del colon (Figura 6). Durante el 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 oncogén *K-ras*. La pérdida en la función del gen *p53* ocurre tardíamente y se cree que es un evento definitivo que convierte el adenoma (tumor benigno) en carcinoma (tumor maligno) (Itzkowitz y Yio, 2004).

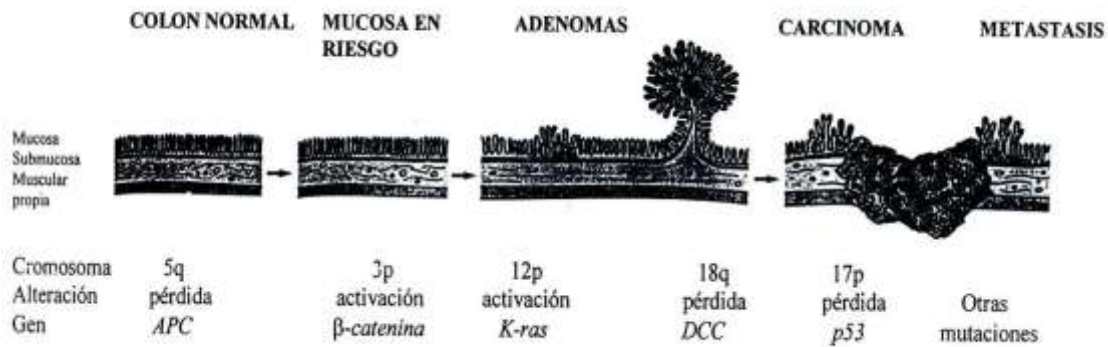


Figura 6. Cambios morfológicos y moleculares durante la progresión del cáncer de colon (Cotran y col., 2000).

2.2.6. Marcadores en cáncer de colon

Los tratamientos comúnmente usados contra el cáncer involucran el uso de costosas drogas, cirugías y radiación, lo que ha originado un aumento en el interés por la búsqueda de alternativas para la prevención y tratamiento de este padecimiento. Las dietas a base de vegetales, medicina herbal, té o infusiones han sido ampliamente estudiadas por su potencial en el campo de la quimioprotección (Watson, 2003).

En el cáncer de colon se han identificado diversas proteínas y genes como K-ras y β -catenina tanto en displasias, adenomas y adenocarcinomas, que son modulados por diversos componentes de la dieta como los polifenoles, por lo cual estos genes se emplean como marcadores moleculares del proceso carcinogénico y su modulación a través de diversos tratamientos es ampliamente estudiada para definir el efecto biológico de dichos tratamientos.

2.2.6.1. β -catenina

La proteína β -catenina es una molécula de unión a E-caderina en la membrana y sus niveles celulares son regulados por su degradación vía ubiquitinación-proteosoma (Orford y col., 1997), así como por fosforilación de sitios específicos realizado por la proteína APC en conjunto con la cinasa de serina/treonina sintasa de glucógeno 3 β (Glycogen syntase kinase-3 β , por su siglas en inglés) (Korinek y col., 1997).

La proteína β -catenina también funciona como un activador transcripcional cuando se encuentra acompañado con proteínas de unión a DNA como lo son algunos miembros de la familia Tcf (T-cell factors por sus siglas en inglés) (Behrens y col., 1996; Molenaar y col., 1996). El complejo β -catenina-Tcf regula la expresión de genes involucrados en vías importantes de proliferación celular y/o apoptosis (Korinek y col., 1997; Jeon y col., 1998).

La activación constitutiva de la vía β -catenina-Tcf, debida a la presencia de mutaciones en el gen *APC* o en el exón 3 del gen *CTNNB1* que codifica para la proteína β -catenina, son eventos importantes en la carcinogénesis de colon y trae como resultado la acumulación de β -catenina en citosol y núcleo (Behrens y col., 1996; Young y col., 1998). Lo anterior fue mostrado por Takahashi y colaboradores (2000) quienes observaron que en fosas crípticas aberrantes (FCA) hiperplásicas la localización de β -catenina se mantenía normal (en membrana); mientras que en FCA displásicas, adenomas y adenocarcinomas había una clara alteración de la localización, es decir, β -catenina se encontraba en citoplasma y núcleo cuando en condiciones normales se encuentra en membrana como se mencionó anteriormente. Estos autores también determinaron que las principales mutaciones en el gen *CTNNB1* se encontraban en la secuencia consenso para la fosforilación por GSK-3 β , por lo cual β -catenina se considera una proteína clave para inducir cambios displásicos tempranos y tardíos de todo el proceso carcinogénico.

2.2.6.2. Proteína k-ras

Las proteínas Ras son proteínas G monoméricas, también llamadas pequeñas GTPasas, en las que se han identificado más de 100 proteínas diferentes subdivididas en 5 subfamilias: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran, con masa molecular entre 20 y 40 kDa. Estas pequeñas proteínas ejercen gran variedad de funciones como la regulación de la expresión génica, proliferación celular, migración, organización del citoesqueleto, tráfico intracelular de vesículas y transporte de proteínas entre el núcleo y el citoplasma (Grande, 2003). Diversos estímulos extracelulares, incluyendo factores de crecimiento, promueven la formación de la forma activa GTP-Ras, la cual interactúa directamente con un miembro de la familia de cinasas de serina y treonina Raf y con la cinasa 3-fosfatidilinositol tipo I (PI3K). A su vez, Ras estimula el crecimiento celular por la vía de señalización Raf/cinasa

regulada por señales extracelulares (ERK, extra-cellular regulated kinase, por sus siglas en inglés) (Sheng y col., 1998).

Los estudios de carcinogénesis colónica en modelos animales son muy usados para elucidar los mecanismos y encontrar puntos de control importantes en la prevención del cáncer humano. En el colon de ratas se han documentado mutaciones frecuentes en el exón 1 del gen *K-ras* en fosas crípticas aberrantes (FCA) hiperplásicas y en adenocarcinomas grandes (> de 5 mm) inducidas con azoximetano (AOM), así como en cánceres humanos, sugiriendo que la activación constitutiva de la proteína K-ras promueve la proliferación celular. Las mutaciones en el gen *K-ras* ocurren generalmente en la segunda base del codón 12 (G:C a A:T) y se presentan desde etapas tempranas hasta etapas de adenocarcinomas o tardías del cáncer de colon, por lo que este gen puede ser utilizado como biomarcador para la detección temprana de esta patología (Takahashi y Wakabayashi, 2004).

2.3. Carcinogénesis colónica experimental

Es evidente, como en otros campos, que la única respuesta satisfactoria al problema de la neoplasia maligna es su prevención, por lo que actualmente se han desarrollado un gran número de estudios con la finalidad de identificar factores como la dieta que ayuden a la prevención del cáncer, para ello se han utilizado algunos modelos experimentales como: las líneas celulares y modelos animales (Fenton y Hord, 2006). Los modelos con roedores son particularmente usados para estudios sobre el desarrollo de cáncer del colon y especialmente para el estudio de actividad quimioprotectora de varios productos farmacológicos o naturales administrados *in vivo*. Los modelos de cáncer de colon con roedores pueden dividirse en modelos genéticos, en los cuales la carcinogénesis es espontánea, y modelos en los cuales la carcinogénesis se induce químicamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Principales características de los modelos de carcinogénesis de colon en roedores más usados para el estudio de quimioprotección (Femia y Caderni, 2008).

Modelos	Ventajas	Desventajas
Modelos genéticos: ratón <i>APC(Min/+)</i>	La carcinogénesis es espontánea y no requiere la administración de un carcinógeno. La carcinogénesis es facilitada por mutación en el gen <i>APC</i> , el cual es una pieza clave en la carcinogénesis de colon humano.	El cáncer predomina en el intestino delgado y no en el colon
Carcinogénesis inducida químicamente: modelos AOM/DMH	La carcinogénesis desarrolla a través de un proceso de múltiples etapas similar a la carcinogénesis humana. El cáncer se presenta principalmente en el colon. Las lesiones preneoplásicas son fácil de estudiar.	El cáncer es inducido con altas dosis de carcinógeno, lo cual no representa una fuente común de exposición humana.

Las ratas, como los humanos, desarrollan tumores epiteliales espontáneamente, pero el cáncer de colon es poco frecuente (Anisimov y col., 2005). Para la iniciación del cáncer de colon tanto en ratas como ratones se requiere agentes exógenos como la 1,2-dimetilhidrazina (1,2-DMH) y su principal metabolito azoximetano (AOM), los cuales son los carcinógenos más comúnmente empleados. La 1,2-DMH es un compuesto sintetizado químicamente para uso exclusivo de laboratorio, es un procarcinógeno ya que requiere de activación metabólica dentro del organismo, principalmente en hígado, para formar el carcinógeno final activo (Figura 7). Dicha activación implica la oxidación a azometano, un gas que a temperatura corporal aparece en el aire expirado de las ratas tratadas con 1,2-DMH. Una oxidación convierte al azometano en azoximetano (AOM) que entonces, mediante un proceso de N-hidroxilación, se convierte en metilazoximetanol (MAOM). El metilazoximetanol es químicamente inestable a temperatura corporal e *in vitro* se descompone espontáneamente en formaldehído, agua y nitrógeno. Durante esta descomposición se forma el agente alquilante metildiazonio (CH_3^+), llamado carcinógeno

final. Este último es una sustancia altamente reactiva que forma iones metil-carbono, que se cree son los responsables de las metilaciones de macromoléculas tanto *in vivo* como *in vitro*, modificando así el genoma de la célula, ocasionando eventualmente alteraciones del fenotipo celular, tales como la pérdida de diferenciación, invasividad o conducta proliferativa anormal. Finalmente, el carcinógeno es excretado primariamente por el pulmón y los riñones, los cuales eliminan el 50% de la dosis inyectada. Los principales metabolitos en el aire expirado son CO₂ y azometano, mientras que la orina contiene el carcinógeno inalterado y los metabolitos: azometano, AOM y MAOM.

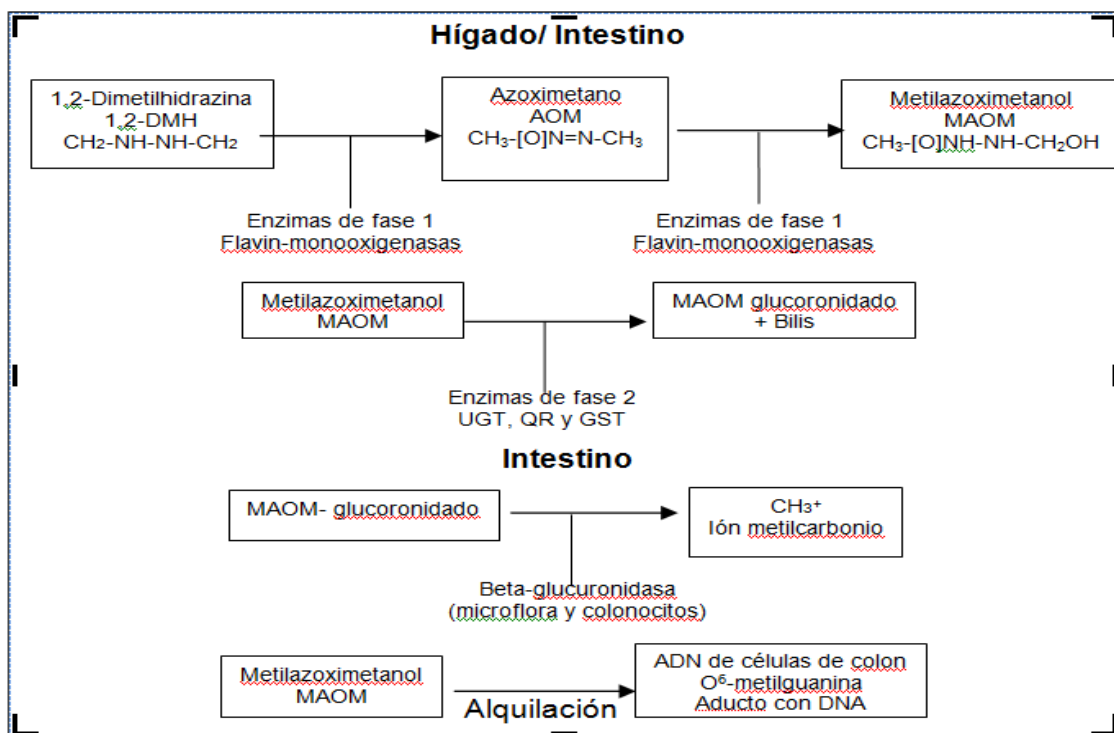


Figura 7. Metabolismo de activación y conjugación de la 1,2-DMH en el hígado e intestino (Corpet y Taché, 2002).

La administración subcutánea de la 1,2-DMH es la vía más utilizada, en dosis que van de 10 a 21 mg/Kg de peso corporal, por 12 a 20 semanas. Los tumores son generalmente múltiples, con semejanza próxima a los tumores humanos; además, la generación de tumores se acompaña de anorexia, pérdida de peso, heces sanguinolentas, obstrucción intestinal y, ocasionalmente, invaginación (Negrette y col., 2000).

Interesantemente, una gran cantidad de alteraciones genéticas y moleculares encontradas en el cáncer de colon humano como las mutaciones en β -catenina y k-ras, se han encontrado en tumores de modelos animales inducidos con AOM/1,2-DHM (Takahashi y col., 2000; Yamada y col., 2000; Femia y col., 2005 y 2008). Es por ello que este tipo de modelos experimentales son ampliamente usados para el estudio de la carcinogénesis de colon, así como para el estudio de compuestos con propiedades quimioprotectoras con capacidad para regular dichas alteraciones y revertir, bloquear o retardar el proceso carcinogénico.

2.4. Quimioprotección del cáncer

Desde tiempos remotos el hombre ha utilizado diferentes plantas con fines medicinales, basándose solamente en una tradición y con conocimientos empíricos. Sin embargo, hasta hace algunos años 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, para diseñar estrategias más efectivas de tratamiento (Eskin y Tamir, 2006). El concepto de quimioprotección se basa en el control de la aparición del cáncer por disminución, bloqueo o reversibilidad del desarrollo de la enfermedad a través de la administración de componentes naturales o sintéticos como los polifenoles.

2.5. Polifenoles

2.5.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que están representados en las plantas por un grupo muy amplio de estructuras químicas (más de 8000) y se caracterizan por presentar uno o más anillos aromáticos de benceno, sustituido con una función hidroxilo.

La diversidad estructural de los polifenoles es muy amplia y va desde los fenoles simples con una estructura molecular pequeña de seis átomos de carbono, hasta polímeros complejos como los taninos condensados y las ligninas con una estructura molecular $(C_6-C_3-C_6)_n$ y $(C_6-C_3)_n$, respectivamente. Los flavonoides son los polifenoles que

tienen una estructura química formada por 15 átomos de carbono (C₆-C₃-C₆), son los más ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Markham, 1982) y representan la mayor diversidad molecular ya que prácticamente todos los tejidos vegetales sintetizan y/o almacenan algún tipo de flavonoide.

2.5.2. Fuentes de obtención de polifenoles

2.5.2.1. Té

Como té se entiende a la bebida obtenida de las infusiones de las hojas de la planta *Camellia sinensis*. Esta definición se extiende a otras especies no relacionadas con ésta, llamados árboles de té, entre éstos podemos citar las hojas y la corteza del encino.

2.5.2.1.1. Té verde

El té verde se obtiene de las hojas de la planta *C. sinensis*, la cual es nativa del sur de Asia pero actualmente se cultiva en más de 30 países alrededor del mundo. El té es una bebida popular y es la segunda más consumida a nivel mundial después del agua, con un consumo *per capita* de 120 mL/día (Katiyar y Mukhtar, 1996). Esta bebida contiene una mezcla de diversos polifenoles, entre otros compuestos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis del contenido fenólico del té verde por HPLC (Tomado de Issa y col., 2007).

Compuesto	% (p/p)
Epicatequina	3.8
Epigalocatequina	8.7
Epicatequingalato	4.3
Epigalocatequin_galato	15.1
Ácido gálico	0.2
Cafeína	5.4

La popularidad del té verde se ha incrementado debido a sus efectos benéficos contra enfermedades crónicas como el cáncer. Estos beneficios se han atribuido en gran parte a su alto contenido de catequinas, operando a través de uno o más de los siguientes mecanismos: 1) inducción de varias enzimas involucradas en el metabolismo de las drogas y activación/destoxificación de carcinógenos, 2) inhibición de metabolitos de carcinógenos activos y mutágenos, 3) atrapamiento de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, 4) modificación de las vías de traducción de señales y 5) alteración de los puntos de control del ciclo celular y apoptosis (Dreosti y col., 1997; Tijburg y col., 1997; Mukhtar y Ahmad., 1999; Yang y col., 2000).

Suficientes experimentos y evidencia epidemiológica acumulada, principalmente en la década pasada, proporcionan argumentos convincentes de que los antioxidantes presentes en los tés verde y negro pueden reducir el riesgo de cáncer en una gran variedad de modelos animales (Katiyar y Mukhtar, 1996; Dreosti y col., 1997; Kohlmeier y col., 1997). La gran mayoría de los estudios muestran el efecto protector del té verde y sólo pocos del té negro (Katiyar y Mukhtar, 1996). Estos estudios muestran que el consumo de té y sus constituyentes polifenólicos ejercen protección contra cáncer inducido químicamente en pulmón, estómago, esófago, duodeno, páncreas, hígado, mama, colon y piel en ratones, ratas y hámster.

2.5.2.1.1.1. Efectos biológicos de los polifenoles del té verde

Se ha descrito que las propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas del té verde y sus catequinas se deben a sus habilidad para atrapar radicales libres y a sus propiedades antioxidantes (Mukhtar y Ahmad, 2000). Además, sus polifenoles interfieren con las cascadas de señalización que son responsables de la muerte y sobrevivencia celular como Ras/MAPK, causando aumento o disminución de proteínas involucradas en estas funciones. La gran mayoría de los efectos preventivos del té contra el cáncer son mediados por la (-)-epigallocatequingalato (EGCG), la cual es el principal constituyente del té verde (Cuadro 3) (Katiyar y col., 1996). Una taza (240 mL) de té verde contiene aproximadamente 200 mg de EGCG.

Sengupta y colaboradores (2003) observaron una disminución significativa en el número FCA y los niveles de peroxidación de lípidos en el colon de ratas Sprague-Dawley

inducidas con AOM y tratadas con infusiones de té negro (1 y 2% p/v). Así mismo, Jia y Han (2000) encontraron que el tratamiento con infusiones de té verde al 2% (p/v) de ratas Wistar con cáncer de colon inducido con 1,2-DMH disminuye significativamente la formación de FCA (148.25 veces) y la expresión de la proteína K-ras (2.07 veces) en tumores, comparadas con el grupo tratado únicamente con 1,2-DMH. En ambos estudios antes mencionados las infusiones se proporcionaron como única fuente de bebida.

Estudios epidemiológicos muestran que el consumo de más de 10 tazas de té al día reduce el riesgo de cáncer colorrectal en la población Japonesa. A este respecto, Shimizu y colaboradores (2008) observaron que incluso un consumo de 1.5 g de extractos de té verde (GTE), equivalentes a consumir 6 tazas de té al día, disminuye el riesgo de padecer cáncer colorrectal, ya que la incidencia de adenomas en pacientes control (no tratados con GTE) fue de 31% (20 de 65) y en el grupo tratado con GTE fue de 15% (9 de 60). Por lo tanto, el aporte de o el consumo de té parece una buena estrategia para el control del cáncer.

2.5.2.1.2. Encinos

Los encinos son árboles que pertenecen a la familia Fagaceae y a uno de los géneros mundialmente más importantes: *Quercus*. Este género se encuentra en casi todos los bosques templados del hemisferio norte, así como en algunas regiones tropicales y subtropicales del mismo; incluso existen algunas especies en hábitats más secos, en el sureste de Asia y nororiente de África. En América, el encino se localiza desde Canadá hasta Colombia, incluyendo Cuba.

Se reconocen dos centros de diversidad para el género. El primero se localiza en el sureste de Asia con alrededor de 125 especies (Valencia, 2004), el segundo se presenta en México, particularmente en las regiones montañosas, en donde forman parte importante de los bosques templados. El número de especies en México se desconoce con exactitud; algunos autores que estudian su distribución calculan que está entre 253 especies y otros calculan un número entre 135 y 150 especies.

El recurso forestal es importante en la ecología y economía de México, especialmente del estado de Durango, donde cerca de un 44% (5, 402, 825 ha) de la

superficie total está cubierta por bosques templados de coníferas, pino-encino (*Pinus-Quercus*), encino-pino o encino.

2.5.2.1.2.1. Uso de los encinos

Los estudios que han abordado el uso de los encinos en México resaltan principalmente su uso maderable debido a sus propiedades físicas, mecánicas y anatómicas; si bien este uso es ampliamente reconocido, por el contrario su utilidad no leñosa ha sido poco valorada, no obstante que en diversas comunidades étnicas y mestizas del país la obtención y elaboración de productos medicinales o alimenticios forman parte de su cultura.

En México existe una gran cantidad de especies de encinos que son utilizados con fines no leñosos, dentro de las cuales se encuentran las especies: *sideroxylla* y *durifolia* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Especies de encino que presentan uso no maderable en México (Adaptado de Luna y col., 2003).

Espece	Estado	Grupo étnico	Uso	Referencia
<i>Q. durifolia</i> Seem	Chihuahua	Tarahumara o Rarámuri	Alimenticio	Jiménez (1990)
<i>Q. sideroxylla</i> Humn	Chihuahua	Tepehuán	Alimenticio	Jiménez (1990)

El uso de los encinos se agrupa en cinco categorías: (1) medicinal, (2) alimenticio, (3) forraje, (4) artesanal y (5) taninos y colorantes (Figura 8). Para el uso medicinal se emplean casi todos los órganos de la planta: corteza, hojas, flores, raíces y agallas. Para el uso con fines alimenticios se emplean principalmente las bellotas, las hojas y la corteza, productos que enriquecen la dieta de las comunidades indígenas con proteínas, lípidos y carbohidratos. Sin embargo, llama la atención que este uso integral no se da dentro de cada grupo étnico, sino que la parte útil varía entre grupos y de un estado a otro. En general, las partes más utilizadas son las bellotas, la corteza y las hojas (Figura 9); la

elección de estas partes se debe a la mayor concentración de nutrientes y metabolitos secundarios (Luna y col., 2003).

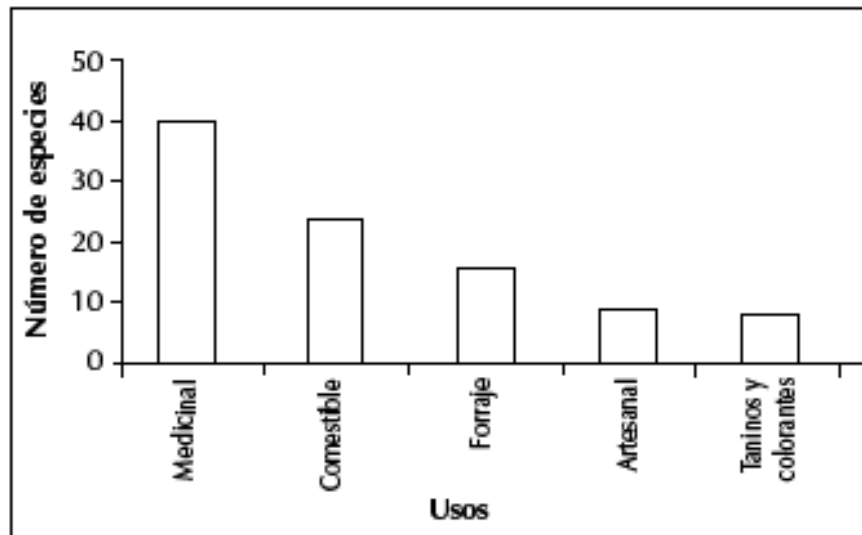


Figura 8. Número total de especies de encino utilizadas en las categorías de uso no maderable (Luna y col., 2003).

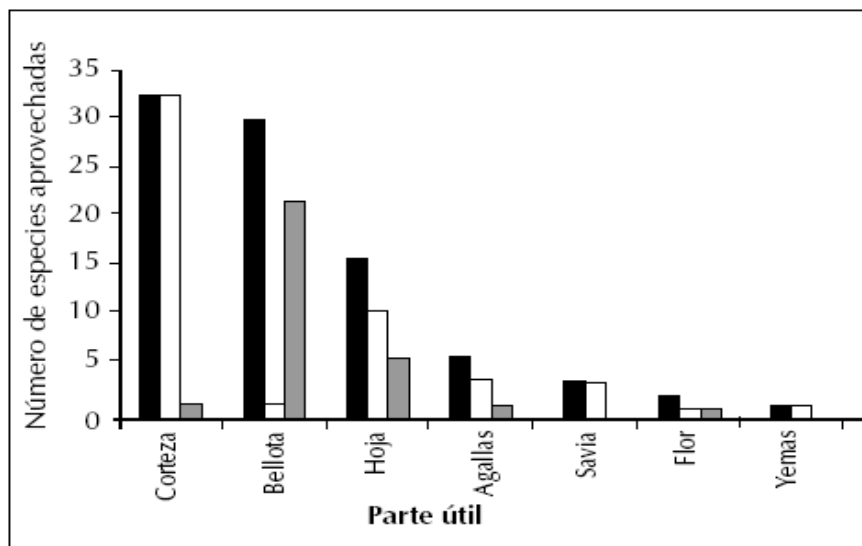


Figura 9. Relación entre la parte utilizada de los encinos y el número total de especies aprovechadas (barras negras), medicinal (barras blancas) y alimenticias (barras grises) (Luna y col., 2003).

Algunos ejemplos de usos alimenticios de las hojas de encino son: preparación de una bebida refrescante en el norte de México. Por otro lado, se ha reportado que los Tepehuanos añaden las hojas de encino para preparar tesguino, una bebida fermentada de maíz (Suárez, 2003); mientras que los Otomíes usan las hojas de encino con huevos revueltos; y los Tarahumaras hierven y secan las hojas de encino y las mezclan con maíz para hacer tortillas o pinole (http://www.piaichih.org/index.php?page/el_alimento/2). En Polonia, las hojas se utilizan como condimento en la preparación de pepinos en escabeche y a veces son usadas como base de pan de horno con el fin de darle sabor y de evitar que se pegue (Luczaj y Szymanski, 2007).

Antecedentes no documentados científicamente mencionan que el té de algunas especies de *Quercus*, en combinación con otras plantas como flores amarillas de *Solanum rostratum*, muestran efectos anticarcinogénicos en pacientes con cáncer gástrico, cuando éste es consumido como agua de beber.

2.5.2.1.2.2. Efecto biológico de los componentes del encino

La información acerca de los efectos biológicos de los encinos es muy limitada y escasa. Sin embargo, recientemente Rocha-Guzmán y colaboradores (2009) realizaron un análisis del perfil de compuestos fenólicos de las hojas de *Quercus resinosa* (Cuadro 5) y determinaron la capacidad antioxidante de extractos acuosos y metanólicos tanto de hojas jóvenes como maduras por el método de DPPH, encontrando que las hojas jóvenes poseen una mayor actividad de atrapamiento del radical estable DPPH en comparación con las hojas maduras, así como los estándares catequina y ácido gálico. Estos autores también demostraron mediante la fragmentación del DNA (electroforesis alcalina unicelular) que los extractos acuosos de hojas jóvenes de *Quercus resinosa* incrementan el proceso apoptótico en células HeLa de cáncer cérvico-uterino a través de mecanismos oxidativos y otros daños al DNA. Lo anterior sugiere que las infusiones de *Quercus* pueden servir como fuente potencial de polifenoles con actividad anticancerígena; sin embargo, los efectos biológicos que el género *Quercus* pudiera proporcionar aún no han sido completamente evaluados, lo que constituye una oportunidad de ampliar el conocimiento respecto a esta especie.

Como se muestra en el Cuadro 5, en las infusiones de *Quercus* se tiene la identificación de otros compuestos con actividad biológica ya reportada como la quercetina, el ácido elágico y el ácido gálico (Rivas-Arreola y col., 2010). Sin embargo, aún no se tiene el perfil fitofenólico de la especie comestible *Q. durifolia*, por lo que en el presente trabajo se incluirá como parte de los objetivos.

Cuadro 5. Identificación de compuestos fenólicos por HPLC en infusiones de *Q. sideroxylla* (datos sin publicar).

Polifenol
Ácido gálico
Catequina
Limocitrol
Ácido elágico
Glicósido de quercetina
Quercetina

III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de colon pasó de ser una enfermedad poco común en México a una de las 10 causas más frecuentes de muerte, en apenas décadas recientes. Además, el cáncer de colon ya no es un padecimiento exclusivo de la población de adultos mayores, sino que afecta a individuos cada vez más jóvenes, debido a que esta patología es consecuencia, principalmente, de malos hábitos alimenticios propiciados por el agitado ritmo de vida de la sociedad actual.

El consumo de frutas, verduras y algunas bebidas como tés e infusiones se ha asociado con una disminución de la incidencia de cáncer de colon, efecto atribuido a sus compuestos fenólicos, por lo cual el consumo de este tipo de alimentos debe de ser primordial. A este respecto en Europa, las plantas con uso tradicionalmente medicinal han encontrado en las bebidas como las infusiones o tés un camino adecuado para ser administradas en pequeñas cantidades, ya que no sólo proporcionan nuevos sabores sino también ingredientes que promocionan la salud (Gruenwald, 2009).

México posee una gran tradición en la preparación de infusiones a partir de plantas comestibles o medicinales contra diversas patologías como el cáncer y algunas de ellas, sobre todo las derivadas de plantas comestibles, pueden ser fuentes importantes de polifenoles por lo que pueden ser incorporadas a la dieta de forma segura al igual que el té verde. Sin embargo, las propiedades curativas de las plantas en México son poco estudiadas por lo que no han sido comprobadas científicamente. Una de estas plantas son los encinos del género *Quercus*, el cual es utilizado por nativos mexicanos con fines alimenticios y medicinales, y se le atribuyen efectos benéficos contra cáncer. Se ha mostrado que algunas especies de este género presentan propiedades antioxidantes, incluso superior a una de las catequinas del té verde. Por otro lado, estudios *in vitro* sugieren que extractos acuosos de hojas de encino inducen apoptosis. Sin embargo, los encinos han sido poco estudiados en lo que respecta a su efecto tanto *in vitro* como *in vivo*, así como a sus posibles mecanismos de acción.

Por lo tanto, el presente trabajo se enfocó a determinar la capacidad quimioprotectora contra cáncer de colon de una infusión preparada a partir de las hojas de encino.

IV. HIPÓTESIS

Las infusiones de hojas de encinos comestibles *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia* contienen compuestos biológicamente activos, los cuales pueden ayudar a disminuir la incidencia de cáncer de colon en un modelo experimental *in vivo*.

V. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar el efecto quimioprotector de las infusiones de encinos comestibles *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia* en un modelo experimental de cáncer de colon inducido químicamente en ratas.

5.2. Específicos

- Cuantificar e identificar el contenido de fenoles totales, así como evaluar la capacidad antioxidante de infusiones de hojas de *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia*.
- Evaluar el efecto de las infusiones de hojas de *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia* sobre la inflamación, displasia y adenocarcinomas en colon de ratas Sprague-Dawley tratadas con el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina.
- Determinar el efecto de las infusiones de hojas de *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia* sobre la incidencia, número promedio y multiplicidad de adenocarcinomas en colon de ratas tratadas con el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina.
- Determinar el efecto de las infusiones de hoja de *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia* a través de los marcadores moleculares K-ras y β -catenina.

VI. METODOLOGÍA

6.1. MATERIALES

6.1.1. Biológico

6.1.1.1. Animales

Se emplearon ratas macho Sprague-Dawley de cuatro semanas de edad adquiridas del bioterio Rismart S.A. de C.V.

6.1.1.2. Plantas

Se evaluaron infusiones de hojas de encino *Q. sideroxyla* y *Q. durifolia* obtenidas del estado de Durango y proporcionadas por el Cuerpo Académico de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos del Instituto Tecnológico de Durango.

6.1.2. Reactivos químicos

Los reactivos para la determinación de fenoles y flavonoides totales como Folin Ciocalteu, ácido gálico y catequina fueron marca Sigma (St. Louis, MI, EUA), el carbonato de sodio (Na_2CO_3), nitrito de sodio (NaNO_2), cloruro de aluminio (AlCl_3) e hidróxido de sodio (NaOH) fueron marca J.T. Baker (Estado de México, México). Similarmente, los reactivos para la determinación de la capacidad antioxidante como el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) y el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico) (ABTS), también fueron marca Sigma

Para la inducción de cáncer se utilizó el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (1,2-DMH) marca Sigma, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el cloruro de sodio (NaCl) marca J.T. Baker.

Los estándares para la cromatografía líquida de alta resolución: ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido 4-hidroxibenzoico, catequina, ácido clorogénico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siríngico, epicatequina, vainillina, ácido benzoico, ácido salicílico y epigallocatequingalato fueron marca Sigma.

Los reactivos para la extracción de proteína como el dodecil sulfato de sodio (SDS), NP40, NaCl_2 , cloruro de calcio (CaCl_2), EDTA, fluoruro de sodio (NaF), pirofosfato

de sodio (NaPP), vanadato de sodio (Na_3VO_4), cloruro de magnesio (MgCl_2), nonidet P-40 (NP-40), Hepes, Leupetina y glicerol fueron de las marca Sigma, J.T. Baker y BioRad (Hercules, CA, EUA).

Para la cuantificación de proteínas se empleó un kit de cuantificación de proteína mediante el método del ácido bicinonínico de la marca Pierce (Rockford, IL, EUA), empleando seroalbúmina bovina como estándar.

Los reactivos para electroforesis de proteína como la acrilamida, bis-acrilamida, tris, tricina, persulfato de amonio, glicina, temed, azul de Coomassie R-250, azul de bromofenol, 2-mercaptoetanol, etc., se adquirieron de Bio-Rad.

Los anticuerpos primarios se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, EUA) y BioVision Research Products (Mountain View, CA, EUA), los anticuerpos secundarios fueron de Zymed (San Francisco, CA, EUA) y Santa Cruz Biotechnology.

Los reactivos para Western blot, tween 20, solución bloqueadora, etc., se adquirieron en J.T. Baker, Sigma y Bio-Rad; el kit de quimioluminiscencia fue de la marca Millipore (Billerica, MA, EUA).

6.2. MÉTODOS

6.2.1. Preparación del material biológico

Las hojas colectadas de las dos especies de encino se secaron (T° ambiente), se molieron por medio de un molino moulinex y se tamizaron a través de una malla de poro No. 16 para homogeneizar el tamaño de partícula. Una vez que se tuvieron las hojas molida y tamizadas, las muestras se almacenaron bajo oscuridad para evitar la degradación de los compuestos fenólicos.

6.2.2. Preparación de infusiones de hojas de encino.

Para la obtención de las infusiones con una concentración de 1% (p/v), diariamente se pesaron 1 g de hoja molida y se adicionaron a 100 mL de agua purificada a 80 °C. Se dejó reposar durante 10 min y una vez transcurrido este tiempo, se enfrió y se filtró.

6.2.3. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales.

6.2.3.1. Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó usando el método de Folin-Ciocalteu (Nurmi y col., 1996). La cuantificación se realizó utilizando una curva estándar de ácido gálico (AG, 0-35 µg/mL). Para este fin, la curva se realizó a diferentes concentraciones de AG a partir de una solución estándar de 0.1 mg/mL (de 20 a 160 µL). Los volúmenes se completaron a 0.5 mL con la cantidad correspondiente de agua destilada. Para la reacción colorida se agregaron 250 µL del reactivo de Folin Ciocalteu 1 N y, finalmente, se añadieron 1250 µL de una solución de carbonato de sodio al 20% y se dejó reposar por 2 h. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm (Anexo I).

Para la determinación compuestos fenólicos en la muestra, se tomaron 20 µL de la infusión al 1% antes preparada o bien de una dilución según las necesidades y se completó el volumen a 0.5 mL con la cantidad correspondiente de agua destilada y se mezcló con 250 µL de reactivo de Folin (1 N), posteriormente se adicionó 1250 µL de Na₂CO₃ al 20% y se dejó reposar en la oscuridad por 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se leyó la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer Lambda 2S). El valor obtenido de la muestra se interpoló con la curva estándar de AG previamente realizada. El contenido de fenoles totales se expresó en miligramos equivalentes de AG/g de muestra.

6.2.3.2. Extracción y cuantificación de taninos condensados

La extracción y concentración de taninos condensados se determinó por el método de hidrocloreuro de vainillina (HCl-VM). Se pesaron 200 mg de hoja seca y se colocaron en un tubo con 10 mL de metanol, el tubo se protegió de la luz y se agitó a 40 rpm durante 24 h a 25 °C. Después de la incubación las muestras se centrifugaron a 4000 g por 10 min. Se tomaron 50 µL del extracto y se les adicionó 250 µL de una solución conteniendo vainillina al 1% en metanol y HCl al 8% en metanol. Después de 20 min de incubación a 30°C, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm. El blanco consistió en una mezcla de 50 µL del extracto más 250 mL de HCl en metanol

al 4%. Para el cálculo de la concentración se empleó una curva estándar de (+)CAT (0.2 mg/mL). Los taninos condensados se expresaron como mg equivalentes de (+)CAT/g de hoja seca.

6.2.3.3. Cuantificación de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales se llevó a cabo empleando el método de Liu y colaboradores (2002). La cuantificación se realizó usando una curva estándar de catequina (CAT, 0-35 µg/mL). Para este fin, la curva se realizó a diferentes diluciones de CAT desde 20 a 100 µL. A cada una de las cantidades de solución estándar de catequina se adicionaron 1250 µL de agua destilada y 75 µL de NaNO₂ al 5%, se dejó reposar por 6 min. Posteriormente, se adicionaron 150 µL de AlCl₃ 6H₂O al 10% y se dejaron reposar durante 5 min. Finalmente, se agregaron 500 µL de NaOH 1 M y se llevó a un volumen de 2500 µL de con agua destilada; las muestras se mezclaron y la absorbancia se leyó inmediatamente a 510 nm contra el blanco en un espectrofotómetro (Anexo I).

La determinación de flavonoides totales en las muestras consistió en mezclar 100 µL de la infusión al 1% antes preparada o bien de una dilución de ésta según las necesidades, 1250 µL de agua destilada y 75 µL de NaNO₂ (5%) y se dejó reposar por 6 min. Posteriormente, se adicionaron 150 µL de AlCl₃ 6H₂O (10%) a la mezcla y se dejó reposar durante 5 min. Finalmente, se agregaron 500 µL de NaOH (1 M) y 275 µL de agua, se mezclaron bien y la absorbancia se leyó inmediatamente a 510 nm contra el blanco en un espectrofotómetro. El valor obtenido de la muestra se interpoló en la curva de calibración estándar. El contenido de flavonoides totales se expresó como miligramos equivalentes (+)CAT/g de hoja seca.

6.2.4. Determinación de la capacidad antioxidante de infusiones

La capacidad antioxidante se determinó mediante el método ABTS (TEAC), en el cual los valores obtenidos se expresan en miliequivalentes de Trolox, compuesto análogo de la vitamina E (el ensayo se realizó utilizando un lector de microplacas a 734 nm con agitación de 5 segundos antes de la lectura y se analizó con el software SoftMax Pro). La solución ABTS se preparó con 5 mL de una solución acuosa de ABTS 7 mM y 88 µL de persulfato de potasio 140 µM, almacenándose en oscuridad durante 12 h. A continuación

se realizaron diluciones del radical ABTS^{•+} con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.7 a 1 ± 0.2 . Se realizó un curva de Trolox utilizando concentraciones de 0-800 μM (Anexo I).

El ensayo se realizó en microplaca utilizando como blanco 230 μL de agua, el control consistió de 20 μL de metanol más 230 μL de ABTS. Para determinar la capacidad antioxidante de la muestra se ocupó 20 μL de infusión más 230 μL de ABTS. Las lecturas se realizaron a 734 nm después de 1 min de añadir el radical ABTS. La curva estándar se obtuvo con diferentes diluciones de Trolox y los resultados se expresaron como μmol equivalentes de Trolox/g de hoja seca.

6.2.5. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del perfil fitofenólico.

Los ácidos fenólicos individuales y otros compuestos fenólicos se separaron y cuantificaron usando un sistema de HPLC con inyección automática (Agilent HP 1100 Systems, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA). El cromatografo se equipó con una bomba de gradiente cuaternario 1100, con un gasificador en línea y auto-muestreador, acoplado a un detector de doble longitud de onda UV/VIS (Agilent Software 1100, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Se utilizó un columna de fase inversa de zorbax octadecilsilano (150 x 4.6 mm, ODS-C18) operada a temperatura ambiente (Agilent Software 1100, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Los ácidos fenólicos se eluyeron a 1.5 mL/min con un gradiente que constó de dos sistemas de solventes: (a) ácido acético-agua (2:98, v/v) y (b) ácido acético-acetonitrilo-agua (2:30:68, v/v/v). La relación de la fase móvil fue 90% a y 10% b en un tiempo de 30 min. Los compuestos separados se identificaron a 280 nm mediante un detector de arreglos de diodos (DAD) y se cuantificaron sobre la base del tiempo de retención cromatográfica y co-elución. Se realizó una curva de calibración con cada uno de los siguientes estándares (1 mg/mL): ácido gálico, ácido protocatecoico, ácido 4-hidroxibenzoico, catequina, ácido clorogénico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siríngico, epicatequina, vainillina, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido ferulico, ácido cumárico y epigallocatequingalato. Para

homogeneizar el tamaño del pico obtenido se realizaron diluciones de cada estándar hasta que todos entraran dentro de un rango de picos apropiados. Una vez obtenidas las curvas de calibración de cada uno de los estándares, así como sus tiempos de retención, se procedió a analizar las muestras las cuales fueron preparadas a una concentración del 2% (p/v), bajo las mismas condiciones cromatográficas.

6.2.6. Modelo de carcinogénesis

Se utilizaron 53 ratas macho Sprague-Dawley (Rismart S.A. de C.V.) de cuatro semanas de edad. Las ratas se alojaron en cajas de plástico (4-5 por caja), se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad ($50 \pm 10\%$), ciclos día/noche de 12/12 h y temperatura adecuada ($23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) y se les proporcionó agua y alimento marca Zeigler (NIH-31, Rismart S.A. de C.V.) *ad libitum*. Después de una semana de aclimatación, los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos como se muestra en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Diseño experimental del modelo animal de cáncer de colon.

Grupo	N	Tratamiento	1,2-DMH
1	6	Agua	----
2	17	Agua	21 mg/kg
3	15	<i>Q. sideroxylla</i> 1%	21 mg/kg
4	15	<i>Q. durifolia</i> 1%	21 mg/kg

A partir de la semana 4, el grupo 1 (control negativo) se inyectó subcutáneamente con una solución de NaCl 0.9% semanalmente durante 8 semanas en los flancos derecho e izquierdo y los grupos 2-4 recibieron una inyecciones subcutánea de 1,2-DHM también durante 8 semanas como se muestra en la Figura 10. Como se muestra en la Figura 10, los grupos 2-4 recibieron una inyección subcutánea de 1,2-DHM también durante 8 semanas. La 1,2-DMH (21 mg/kg de peso corporal) se preparó en una solución conteniendo EDTA (37 g de EDTA por cada 100 mL) como estabilizador, NaCl al 0.9% y

tamponada a pH 6.5 con NaOH 1 N (Anexo II). Los grupos 3 y 4 adicional al carcinógeno, recibieron una infusión de hojas de encino *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia* al 1% (p/v), respectivamente, como única fuente de bebida. Los grupos control negativo y 1,2-DMH recibieron sólo agua como fuente de bebida durante el período experimental.

El peso de todos los animales se monitoreó semanalmente y el consumo de té y agua se midió diariamente.

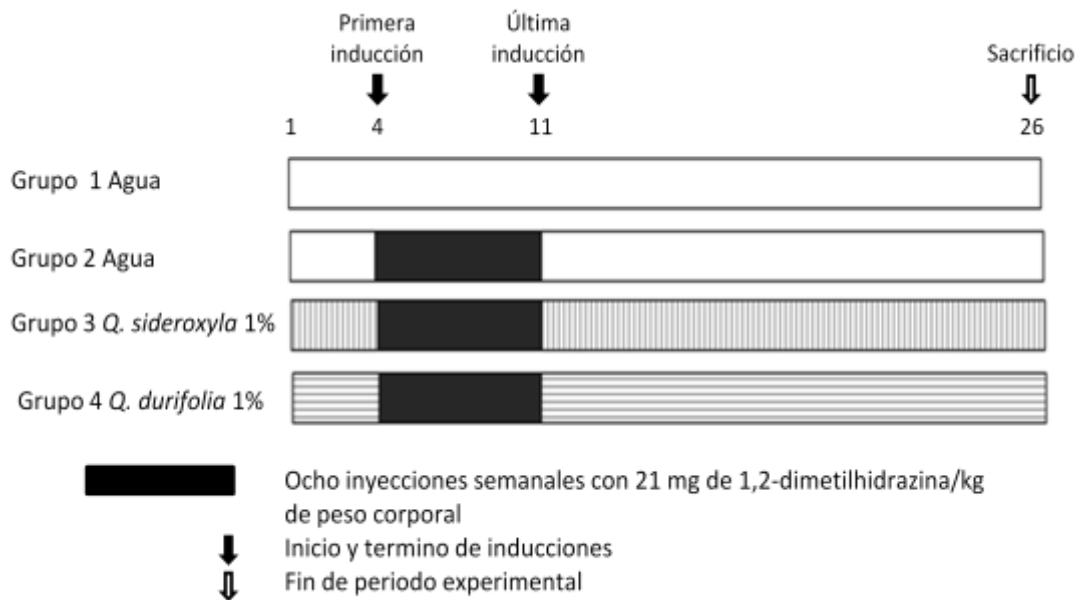


Figura 10. Diseño experimental del modelo animal.

6.2.7. Sacrificio de animales y obtención de órganos

El sacrificio de los animales se llevó a cabo utilizando una cámara de sacrificio con éter etílico para la asfixia de los animales y posterior incisión vertical desde el tórax hasta el ano, separando la piel y el músculo para tener acceso a las vísceras abdominales; se realizó el corte de la vena porta para asegurar la muerte clínica. El intestino se extrajo y se abrió longitudinalmente, se lavó con solución fisiológica estéril fría, y se dividió en sección proximal (colon ascendente) y sección distal (colon descendente); el hígado también se extrajo y se lavó con solución fisiológica estéril. Parte de las muestras obtenidas se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C para estudios moleculares y

la otra parte se fijó con formaldehído al 4% en solución amortiguadora de sales (PBS) para los estudios histopatológicos.

6.2.8. Análisis macroscópico

Se realizó la agrupación de todos los tumores u otras lesiones encontradas en el colon de las ratas, de acuerdo la clasificación realizada por Piñols (1995) (Figura 11) donde se indica que los tumores intestinales inducidos por 1,2-DMH pueden agruparse en las siguientes categorías macroscópicas:

Tumores sésiles A: masas que protruyen sobre la superficie mucosal y con un diámetro mayor que el de su unión a la mucosa y muy cercanos a la misma.

Tumores pendunculados B: pólipos con tallo claramente visible.

Tumores exofíticos C: tumores usualmente polipoides protuyendo hacia la luz; presentan margen elevado con una cavidad central y una masa subyacente lobulada.

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

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

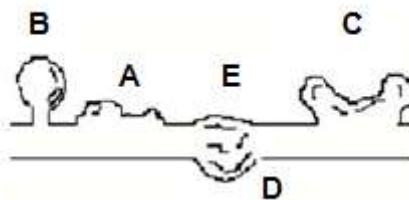


Figura 11. Tipos de tumores inducidos por 1,2-DMH en roedores (Piñols, 1995).

6.2.9. Análisis histopatológico

El colon se extrajo, se enjuagó con solución fisiológica estéril y posteriormente se escindieron muestras de tumores, tejido sano etc., tanto encontradas en zona proximal

como en zona distal. Estas muestras se fijaron en formaldehído al 4% en solución amortiguadora de sales pH 7.4. Posteriormente, se realizaron cortes del tejido en forma transversal de aproximadamente 3 ó 4 mm, se encapsularon y se sometieron a deshidratación por medio de un gradiente de alcoholes (agua destilada, etanol 70%, etanol al 90%, etanol absoluto y finalmente xilol) para la conservación de las estructuras del tejido. Después de la deshidratación, el tejido se embebió en parafina por medio de un Histoquinet.

Una vez parafinado el tejido se procedió a realizar cortes histológicos en un micrótopo con grosor de 5 μm , los cuales se fijaron en un portaobjetos por medio de un baño termostatzado y posteriormente se rehidrataron pasándolos nuevamente por un gradiente de alcoholes (xilol, etanol absoluto, etanol al 90%, etanol al 70% y agua). Una vez hidratados, los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (HIE), se cubrieron con resina para fijar al cubreobjeto y se observaron al microscopio (Olympus BX40F con aumentos de 100x y 400x), para así clasificar las muestras en tejido normal, inflamación, displasia y adenocarcinoma. Para el grado de displasia, la evaluación se realizó siguiendo la escala establecida por Riddell y colaboradores (1983) con algunas modificaciones acopladas a nuestras necesidades, clasificando la displasia como negativa y positiva (bajo grado, alto grado y carcinomas). Para el grado de inflamación se empleó la escala establecida por Cooper y colaboradores (1993), también con algunas modificaciones dependiendo del daño evaluado (inflamación positiva y negativa o tejido normal). El análisis histopatológico estuvo a cargo del Dr. Alonso Gallegos Corona, profesor investigador encargado del laboratorio de Histopatología, de la Facultad de Medicina, UAQ.

6.2.10. Extracción de proteína total de tejidos congelados de colon

A las muestras de tejidos sanos y tumores se les adicionó un volumen de amortiguador dependiendo del tamaño de la muestra, el cual contiene Hepes 500 mM, NaCl 1500 mM, NaPP 100 mM, MgCl_2 10 mM, NaF 500 mM, EDTA 20 mM, PMSF 60 mM, Na_3VO_4 200 mM, CaCl_2 25 mM, NaP-40 1%, glicerol 10% y SDS 0.1%, como concentraciones finales. Posteriormente, se homogenizaron por fricción empleando un homogeneizador manual, hasta que el tejido quedó poco visible. Las muestras se

incubaron 45 min a 4°C con agitación y se centrifugaron a 4°C a una velocidad de 35,000 g durante 60 min. Finalizado este periodo, el sobrenadante se colectó y se congeló a -70 °C para la cuantificación de proteína total.

6.2.11. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteína del extracto total se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA), utilizando albúmina bovina como estándar (Anexo II). Se realizaron diluciones 1:50 de los extractos totales de adenocarcinomas y tejido normal. Posteriormente, se colocaron 50 µL de la dilución de cada una de las muestras en microplacas de 96 pozos (tres pozos por muestra), y se agregaron 250 µL de la solución de trabajo del kit BCA en cada pozo. Se dejaron reposar las microplacas durante un tiempo de 30 min a 37 °C. Finalmente, las muestras se leyeron en el lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Microplate Reader (Molecular Devices Co., Sunnyvale, EUA) a una longitud de onda de 562 nm, y los resultados se analizaron con el software Pro Ver.4.7.1 (Molecular Devices Co., Sunnyvale, EUA).

6.2.12. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

La separación de las proteínas se realizó por electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida al 10%. La muestra se preparó adicionando un volumen igual de solución digestora (2X) y β-mercaptoetanol a una concentración final de 5% y dejándola hervir por 5 min. Posteriormente, se cargaron 100 µg de proteína por pozo y el gel se corrió a 120 V por un tiempo aproximado de 3 h, empleando una solución amortiguadora superior que contenía Tris 0.1 M, Tricina 0.1 M y SDS 0.1% y una inferior con Tris-HCl 0.2 M pH 8.9 (Anexo II).

Finalmente, el gel se tiñó con azul de Coomassie R-250, con la finalidad de revelar las bandas de las proteínas y verificar la integridad de las mismas.

6.2.13. Determinación de los niveles de expresión de las proteínas K-ras y β -catenina en adenocarcinomas del colon de ratas.

Las proteínas del gel se transfirieron a una membrana (Immun-blot PVDF Membrana) por medio de una cámara de transferencia semiseca (Trans-Blot) a 15 V por 20 min, para lo cual se utilizó una solución amortiguadora de transferencia de Tris 0.05 M y glicina 0.04 M. Posteriormente, la membrana se bloqueó con una solución de proteína de leche al 10% en TBS-T (10 mM tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) durante 1.3 h a T° ambiente. Pasado este tiempo, la membrana se incubó durante 3 h en presencia de los anticuerpos primarios anti-K-ras (1:4000), anti- β -catenina (1:4000) y anti- β -actina (1:2000) diluidos en leche bloqueadora al 5% en TBS; posteriormente, la membrana se lavó 6 veces con TBS-T durante 5 min, 2 veces por 10 min y 2 veces con leche bloqueadora al 5% en TBS. Una vez realizados los enjuagues, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (1:7000, 1:5000 y 1:7000 respectivamente), a T° ambiente por 1 h. La membrana se lavó 6 veces con TBS-T por 5 min y 2 veces por 10 min. Para la preparación de soluciones ver Anexo II.

Para el revelado de las bandas de interés, la membrana se cubrió con solución de quimioluminiscencia (Kit de Quimioluminiscencia, Millipore) durante 5 min y se expuso a una placa fotográfica por 30 s. Para análisis de las bandas se utilizó el software ImageJ Analysis con el cual se calculó la intensidad relativa, usando β -actina como punto de comparación común; para esto, se dividió la intensidad absoluta de la banda correspondiente a la muestra entre la intensidad absoluta de β -actina. Finalmente, los resultados se expresaron como unidades arbitrarias (UA).

6.2.14. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como las medias \pm el error estándar (EE) o desviación estándar (DE). Para el análisis de los resultados de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante se empleó la prueba de t de Student ($p < 0.05$). Para los resultados de cuantificación de fenoles por HPLC se empleó la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Para determinar las diferencias estadísticas en la ganancia de peso, consumo de agua/té y alimento, la intensidad de la expresión de proteínas, el número promedio y multiplicidad de

adenocarcinomas, se aplicó el estadístico de ANOVA ($P < 0.05$), seguido de una comparación entre tratamientos por el método de Dunnet. Los resultados de incidencia de adenomas y adenocarcinomas, así como el grado de displasia e inflamación, se reportan mediante tablas de contingencia utilizando la prueba de χ^2 con un nivel de confianza del 95%.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Cuantificación e identificación de fenoles y evaluación de la capacidad antioxidante de las infusiones.

Actualmente no existen trabajos que reporten el contenido total de fenoles y flavonoides, ni tampoco de la capacidad antioxidante de las infusiones obtenidas a partir de las especies de encino comestibles del género *Quercus* en estudio. Por lo que el primer objetivo de este trabajo consistió en la cuantificación e identificación de estos compuestos en las infusiones y la evaluación de la actividad antioxidante.

7.1.1. Determinación de fenoles totales, taninos condensados y flavonoides totales en las infusiones.

Los compuestos fenólicos parecen ser los antioxidantes que tienen mayor importancia en el efecto anticarcinogénico derivado de las infusiones de plantas; estos antioxidantes se encuentran en una gran variedad y su concentración también varía de modo considerable incluso entre plantas de la misma especie. Por lo anterior, es importante determinar el contenido de fenoles en las infusiones para predecir su posible efecto *in vivo* ya que varios estudios han demostrado una fuerte asociación entre estos dos parámetros (contenido total de fenoles y efecto biológico *in vivo*). Según Belitz y Grosch (1988), los ácidos fenólicos como el ácido gálico (AG) son abundantes en casi todos los vegetales, por lo que en este estudio se consideró el AG como referencia en la cuantificación de fenoles, aunque no como valor absoluto para la cantidad contenido en la planta.

Las infusiones se prepararon adicionando 1 g de hoja por cada 100 mL de agua a 80 °C y dejándolas reposar por 10 min. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 7. El contenido de fenoles totales para la infusión de *Q. sideroxylla* fue de 35.15 mg equivalentes de AG/g de hoja seca lo que representa más del 130% del contenido en la infusión de *Q. durifolia* (15.42 mg equivalentes de AG/g de hoja seca), siendo esta diferencia estadísticamente significativa. El valor obtenido para la infusión de *Q. sideroxylla* se encuentra dentro del rango de 33-90.27 mg de AG/g de materia seca

reportado por Erturk y colaboradores (2010) en un estudio realizado con diferentes variedades de té verde, lo cual nos indica que probablemente la infusión de *Q. sideroxylla* es igual o similar al té verde, por lo que podría conferir un efecto quimiopreventivo. Las diferencias en las concentraciones de fenoles de las infusiones en estudio predicen que la infusión de *Q. sideroxylla* podría presentar una capacidad antioxidante mayor a la infusión de *Q. durifolia*.

Cuadro 7. Contenido de fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados.

Infusión	Fenoles totales ^c	Flavonoides totales ^d	Taninos condensados ^e
<i>Q. sideroxylla</i>	35.15 ± 0.02 ^a	22.34 ± 0.3 ^a	55.38 ± 1.3 ^a
<i>Q. durifolia</i>	15.42 ± 0.20 ^b	13.13 ± 0.2 ^b	32.00 ± 2.6 ^b

^c resultados expresados en mg equivalentes de AG/g de hoja seca.

^d resultados expresados en mg equivalentes de (+)CAT/g de hoja seca.

Resultados expresados en mg equivalentes de (+)CAT/g de hoja seca.

N=3. Los resultados son la media de 3 experimentos con 3 repeticiones ± EE. a y b por columna indican diferencia estadística significativa por la prueba t de Student (p<0.0001).

Algunas especies de encino poseen una alta concentración de taninos, por lo cual son utilizados para la extracción de estos compuestos para su utilización en la industria. Algunas especies de encino poseen una alta concentración de taninos, por lo cual son utilizados para la extracción de estos compuestos en la industria. (<http://www.botanical-online.com/plantasvenenosas.htm#taninos>). Sin embargo, el consumo de dichos compuestos o de alimentos que los contienen interfiere con el proceso de aprovechamiento de nutrientes a través de la inhibición de las enzimas encargadas de la degradación de proteínas y glúcidos, lo que provoca un efecto antinutricio (Griffiths, 1979; Horigome y col., 1988; Liener, 1990; Silanikove, 1996). A este respecto, varios estudios realizados en ratas, pollos y ganado han mostrado que una dieta prolongada y alta en taninos perjudica la digestibilidad de las proteínas y de los carbohidratos y reduce el crecimiento, la energía metabolizable y la biodisponibilidad de los aminoácidos (Rostango, 1972). Por lo anterior, la determinación de la concentración de taninos fue importante en

este trabajo para descartar la posibilidad de daño en los animales por el consumo prolongado o crónico de las infusiones. El Cuadro 7 muestra que la concentración de taninos para la infusión de *Q. sideroxylla* fue mayor (55.38 ± 1.3 mg equivalentes de (+)CAT/g de hoja seca) en comparación con la infusión de *Q. durifolia* (32.00 ± 2.6 mg equivalentes de (+) CAT/g de hoja seca). Estos resultados sugieren que probablemente el consumo taninos a través de las infusiones no representa peligro para los animales, ya que de acuerdo a lo reportado en algunos trabajos con té verde, aun con una mayor concentración de taninos éste no causa ningún efecto adverso en los animales de experimentación.

Como se mencionó anteriormente, los efectos biológicos benéficos del té se atribuyen a su contenido de fenoles, pero principalmente a los flavonoides. Diversos flavonoides se han reportado en té verde y negro y los más importantes son las catequinas: (-)-epigallocatequina 3-galato (EGCG), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina (EC), (-)-epicatequina 3-galato (ECG) y (-)-catequina (C). Sus efectos biológicos están dados por su fuerte actividad antioxidante y anticancerígena (Graham, 1992; Yang y col., 2001), por lo cual la determinación de este grupo de compuestos es importante. La cuantificación se realizó empleando catequina (CAT) como referencia, ya que este flavonoide es uno de los componentes mayoritarios presentes en los vegetales (Madhavi y col., 1996).

Los valores de flavonoides obtenidos se muestran en el Cuadro 7. Para la infusión de *Q. sideroxylla* se obtuvo un valor de 22.34 mg equivalentes de (+)CAT/g de hoja seca, siendo este valor estadísticamente mayor al obtenido para *Q. durifolia* (13.26 mg equivalentes de (+)CAT/g de hoja seca); expresado en porcentaje, la infusión de *Q. sideroxylla* posee 72% más flavonoides en comparación con la infusión de *Q. durifolia*. Las concentraciones de flavonoides de ambas infusiones se encuentran dentro del intervalo de 4.7-204 mg de (+)CAT/g de hoja seca reportado por Henning y colaboradores (2003) para diferentes tipos de té, entre los que incluyeron té verde y negro. Retomando los valores de fenoles obtenidos para ambas infusiones (35.15 y 15.42 mg equivalentes de AG/g de hoja seca para *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia*, respectivamente) se encontró una correlación directa con el contenido de flavonoides ($R^2 = 0.8537$ y $R^2 = 0.8864$,

respectivamente, $p < 0.0001$), es decir, a mayor concentración de fenoles mayor concentración de flavonoides.

7.1.2. Cuantificación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El efecto biológico de una infusión dependerá en gran medida de la concentración de fenoles, pero específicamente del tipo de fenoles que contenga. Se ha visto que el té verde tiene alta capacidad antioxidante debido a su elevado contenido de ácido gálico y de las 5 catequinas (EGCG, EGC, EC, ECG, y C) antes mencionadas. Por ello, el tipo de flavonoides contenido en una infusión es relevante, ya que la capacidad antioxidante de cada uno de estos polifenoles depende de su estructura química. Por lo anterior fue de importancia en este trabajo determinar el perfil fenólico de las infusiones de *Q. sideroxylla*, *Q. durifolia*, así como la concentración de cada fenol y flavonoide identificado a través de la técnica de HPLC, incluyéndose también una infusión de té verde con fines comparativos.

Las Figuras 12, 13, 14 y 15 muestran los cromatogramas obtenidos para los 15 estándares empleados, las infusiones de *Q. durifolia*, *Q. sideroxylla* y té verde, respectivamente.

Los principales ácidos fenólicos y flavonoides identificados en la infusión de *Q. durifolia* fueron: EGCG, EC, AG, ácido siríngico, ácido protocatecoico y vainillina; en *Q. sideroxylla* se identificó EGCG, EC, C, AG, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido protocatecoico, ácido 4-hidroxibenzoico y vainillina y, como se esperaba, en la infusión de té verde se determinó EGCG, EC, C, AG, ácido clorogénico, ácido siríngico y vainillina.

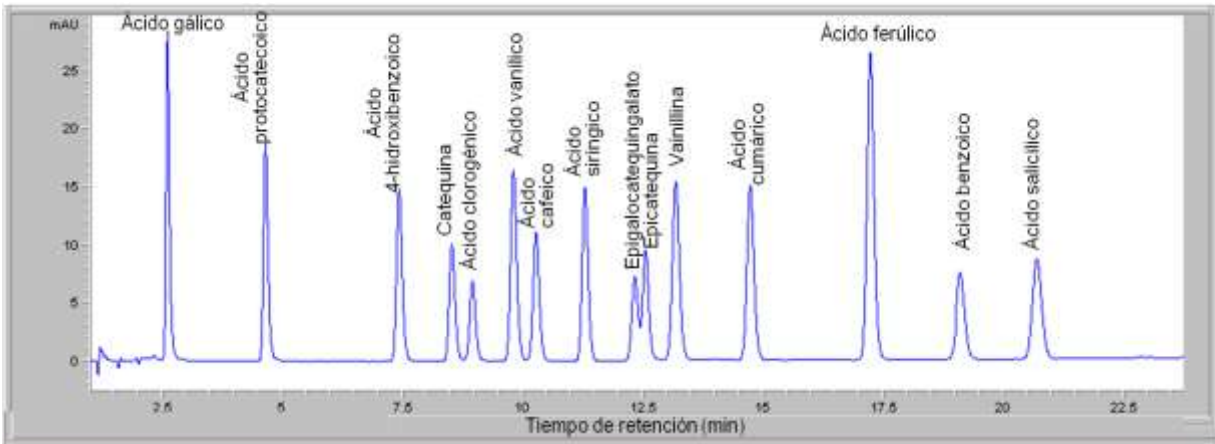


Figura 12. Cromatograma de los estándares de fenoles.

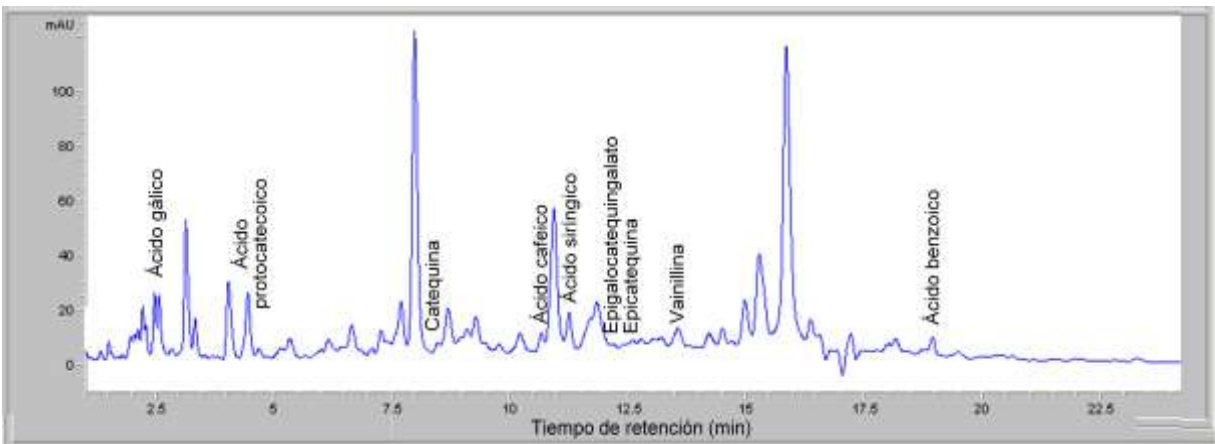


Figura 13. Cromatograma de la infusión de *Q. durifolia* al 2%.

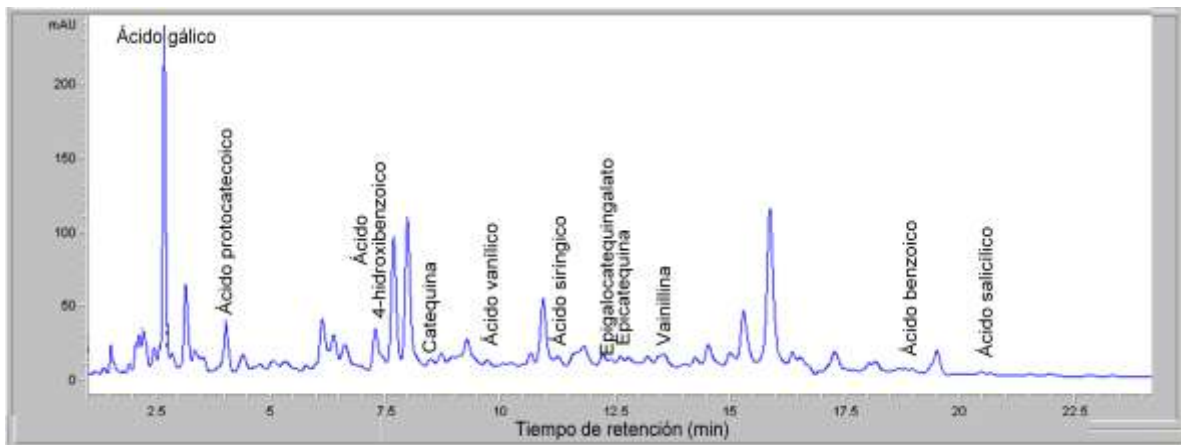


Figura 14. Cromatograma de la infusión de *Q. sideroxylla* al 2%.

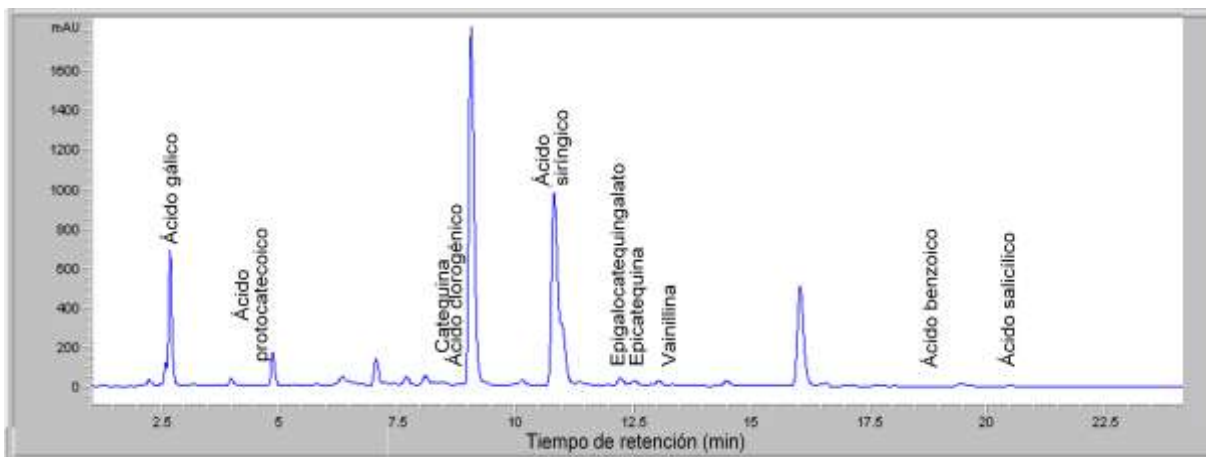


Figura 15. Cromatograma de la infusión de té verde al 2%.

El Cuadro 8 muestra que en las infusiones probadas se cuantificaron tres de las principales catequinas; EGCG, EC y C; con valores de 86.6 ± 0.4 , 103.8 ± 1.1 y 202.9 ± 2.6 mg de EGCG/100 g de hoja seca, 52.3 ± 0.0 , 33.2 ± 0.4 y 94.8 ± 0.8 mg de EC/100 g de hoja seca y 19.1 ± 0.2 , 32.2 ± 0.82 y 77.7 ± 2.1 mg de C/100 g de hoja seca, para *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia* y té verde, respectivamente. Además, se cuantificaron algunos ácidos fenólicos de importancia como el ácido gálico en concentraciones de 58.0 ± 1.6 , 417.7 ± 5.7 y 169.2 ± 1.3 mg/100 g de hoja seca para *Q. durifolia*, *Q. sideroxylla* y té verde, respectivamente. Por otro lado, el ácido siríngico fue el ácido que se encontró en mayor concentración en el té verde con un valor de 5227.6 ± 376.8 mg/100 g de hoja seca (Cuadro 8). En general, los resultados indican que la infusión de *Q. sideroxylla* tuvo la mayor concentración de EGCG, C y AG en comparación con *Q. durifolia*, lo que puede conferirle mayor capacidad antioxidante y, probablemente, mayor efecto biológico.

En general, el té verde presentó mayor contenido de EGCG, EC y C que las infusiones en estudio; sin embargo, el perfil fitofenólico general es similar, por lo que es muy probable que puedan tener efectos biológicos comparables. A pesar de que el té verde posee una concentración de EGCG de aproximadamente el doble en comparación con *Q. sideroxylla*, esta última posee 50% más de AG y vainillina comparada con el té verde. La vainillina y el ácido gálico son fenoles con alta actividad biológica documentada

(Shahrzard y col., 2001; Ho y col. 2009), lo que podría compensar la baja concentración de las principales catequinas antes mencionadas en las infusiones de *Quercus* comestibles. A pesar de que el efecto biológico del té verde es atribuido a las catequinas (EGCG, EC y C), la presencia aunque en bajas concentraciones de otros polifenoles debe considerarse, ya que diversos estudios ponen de manifiesto que los polifenoles presentan mayor poder antioxidante combinados que de forma aislada (llamado efecto sinérgico) (Billard y col., 2002; Gao y col., 2002).

Cuadro 8. Concentración de fenoles de las infusiones en estudio.

Compuesto (mg/100 g muestra)	RT (min)	PM	Infusión al 2%		
			<i>Q. durifolia</i>	<i>Q. sideroxylla</i>	Té verde
Epigalocatequina_galato (EGCG)	20.7	458.3	86.6 ± 0.4 ^a	103.8 ± 1.1 ^b	202.9 ± 2.6 ^c
Epicatequina (EC)	12.3	290.3	52. ± 0.0 ^a	33.2 ± 0.4 ^b	94.8 ± 0.8 ^c
Catequina (C)	8.5	290.3	19.1 ± 0.2 ^a	32.2 ± 0.8 ^b	77.7 ± 2.1 ^c
Ácido gálico	2.6	170.1	58.0 ± 1.7 ^a	417.7 ± 5.7 ^b	169.2 ± 1.3 ^c
Ácido clorogénico	8.9	354.3	ND	ND	66.8 ± 0.7
Ácido vanílico	9.8	168.1	ND	32.0 ± 0.8	ND
Ácido cafeico	10.3	180.1	39.2 ± 0.2	ND	ND
Ácido sirínigico	11.3	198.2	102.7 ± 0.2 ^a	79.5 ± 2.2 ^a	5117.6 ± 376.8 ^b
Ácido protocatecoico	4.6	154.1	52.1 ± 0.2 ^a	51.8 ± 0.3 ^a	19.5 ± 0.2 ^b
p-hidroxibenzoico	7.4	138.1	ND	94.8 ± 1.5	ND
Vainillina	12.5	152.1	100.8 ± 0.5 ^a	119.8 ± 1.9 ^b	66.5 ± 1.2 ^c
Ácido benzoico	17.2	122.1	27.6 ± 1.2 ^a	5.8 ± 0.1 ^b	6.7 ± 0.9 ^b
Ácido salicílico	19.1	138.1	1.4 ± 0.0 ^a	1.4 ± 0.1 ^a	9.4 ± 0.2 ^b

N=2. Los resultados son la media de 2 experimentos independientes ± EE. a, b y c por línea indican diferencia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey (p<0.05).

Nota: ND significa no detectado.

7.1.3. Evaluación de la capacidad antioxidante de las infusiones.

La capacidad antioxidante de los polifenoles *in vivo* está dada por diversos mecanismos dentro del organismo: 1) actividad de atrapamiento de radicales, 2) efecto de quelación de metales, 3) estabilidad del radical formado después del atrapamiento, 4) sensibilidad al pH, y 5) solubilidad en fases lipofílicas (Cao y Prior, 1993). El ensayo de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) fue reportado por Miller y Rice-Evans en 1993 y más tarde se presentó una versión mejorada con el radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (ácido sulfónico 3-etilenbenzotiazolina-6). Esta técnica es simple y muy utilizada por varios laboratorios para el estudio de la capacidad antioxidante de varios fitoquímicos, alimentos, bebidas o muestras biológicas, por lo cual en este estudio se utilizó este ensayo para la determinación de la capacidad antioxidante de las infusiones y los resultados se expresaron en μmol equivalentes de Trolox (TEAC)/g de hoja seca. En el Cuadro 9 se muestra que la infusión de *Q. sideroxylla* posee una mayor actividad antioxidante ($755.56 \pm 29 \mu\text{mol}$ equivalentes de Trolox/g de hoja seca) en comparación con la infusión de *Q. durifolia* ($447.14 \pm 4 \mu\text{mol}$ equivalentes de Trolox/g de hoja seca), siendo estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de t de Student ($p < 0.0001$). La capacidad antioxidante evaluada en este estudio para ambas infusiones correlaciona directamente con su contenido de fenoles y flavonoides ($R^2 = 0.9913$ y $R^2 = 0.8537$, respectivamente, $p < 0.0001$).

Henning y colaboradores (2003) estudiaron el contenido de catequinas en 18 marcas de té diferentes y evaluaron también la capacidad antioxidante de algunas catequinas individuales, observando que la capacidad antioxidante varió en el siguiente orden $\text{ECG} > \text{EGCG} > \text{EC} = \text{C} > \text{EGC}$. En base a lo anterior, la mayor capacidad antioxidante de la infusión de *Q. sideroxylla* puede atribuirse a su mayor contenido de las catequinas EGCG, EC y C, así como del AG cuantificados por HPLC.

La capacidad antioxidante de la infusión de *Q. sideroxylla* es similar a lo reportado por Ivanova y colaboradores (2005) para infusiones de diversas plantas de origen búlgaro utilizadas con fines medicinales, con valores de 608 – 1653 μmol equivalentes de Trolox/g de hoja seca.

La evaluación de la capacidad antioxidante por medio de ensayos *in vitro* nos proporciona una buena aproximación del efecto que pudiera observarse *in vivo*; sin embargo, la absorción y metabolismo de los polifenoles que ocurre en los organismos vivos debe de tomarse en consideración, por lo cual es importante utilizar modelos animales para verificar si la capacidad antioxidante *in vitro* se correlaciona o ejerce realmente algún efecto biológico *in vivo*. Por lo anterior, la etapa siguiente del estudio consistió en la evaluación del efecto quimioprotector de las infusiones empleando para ello un modelo animal de cáncer de colon inducido con 1,2-dimetilhidrazina (1,2-DMH).

Cuadro 9. Capacidad antioxidante de infusiones de *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia*.

Infusión	Capacidad antioxidante ^c
<i>Q. sideroxylla</i>	755.56 ± 29 ^a
<i>Q. durifolia</i>	445.70 ± 4 ^b

^c resultados expresados en µmol equivalentes de Trolox/g de hoja seca.

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

a y b indican diferencia estadística de acuerdo a la prueba de t de Student (p<0.05).

7.2. Efecto quimioprotector de las infusiones de *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia* sobre el desarrollo de cáncer de colon inducido con 1,2-DMH en ratas Sprague-Dawley.

En la segunda etapa del estudio se trabajó con un modelo de cáncer de colon inducido con 1,2-DMH y empleando ratas macho Sprague-Dawley de 5 semanas de edad. A lo largo de todo el periodo experimental (26 semanas) se determinaron periódicamente varios parámetros, dentro de los cuales la ganancia de peso y consumo de alimento se registró semanalmente, el consumo de líquidos (agua e infusión) diariamente y la sobrevivencia se determinó al final del periodo experimental.

7.2.1. Ganancia de peso, consumo de alimento, consumo de líquidos y sobrevivencia de ratas inducidas con el carcinógeno 1,2-DMH y tratadas con las infusiones de *Q. durifolia* y *Q. sideroxylla* al 1% (p/v).

En general, el peso promedio inicial (semana 1) de los animales fue de 85.04 ± 8.85 g. Aunque el peso de los animales de los grupos asignados al tratamiento con las

infusiones de *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia* fue mayor al inicio del experimento (Cuadro 10), esta ganancia no se mantuvo a lo largo del período experimental (semanas 13 y 26). Por el contrario, el peso de los animales tratados con las infusiones y el carcinógeno fue menor comparando con el grupo 1,2-DMH , e inclusive menor al peso del grupo control negativo, a la mitad del período experimental (semana 13). Lo anterior puede atribuirse a la combinación de tratamientos (infusión-carcinógeno), ya que el peso del grupo tratado sólo con el carcinógeno no se vio afectado (semana 13) y la disminución en ganancia de peso se registró desde la primera semana de inducción del cáncer y así se mantuvo a lo largo de todo el experimento. Al final de la semana 26, el peso corporal de los animales en los diferentes grupos de tratamiento con el carcinógeno fue menor y, fue aún menor, en los grupos tratados con las infusiones en comparación con el grupo control negativo (Figura 16).

Cuadro 10. Peso corporal de ratas Sprague-Dawley durante el estudio de carcinogénesis.

Grupo de tratamiento	Peso corporal (g) [§]		
	Semana 1	Semana 13	Semana 26
Grupo control negativo	75.61 ± 1.74	372.33 ± 14.68	464.66 ± 20.01
Grupo 1,2-DMH	79.91 ± 1.51	381.86 ± 10.51	459.66 ± 18.99
Grupo <i>Q. sideroxylla</i>	94.96 ± 1.51*	358.73 ± 11.46	448.73 ± 14.27
Grupo <i>Q. durifolia</i>	89.67 ± 0.93*	364.00 ± 6.16	444.57 ± 7.81

* Diferencia estadística significativa en comparación con el grupo control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnet ($p < 0.0001$).

§ Promedio ± EE.

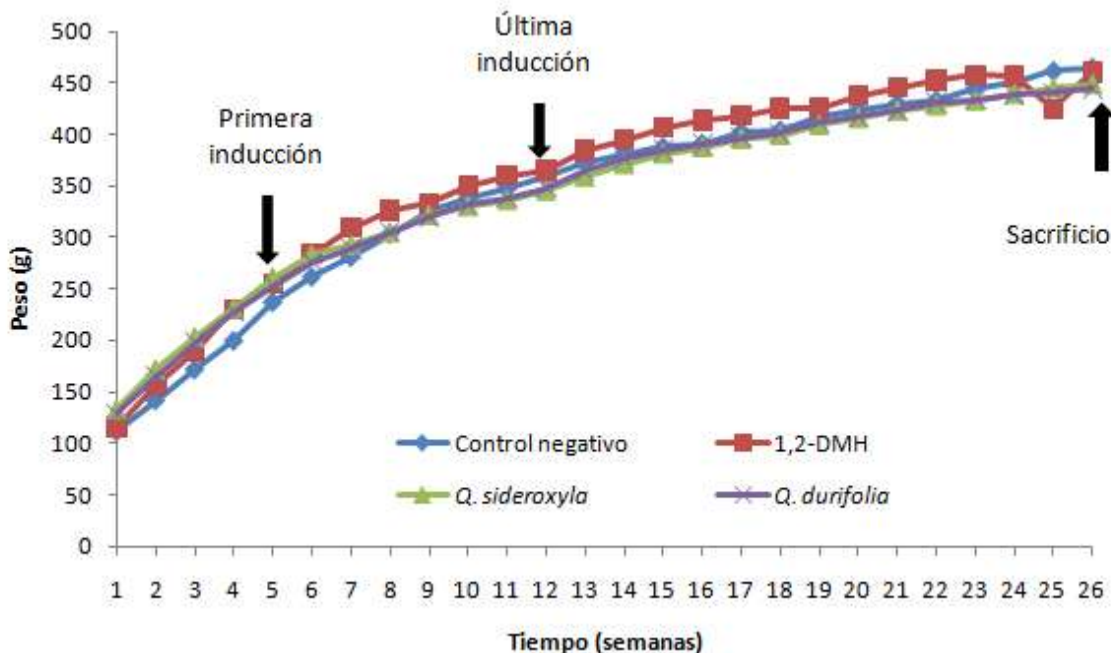


Figura 16. Efecto de las infusiones sobre el peso corporal (g) de las ratas durante el período experimental. Control negativo (agua + solución al 0.9% de NaCl); 1,2-DMH (agua + 1,2-DMH, 21 mg/Kg de peso), *Q. sideroxylla* (infusión al 1% + 1,2-DMH, 21 mg/Kg de peso) y *Q. durifolia* (infusión al 1% + 1,2-DMH, 21 mg/Kg de peso).

La baja ganancia de peso de los grupos tratados con el carcinógeno al final del periodo experimental también ha sido reportado por otros autores, sin encontrar tampoco diferencias estadísticas respecto al grupo control negativo (Jia y Han, 2000). Sin embargo, cabe mencionar que en el presente estudio la menor ganancia de peso pudo deberse al daño provocado por las infusiones a nivel del intestino delgado, ya que durante el sacrificio se observaron anomalías físicas en este órgano en algunos animales tales como adelgazamiento de las paredes intestinales, coloración amarillenta y verdusca, así como abscesos. Lo anterior pudo influir en una menor absorción de nutrientes dado que el consumo de alimento de estos grupos fue ligeramente mayor (como se verá más adelante), lo que no se reflejó en el peso.

En resumen, se encontró que el carcinógeno no afectó de manera significativa el crecimiento de los animales tratados, ya que su peso corporal es muy similar al peso de grupo control negativo (Cuadro 10 y figura 16). Estos resultados coinciden con lo reportado por Fernández-Correa (2009), quien no encontró diferencias en el peso de los

animales tratados con 1,2-DMH con respecto al grupo control negativo durante todo el periodo experimental empleando el mismo modelo animal, por tanto la 1,2-DMH a la dosis empleada no tiene efecto adverso significativo que comprometa el crecimiento de los animales.

Por otro lado, el consumo de alimento de los grupos experimentales se registró semanalmente; en promedio los animales consumieron en un inicio (semana 1) alrededor de 17.16 g y al final del periodo experimental (semana 26) aproximadamente 24.09 g como se muestra en la Figura 17. Los grupos tratados con infusiones de *Q. durifolia* y *Q. sideroxylla* registraron un consumo significativamente mayor respecto al grupo control negativo en gran parte de las semanas y en algunas incluso mayor al grupo 1,2-DMH (Figura 17), lo cual no se vio reflejado directamente en el peso (Figura 16). Como se comentó previamente, este fenómeno puede estar asociado a una reducción en la absorción de nutrientes.

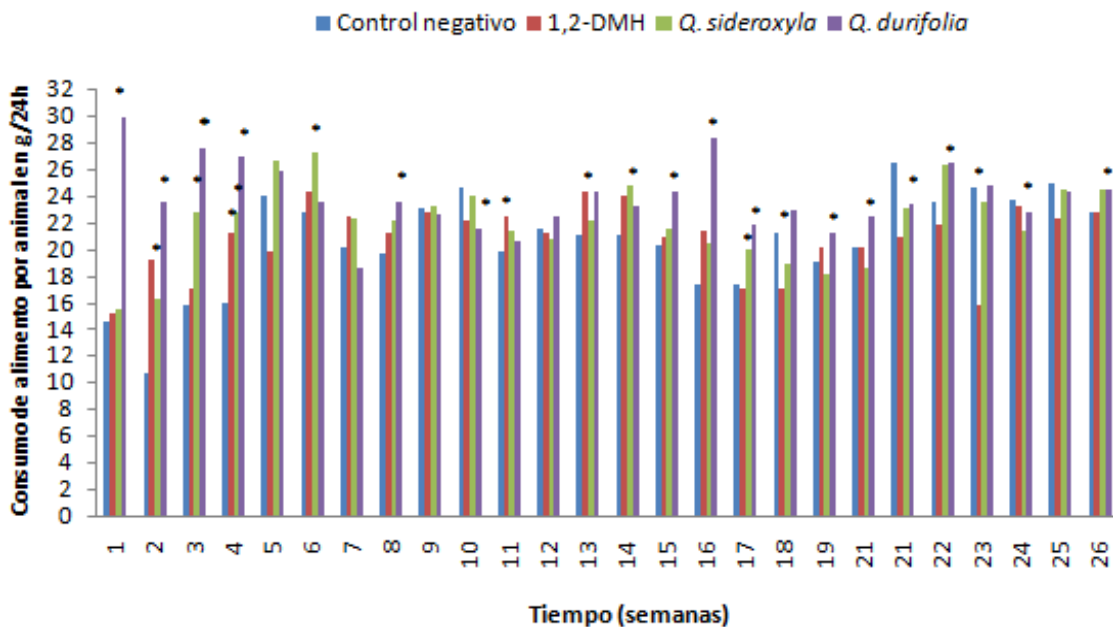


Figura 17. Consumo de alimento de ratas bajo los diferentes tratamientos. Control negativo (agua + solución al 0.9% de NaCl); 1,2-DMH (agua + 1,2-DMH, 21 mg/Kg de peso), *Q. sideroxylla* (infusión al 1% + 1,2-DMH, 21 mg/Kg de peso) y *Q. durifolia* (infusión al 1% + 1,2-DMH, 21 mg/Kg de peso). *Indica deferencia estadística contra el control negativo por la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

En lo que respecta al consumo de líquidos (agua e infusión), en la Figura 18 se puede observar que los grupos cuya única fuente de bebida fue agua (grupos control negativo y 1,2-DMH) registraron un consumo estadísticamente mayor en casi todo el período experimental, comparados con los grupos tratados con las infusiones. Esto debido probablemente a que la infusión les proporcionaba más saciedad o bien ésta poseía un sabor más astringente, pues se sabe que los taninos presentes en las hojas de los encinos confieren esta astringencia y gusto amargo, lo que provocó un rechazo por los animales. En el caso de té verde, este efecto no se ha observado en los diversos estudios hasta ahora realizados por diversos investigadores; por ejemplo, Jia y colaboradores (2000) señalan que el volumen de té verde y agua consumidos no fue significativamente diferente entre sus grupos en ninguna etapa del periodo experimental. Lo anterior se debió probablemente a las mejores características sensoriales del té verde (comparados con otras fuentes de tés).

A pesar de que existe información que indica que el consumo de taninos está relacionado con una afectación en la ganancia de peso de los animales que los consumen debido a efectos antinutricios, la disminución de la ganancia de peso de los animales tratados con las infusiones no está relacionado directamente con un consumo “alto” de taninos, ya que de acuerdo a las concentraciones determinadas en las infusiones y los datos publicados? sobre té verde, estos niveles no afectarían el crecimiento ni el consumo de alimento de los animales de prueba. Por lo anterior, la disminución en la ganancia de peso puede atribuirse a otros compuestos presentes en las infusiones, ya que como se puede observar en las figuras 13 y 14, existe una gran cantidad de picos representativos de otros compuestos desconocidos en los cromatogramas obtenidos para *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia*, los cuales están casi o totalmente ausentes en la infusión de té verde, lo que podría sugerir que esta infusión está más “pura” con respecto a la presencia de otros compuestos o que éstos están en una baja concentración.

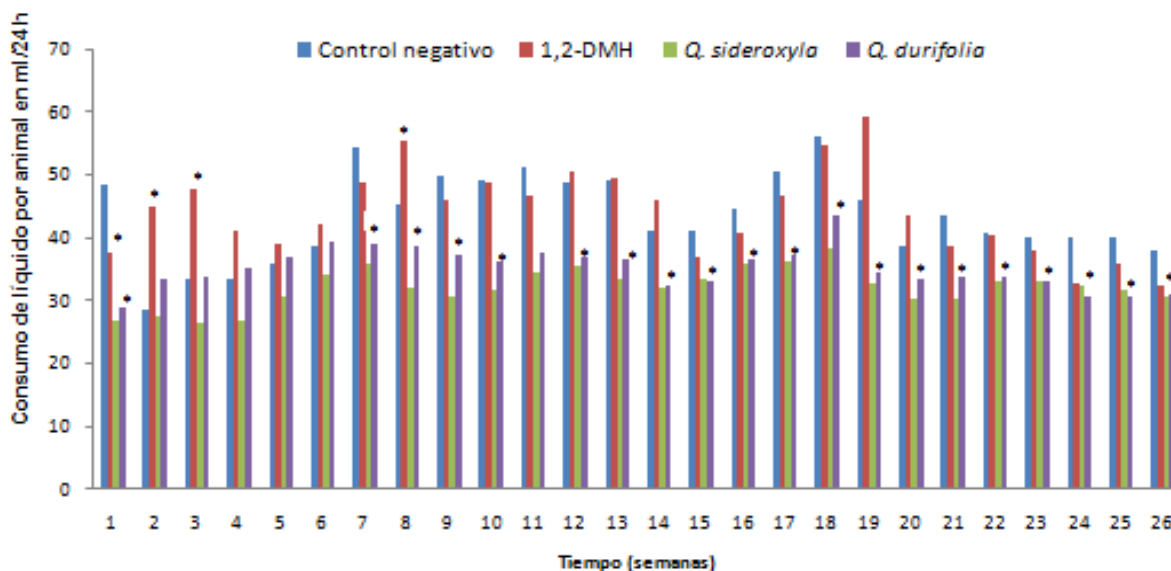


Figura 18. Consumo de líquido de las ratas bajo los diferentes tratamientos. Control negativo (agua + solución al 0.9% de NaCl); 1,2-DMH (agua + 1,2-DMH, 21 mg/Kg de peso), *Q. sideroxylla* (infusión al 1% + 1,2-DMH, 21 mg/Kg de peso) y *Q. durifolia* (infusión al 1% + 1,2-DMH, 21 mg/Kg de peso). *Indica deferencia estadística contra el control negativo por la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

Finalmente, al momento del sacrificio se determinó el porcentaje de sobrevivencia para cada uno de los grupos. En el Cuadro 11 se observa que la sobrevivencia del grupo control negativo fue del 70%; ya que inesperadamente la muerte de dos animales ocurrió una semana antes de finalizar la etapa de pre-tratamiento (semana 1 y semana 2 para cada muerte, respectivamente). En base a los síntomas que se observaron (conjuntivitis y congestión nasal), la causa aparente de las muertes se debió a infecciones virales comunes en estos roedores; además, durante la autopsia no se observó ningún daño a órganos o en ninguna parte de los animales. El grupo 1,2-DMH registró un porcentaje de sobrevivencia del 94%, cabe resaltar que el animal fallecido en este grupo fue sacrificado a la semana 25 para corroborar la presencia de tumores y llevar a cabo el sacrificio de los animales de todos los grupos experimentales. Por otro lado la sobrevivencia de los grupos 3 y 4 tratados con las infusiones de *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia* fue del 100 y 93 %, respectivamente (Cuadro 11). Similarmente, la muerte de este animal ocurrió a la semana 8 lo que coincidió con la 4ta inyección del carcinógeno y se debió a causas aparentemente no relacionadas con el carcinógeno ni al consumo de la infusión, dado que

la sintomatología fue similar a la presentada por las ratas fallecidas del grupo control negativo.

Cuadro 11. Efecto de las infusiones sobre el porcentaje de sobrevivencia de ratas Sprague-Dawley inducidas con 1,2-DMH al final del periodo experimental.

Tratamiento	N inicial*	N final**	Sobrevivencia (%)
Grupo control negativo	8	6	70
Grupo 1,2-DMH	17	16	94
Grupo <i>Q. sideroxylla</i>	15	15	100
Grupo <i>Q. durifolia</i>	15	14	93

* Número de ratas al inicio del periodo experimental (semana 1).

** Número de ratas al final del periodo experimental (semana 26).

7.2.2. Evaluación macroscópica del colon de ratas tratadas con 1,2-DMH e infusiones de *Q. durifolia* y *Q. sideroxylla*.

La 1,2-DMH es un carcinógeno órgano-específico para colon; sin embargo, se ha informado que pueden detectarse daños al DNA en otros tejidos diferentes al colon en este tipo de modelos, por ejemplo en hígado o riñones. La especificidad de la 1,2-DMH por el colon se debe a susceptibilidades específicas o particulares en este tejido lo que facilita la persistencia de los daños causados al DNA (Povey y col., 2002; Jackson y col., 2003); además, la zona del colon es altamente proliferativa, lo que facilita la acumulación de mutaciones y por ende la formación del tumor. Lo anterior es congruente con la ausencia de lesiones en órganos adyacentes al colon como el hígado demostrando así la selectividad del carcinógeno 1,2-DMH por el colon.

En cuanto al análisis macroscópico de los tumores, el colon se dividió en dos zonas en base a su morfología, proximal (ascendente) y distal (descendente).

La mayoría de los tumores (77, 73 y 91% para 1,2-DMH, *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia*, respectivamente) en este estudio se encontraron en la zona distal del colon (Cuadro 12), confirmando que este carcinógeno produce predominantemente tumores en la zona distal (Povey y col., 2002). Lo anterior ha sido reportado por diversos autores

como Jackson y colaboradores (1999) quienes concluyen que el mayor porcentaje de los tumores encontrados (79%) en este modelo animal se localiza en la zona distal del colon de ratas inducidas con 1,2-DMH. Otros autores también han reportado para el mismo modelo una distribución de tumores del 60% y 68 % en la zona distal, similar a la localización en humanos (Linares y col., 2002, Sánchez-Negrete y col., 2007). Estos resultados pueden deberse a que la proliferación celular en las zonas proximal y distal del colon es diferente. La zona proximal es menos proliferativa a diferencia de la zona distal que presenta una mayor proliferación lo que permite que esta zona sea más vulnerable a la 1,2-DMH, facilita una mayor acumulación de mutaciones o células con mutaciones (Ma y col., 1990). Otro aspecto a considerar es la actividad de la enzima β -glucuronidasa, presente tanto en los colonocitos como en la microflora propia del colon, que hidroliza los conjugados glucorónidos derivados del metabolismo de la 1,2-DMH en el hígado, lo que ocasiona la reactivación de los metabolitos reactivos o carcinógenos finales de la 1,2-DMH a nivel del colon distal, induciendo el desarrollo de más tumores (Celik y col., 1983; Sun y Li, 1988; Nalini y col., 2004; Manju y Nalin, 2006). Como era de esperarse, el grupo control negativo no presentó ninguna lesión en ninguna de las zonas del colon.

Cuadro 12. Distribución por zona de tumores en el colon de ratas de los grupos tratados con 1,2-DMH y las infusiones de *Q. durifolia* y *Q. sideroxylla* al 1%.

Zona de distribución	1,2-DMH*	<i>Q. sideroxylla</i> **	<i>Q. durifolia</i> ***
Colon proximal	5 (23%)	3 (27%)	2 (19%)
Colon distal	17 (77%)	8 (73%)	21 (91%)
TOTAL	22	11	23

*n=11, **n=13, ***n=9

7.2.3. Clasificación de tumores encontrados en el colon de ratas de los grupos tratados con 1,2-DMH y las infusiones de *Q. durifolia* y *Q. sideroxylla* al 1%.

La morfología de los tumores observados en nuestro modelo es similar a lo descrito previamente por Piñols (1995) quien indica que los tumores intestinales inducidos

con el carcinógeno 1,2-DMH pueden agruparse en: tumores sésiles, tumores pedunculados, tumores exofíticos, tumores endofíticos y placas (Figura 11). En base a lo anterior, se realizó una clasificación macroscópica de los tumores encontrados en ambas zonas del colon de los animales tratados con 1,2-DMH, encontrando 4 de los diferentes tipos de los tumores antes mencionados (Figura 19).



Figura 19. Tumores encontrados en colon de ratas inducidas químicamente con 1,2-DMH. A) Tumor pedunculado, B) tumor sésil y c) tumor endofítico.

La predominancia del tipo de tumor varió de acuerdo al tipo de tratamiento (Cuadro 13). En el caso del grupo 1,2-DMH, los tumores encontrados fueron principalmente del tipo pedunculados (50%) y sésiles (40%) y, en menor número, exofíticos y endofíticos (4.5%). Estos datos concuerdan con lo reportado por Endo y colaboradores (2001) quienes observan que la mayoría de los tumores encontrados en el colon de ratas tratadas con 1,2-DMH fueron del tipo polipoideo (pedunculado y sésiles). En el grupo *Q. sideroxylla* sólo se presentaron dos tipos de tumores, principalmente del

tipo sésil (91%) y exofítico (9%) y, finalmente, el grupo *Q. durifolia* presentó un mayor porcentaje de tumores sésiles (78%), seguidos de tumores endofíticos (13%), exofíticos (4.5%), y pedunculados (4.5%).

Cuadro 13: Clasificación de tumores encontrados en el colon de ratas tratadas con el carcinógeno 1-2DMH e infusiones al 1%.

Tipo de tumor	Grupo 1,2-DMH *	Grupo <i>Q. sideroxylla</i> **	Grupo <i>Q. durifolia</i> ***
Pedunculado	11 (50%)	0	1 (4.5%)
Sésil	9 (41%)	10 (91%)	18 (78%)
Exofítico	1 (4.5%)	1 (9%)	1 (4.5%)
Endofítico	1 (4.5%)	0	3 (13%)
TOTAL	22	11	23

*n=16, **n=15, ***n=14

En general, se observa que se presentó un mayor porcentaje de tumores sésiles en los diferentes grupos bajo tratamiento. El tipo de tumor presente es de gran importancia a nivel clínico, ya que en humanos los tumores sésiles tienen una base de implantación amplia (sin tallo) e implican mayor malignidad porque la degeneración cancerosa llega tempranamente a la base. Por otro lado, los tumores pedunculados son considerados de menor agresividad por que la degeneración cancerosa tarda más tiempo en llegar a la base gracias a la presencia de un tallo de implantación. Además la mayoría (90%) de los adenomas (tumores benignos) observados en cáncer de colon humano son de tipo pedunculado y el restante son de tipo sésil (10%). Sin embargo, los tumores exofíticos y endofíticos los cuales poseen áreas de ulceración y depresión son los más agresivos dado que sugieren la posibilidad de coexistir con carcinoma. Los endofíticos pueden infiltrarse ampliamente con poco crecimiento visible en la superficie y los exofíticos, por lo general, invaden superficialmente y la mayor parte de su masa se proyecta hacia la luz, dando como resultado cánceres más invasivos (Stoisa y col., 2004).

Los pacientes con carcinoma invadiendo la submucosa tienen más riesgo de desarrollar metástasis, en parte debido a la facilidad de acceso al sistema linfático

(Fenoglio y col., 1973). Este riesgo es más bajo si solo la submucosa ha sido invadida por el tumor, pero mucho más alto si la submucosa de la pared intestinal que rodea al tumor ha sido infiltrado por el carcinoma. Los tumores sésiles con carcinoma invasivo pueden más fácilmente invadir la submucosa de la pared intestinal y de esta forma incrementar el riesgo de desarrollar metástasis que los carcinomas residentes en tumores pedunculados (Fenoglio y Pascal, 1982).

En base a lo anterior, cualquier modulación o disminución en el desarrollo de alguno de estos tipos de tumores y, sobre todo de los considerados más agresivos en estudios o modelos animales, será de gran relevancia a nivel clínico.

Tomado en consideración la información antes mencionada se podría concluir que el tratamiento con la infusión de *Q. sideroxylla* no modificó la agresividad del cáncer dado que se encontró un porcentaje mayor (91%) de tumores sésiles pero ausencia total de tumores pedunculados y exofíticos comparado con el grupo 1,2-DMH, lo cual puede ser compensatorio. Caso contrario fue el observado con el tratamiento con *Q. durifolia* donde aparentemente hubo un incremento en la malignidad del cáncer, ya que no sólo se encontró el mismo porcentaje de tumores endofíticos (4.5%) sino además un mayor porcentaje de tumores sésiles (78%) y endofíticos (13%) comparado con el grupo 1,2-DMH. Estos resultados pueden atribuirse al efecto tóxico de algún componente de la infusión que potencializó al cancerígeno. A este respecto no hay reportes que señalen la presencia de algún tóxico específico en hojas de encino, sólo se señala que el consumo de hojas jóvenes (colectadas al iniciar la floración) y bellotas por ganado trae como consecuencia toxicidad atribuido a los taninos; sin embargo, es necesario realizar experimentos toxicológicos para definir la causa del efecto aparentemente tóxico observado.

7.2.4. Evaluación histopatológica del colon de ratas tratadas con 1,2-DMH e infusiones de *Q. durifolia* y *Q. sideroxylla* al 1%.

La evaluación de los cortes de tejido normal y tumores, previamente teñidos con hematoxilina-eosina (HIE), se realizó en un microscopio Olympus PX40 con aumentos de 100x y 400x.

En la figura 20A se muestra la histología de un colon normal, perteneciente a una rata control negativo, en donde se aprecia la mucosa, submucosa, muscular de la mucosa o muscularis y muscular, así como las criptas que van desde la mucosa hasta la muscularis. Además, se puede observar la separación adecuada entre cripta y cripta por surcos (Figuras 20B y C).

El estudio histopatológico de las muestras provenientes de los grupos tratados consistió en evaluar la presencia de inflamaciones, displasias con bajo o alto grado y adenocarcinomas. La clasificación se basó en la combinación de ciertas características microscópicas como las alteraciones en la arquitectura, la presencia de ciertas anomalías citológicas, principalmente celulares y polimorfismos nucleares, hiperchromatismo nuclear, pérdida de polaridad y marcada estratificación del núcleo (Ridell y col., 1983).

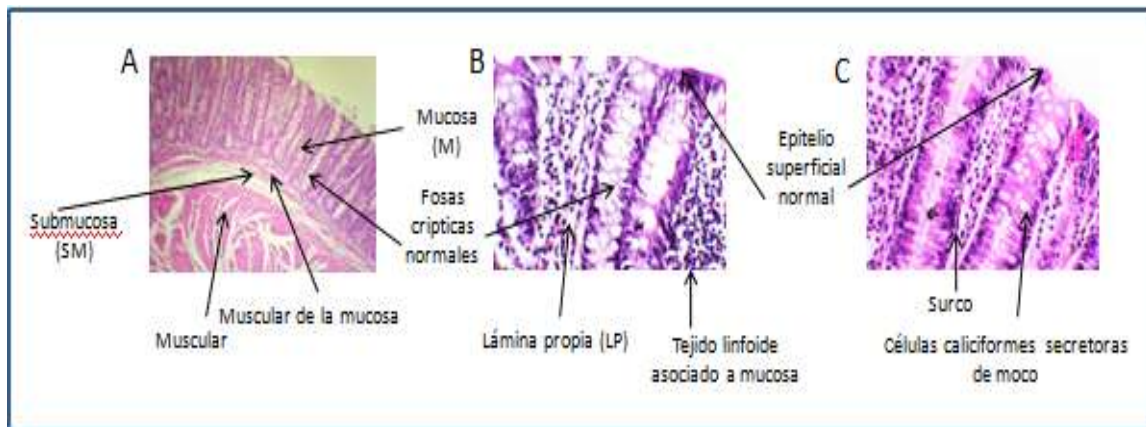


Figura 20. Características histológicas de tejido colónico sano. A) Corte histológico transversal donde se aprecia a un objetivo de 40X la mucosa (M), submucosa (SM), muscular de la mucosa o muscularis, muscular, así como las criptas que van desde la mucosa hasta la muscularis. B) Corte histológico transversal 100X donde se aprecia la lámina propia (LP), el epitelio superficial normal y tejido linfóide asociado a la mucosa. C) Corte histológico transversal 100X donde se observan las células caliciformes secretoras de moco.

La morfología propia del colon sufre diversos cambios conforme se van presentando las atipias (cambios celulares) propias del cáncer de colon (Figura 21). En un

tejido normal, la lámina propia es laxa; las células presentes en la cripta son uniformes con núcleos orientados a la base de la cripta que llevan a cabo la producción de mucina; existen células de infiltración o inflamación como los eosinófilos, neutrófilos, macrófagos y monocitos (A). La morfología de células displásicas se caracteriza por células con núcleos estratificados y grandes en relación núcleo-citoplasma, alta actividad mitótica, pérdida de diferenciación, alteraciones en tamaño y orientación celular (B). Los adenocarcinomas derivados de cánceres gástricos, particularmente de colon, se caracterizan por presentar células en forma de anillo de sello. Estas células son globosas ya que producen grandes cantidades de moco al interior de las mismas; además, presentan núcleos pequeños orientados a la periferia de la célula, lo cual les da la apariencia de anillo (C).

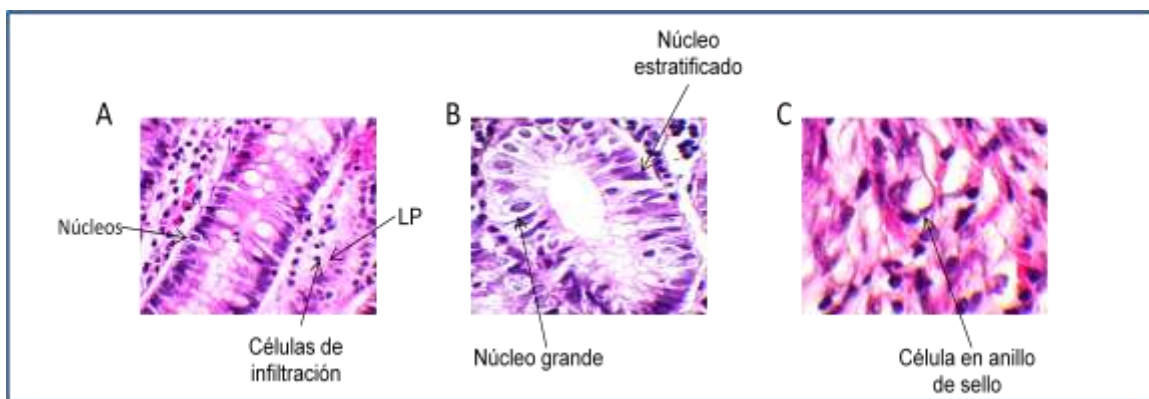


Figura 21. Características histológicas de células de tejido colónico sano y tratado con 1,2-DMH. A) Cripta de tejido colónico sano, B) cripta displásica y C) cripta displásica con células en anillo de sello.

La inflamación es una condición que se caracteriza por un incremento en la presencia de células inflamatorias como macrófagos, eosinófilos y neutrófilos como respuesta a un proceso patológico. La figura 22A muestra una cripta normal la cual está ausente de células inflamatorias infiltradas, además de la presencia de una lámina propia laxa. La figura 22B representa un proceso inflamatorio que muestra un incremento de la población de células inflamatorias o infiltrantes en la lámina propia proporcionándole una apariencia más densa, además hay infiltración de estas células hacia el interior de la cripta.

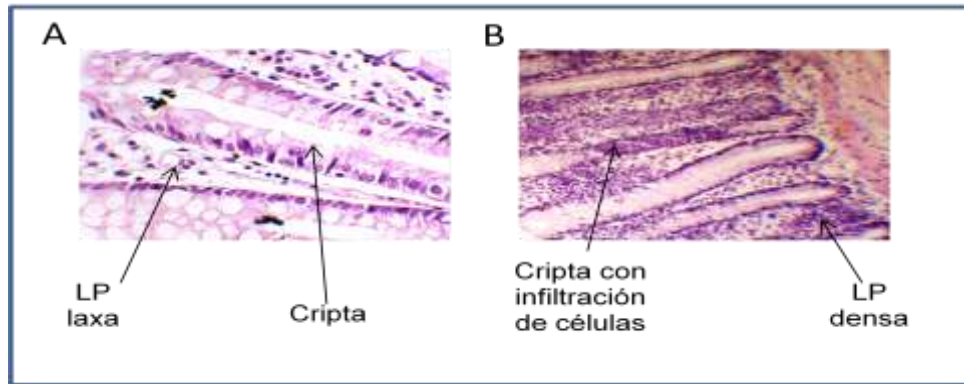


Figura 22. Cortes histológicos de tejido normal e inflamado de colon de ratas tratadas con el carcinógeno. A) Tejido colónico sano y B) tejido colónico inflamado. LP, lámina propia.

Se denomina displasia (del latín “mala forma”, malformación) a una alteración del desarrollo de las células epiteliales y mesenquimatosas que han experimentado proliferación y alteraciones citológicas atípicas. Esto puede ser indicativo de un paso temprano hacia la transformación en una neoplasia, es por lo tanto un cambio pre-neoplásico o precanceroso; esta alteración también se denomina hiperplasia atípica. La displasia es identificada en base a una combinación de características microscópicas, incluyendo alteraciones en la arquitectura a menudo asemejando a un adenoma y anomalías citológicas, principalmente pleomorfismos celular y nuclear, hiper cromatismo nuclear, pérdida de la polaridad nuclear y marcada estratificación de núcleos (Riddell y col., 1983). Histológicamente el grado de atipia forma un espectro continuo de medio a severo, pero para fines prácticos se ha dividido en formas de bajo grado y alto grado basado en el grado de desviación de un epitelio colónico normal (Muto y col., 1975).

En la figura 23 se muestra los cambios histológicos representativos de los diferentes grados de displasia (bajo y alto) que fueron visualizados en cortes de colon de ratas inducidas químicamente con 1,2-DMH y tratadas con las infusiones.

En la micrografía 23A se muestra el corte de un colon normal en donde se observan las criptas con un diámetro uniforme conservando una distancia entre cripta y cripta; los núcleos se encuentran rodeando la línea basal de la cripta, además la lámina propia es laxa y está conformada por células de infiltración. La figura 23B representa a

una displasia de bajo grado donde se observa un incremento en la población de células de linfoides e infiltración de las mismas; además, hay una deformación de las criptas e incremento de su tamaño, así como una disminución en el espacio entre cripta y cripta; los núcleos de las células que conforman la cripta están estratificados e hiper cromáticos. La figura 23C muestra una displasia de alto grado donde se aprecia incremento en la densidad de la lámina propia, pérdida y/o fusión de criptas dando lugar a criptas con mayor diámetro y pérdida total de su forma normal, nucleomegalia y estratificación de núcleos e hiper cromaticidad de los mismos, pleomorfismo y pérdida de la polaridad nuclear.

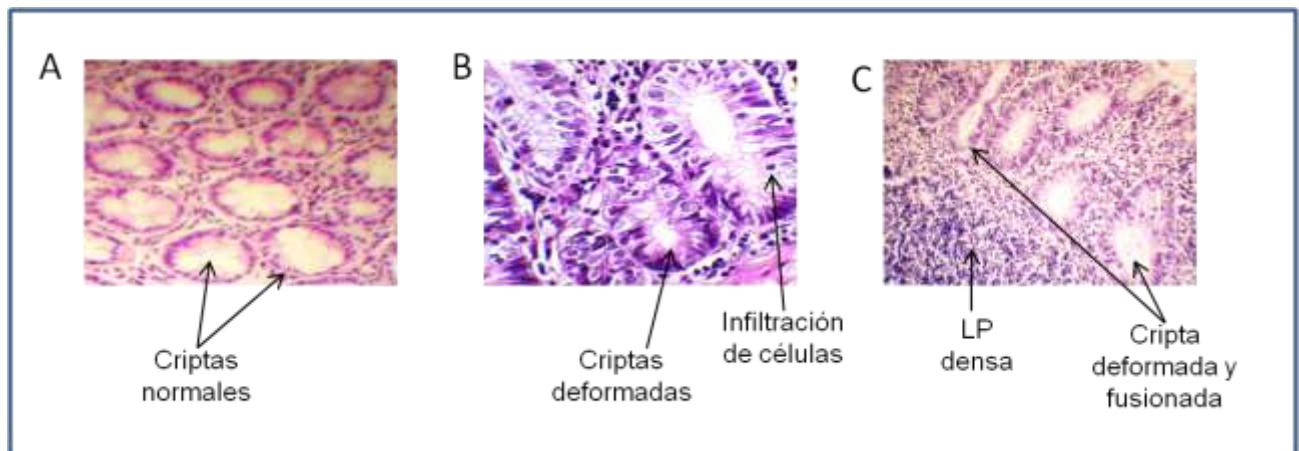


Figura 23. Características histológicas de los diferentes tipos de displasia. A) Tejido colónico sano, B) tejido colónico con displasia de bajo grado y C) tejido colónico con displasia de alto grado. LP, lámina propia.

La palabra adenocarcinoma proviene del prefijo “adeno” que significa glándula; por lo que un adenocarcinoma es un tumor canceroso que aparece en células glandulares de revestimiento en algunos tejidos, como en el caso del colon. En un adenocarcinoma bien diferenciado (Figura 24A) se observan estructuras tubulares perfectamente diferenciadas mostrando una tendencia a formar criptas, se observan células con actividad mitótica y núcleos estratificados, además de una lámina propia densa.

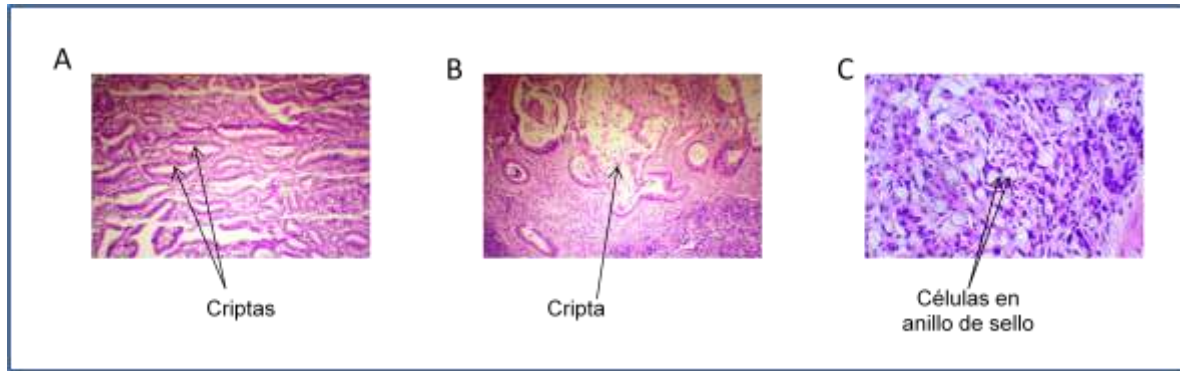


Figura 24. Características histológicas de los diversos tipos de adenocarcinomas encontrados en colon de ratas tratadas con 1,2-DMH e infusiones. A) Adenocarcinoma bien diferenciado, B) adenocarcinoma moderadamente diferenciado y C) adenocarcinoma poco diferenciado.

En un adenocarcinoma moderadamente diferenciado (Figura 24B) se visualizan estructuras tubulares con ramificaciones y digitalización irregular, con lámina propia densa, núcleos totalmente estratificados. Finalmente, la figura 24C muestra un adenocarcinoma poco diferenciado que se caracteriza por la presencia de células en anillo de sello, además de la pérdida total de las criptas.

De acuerdo a la clasificación histopatológica (Cuadro 14), el mayor porcentaje (83%) de muestras normales (sin algún grado de inflamación o displasia) se observaron, como era de esperarse, en el grupo control negativo, a excepción de una muestra que presentó inflamación de bajo grado; el segundo porcentaje más alto (23%) de muestras normales se detectó en el grupo tratado con la infusión de *Q. sideroxylla* y para nuestra sorpresa el menor porcentaje (8%) de éstas se encontró en el grupo tratado con la infusión de *Q. durifolia*, aunque no fue estadísticamente diferente al grupo tratado solo con el carcinógeno (Cuadro 14), de acuerdo al análisis por χ^2 .

Con respecto a la presencia de inflamaciones en el grupo control negativo (17%), aunque no existe literatura al respecto, es posible distinguir histopatológicamente diferencias en el grado de inflamación del colon de ratas y de humanos. Por ejemplo, el análisis histopatológico indica que el colon de ratas “sanas” se encuentra “normalmente” inflamado; mientras que en humanos, el grado de inflamación en el colon es menor y ésta

se presenta principalmente cuando existe una patología en el mismo. Por el contrario, uno de los factores de riesgo identificados en el cáncer de colon es la inflamación crónica de este órgano derivada de diversas patologías (colitis, enfermedad de Crohn), por lo que una disminución de esta condición podría conllevar a una reducción en el número de tumores.

Cuadro 14. Porcentajes del total de muestras con inflamación, displasia y adenocarcinomas encontrados en las muestras sometidas a análisis histopatológico de ratas tratadas con 1,2-DMH e infusiones al 1%.

Tratamiento	Total ratas	Total de muestras	Número de muestras (%)**				
			Tejido normal	Tejido inflamado	Displasia		Adenocarcinomas
					Bajo grado	Alto grado	
Grupo Control negativo	6	6	5* (83)	1* (17)	0	0	0
Grupo 1,2-DMH	11	37	3 (8)	10 (27)	0	2 (5)	22 (60)
Grupo <i>Q. sideroxylla</i>	13	26	6 (23)	4* (15)	4* (15)	1 (4)	11* (43)
Grupo <i>Q. durifolia</i>	9	35	3 (8)	8 (23)	0	1 (3)	23 (66)

** El número entre paréntesis indica el porcentaje del total de muestras.

* indica diferencia estadística significativa con respecto al control 1,2-DMH de acuerdo a la prueba de X^2 .

En los resultados del presente estudio es posible observar que la infusión de *Q. sideroxylla* disminuye el porcentaje de muestras con tejido inflamado (15%) a los mismos niveles del grupo control negativo (17%); así mismo, esto se relaciona con un menor porcentaje de adenocarcinomas en este grupo (43%) comparado con el grupo 1,2-DMH (60%). Sin embargo, la disminución en el porcentaje de muestras con tejido inflamado debe tomarse con precaución como un marcador histopatológico, ya que como se mencionó anteriormente, la presencia de tejido inflamado es “normal” en estos roedores,

lo que podría llegar a confundir los resultados obtenidos si se tomara éste como único marcador de protección. Por el contrario, en el grupo tratado con la infusión de *Q. durifolia* no se encontraron diferencias en el porcentaje de muestras (23%) con tejido inflamado con respecto al grupo 1,2-DMH (27%).

En lo correspondiente al número de displasias, el grupo *Q. sideroxylla* presentó un número estadísticamente mayor de displasias de bajo grado (15%) con respecto al grupo 1,2-DMH (0%) (Cuadro 14). Esto es importante porque indica que, a pesar de haber encontrado mayor porcentaje de displasia (bajo grado) en el grupo tratado con *Q. sideroxylla*, no todas estas displasias progresaron a adenocarcinomas sino que algunas permanecieron en esta etapa de bajo grado como un efecto “protector” conferido por la infusión. Por otro lado, el número de displasias de bajo y alto grado del grupo *Q. durifolia* (0 y 3%, respectivamente) fue similar al grupo tratado únicamente con el carcinógeno (0 y 5%, respectivamente).

Finalmente, el mayor número de adenocarcinomas se encontró en el grupo tratado con la infusión de *Q. durifolia* (66%) en comparación con el grupo 1,2-DMH (60%), aunque no fue significativo (Cuadro 14); además, en algunos de estos adenocarcinomas del grupo *Q. durifolia* se identificaron células en anillo de sello, lo cual caracteriza a los adenocarcinomas poco diferenciados relacionados con posible invasión y metástasis. Estos resultados concuerdan con el tipo de tumores encontrados en el colon de estos animales, cuyo comportamiento fue más agresivo comparado con los otros grupos.

La incidencia es un valor que nos indica el porcentaje del total de animales en el grupo que no fue protegido de la enfermedad por el tratamiento de prueba. De acuerdo al análisis histopatológico, el porcentaje de incidencia de adenocarcinomas en el grupo 1,2-DMH fue del 73% (Cuadro 15), el cual es igual al reportado por Villalón-Corona (2004) (incidencia 73%) empleando el mismo modelo animal y condiciones similares de experimentación; sin embargo, la incidencia en este estudio es superior al valor reportado por Hernández-Rivera (2009) (43%) para el mismo modelo. En lo concerniente a los tratamientos, el grupo *Q. sideroxylla* mostró una incidencia de adenocarcinomas del 31%, lo que representó una disminución significativa del 57% con respecto a la incidencia del grupo 1,2-DMH, de acuerdo al análisis de χ^2 . Por el contrario, los resultados muestran que el grupo *Q. durifolia* presentó una ligera disminución no significativa en el porcentaje

de incidencia (67%) comparado con el grupo 1,2-DMH (cuadro 15). Cabe mencionar que no existen reportes en la literatura de los efectos de infusiones derivadas de hojas de encino sobre la incidencia, por lo cual estos números se pueden considerar los primeros generados al respecto (respecto al posible efecto quimioprotector de las infusiones de estos encinos).

Cuadro 15. Porcentaje de incidencia, número promedio y multiplicidad de adenocarcinomas en el colon de ratas inducidas con 1,2-DMH y tratadas con las infusiones al 1%.

Tratamiento	Total ratas	Adenocarcinomas	Incidencia (%) [*]	Promedio por rata ^{**}	Multiplicidad ^{***}
Grupo control negativo	6	0	0	0	0
Grupo 1,2-DMH	11	22	73	2.0 ± 0.55 [*]	2.7 ± 0.50
Grupo Q. sideroxylla	13	11	31 [§]	0.8 ± 0.41 [*]	2.7 ± 0.63
Grupo Q. durifolia	9	23	67	2.5 ± 0.65	3.8 ± 0.58

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

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

***Multiplicidad: relación del número total de tumores entre el número de animales con tumores.

§ Indica diferencia estadística significativa con respecto al grupo 1,2-DMH por la prueba de χ^2 ($p < 0.05$)

¥ Indica diferencia estadística significativa con respecto al grupo 1,2-DMH por la prueba de t de Student ($p < 0.05$).

El número promedio de adenocarcinomas nos indica la distribución del total de estas lesiones entre el total de animales que conforman el grupo. A este respecto, el grupo tratado con la infusión de *Q. durifolia* presentó un promedio de adenocarcinomas por rata mayor al grupo 1,2-DMH, aunque no de manera significativa (2.5 y 2.0, respectivamente). En cambio, el promedio de adenocarcinomas por rata para el grupo tratado con *Q. sideroxylla* fue de 0.78 ± 0.41 , lo cual fue estadísticamente diferente con respecto al grupo 1,2-DMH (2.0 ± 0.55). El número promedio encontrado para nuestro

modelo fue similar al reportado por Villalón-Corona (2004) de 2.06 ± 0.74 y 2.00 ± 0.85 a las 20 y 30 semanas, respectivamente, después de la última inducción.

En lo que respecta a multiplicidad, este valor nos indica la distribución del total de adenocarcinomas entre el total de animales que los presentaron y además es considerado un indicador de la agresividad del cáncer. De acuerdo al cuadro 15, la infusión de *Q. sideroxylla* no disminuyó la agresividad de la enfermedad con respecto al grupo 1,2-DMH (2.7 ± 0.63 y 2.7 ± 0.50 , respectivamente). Inesperadamente, el grupo tratado con *Q. durifolia* presentó una multiplicidad de 1.4 veces (3.8 ± 0.58) más que el grupo 1,2-DMH, aunque no resultó significativa.

Diversos estudios *in vitro* han reportado que especies similares como *Q. resinosa* poseen una alta capacidad citotóxica contra células transformadas (cáncer cervicouterino). Adicionalmente, se mostró en estudios preliminares y se comprobó en este estudio que las especies de *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia* poseen alta capacidad antioxidante determinada *in vitro* y, además, poseen un perfil similar al de la especie *Q. resinosa* y té verde, lo que las colocaba como especies de *Quercus* ideales para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la infusión de *Q. durifolia*, lejos de ejercer un efecto protector, aparentemente ejerce un efecto tóxico. Originalmente se pensó que este efecto adverso se debía a un efecto pro-oxidante, pero la baja concentración de fenoles y flavonoides, así como de taninos, indican lo contrario, ya que un efecto de esta naturaleza sólo se observa cuando la concentración de compuestos fenólicos y taninos es muy elevada y, si éste fuese el caso, el tratamiento con la infusión de *Q. sideroxylla* hubiese sido más agresivo ya que esta infusión contiene una concentración mayor de estos compuestos. En el caso del tratamiento con *Q. sideroxylla* se logró ver un efecto protector, lo cual resulta hasta cierto punto satisfactorio pero de consideración, ya que no hubo una modificación de la agresividad de la enfermedad. Sin embargo, basándonos en la disminución de la incidencia y el número promedio de adenocarcinomas consideramos importante realizar los estudios moleculares con el fin de elucidar una posible ruta de modulación del proceso cancerígeno por esta infusión.

7.2.5. Análisis de la expresión de los marcadores moleculares K-ras y β -catenina por western blot.

El análisis de la expresión de marcadores moleculares ya sea a nivel de gen o proteína es muy utilizado en estudios para la evaluación del efecto protector contra cáncer u otras enfermedades por diversos alimentos o sus componentes, ya que se ha visto que tales alimentos y, específicamente, sus polifenoles ejercen un efecto modulador sobre estos genes o proteínas.

Normalmente, los marcadores moleculares empleados están involucrados en el proceso carcinogénico y su modulación está ligada a un retardo, bloqueo o reversibilidad del proceso carcinogénico, por lo que una disminución en sus niveles de expresión está completamente asociada con un efecto protector conferido por el tratamiento de prueba. Además, con la medición de los niveles de expresión de tales marcadores se puede elucidar el posible mecanismo de acción por el cual el compuesto o alimento probado está ejerciendo la protección. En este estudio se determinaron las proteínas K-ras y β -catenina, ya que estas proteínas están involucradas en la estimulación de la proliferación celular lo que conduce a un crecimiento y progresión del cáncer, por lo que su modulación es de gran importancia. A diferencia de K-ras que solamente se encuentra mutado en aproximadamente en 50% de los tumores de colon, la expresión aberrante de la proteína β -catenina es una característica común de los cánceres de colon, tanto en tumores colónicos de rata como en cáncer colorrectal humano, lo que lo coloca como un marcador hasta cierto punto más sensible y específico de cambios displásicos en este tipo de patología (Hao y col., 1997; Takahashi y col., 1998). Cabe mencionar que en esta parte del estudio sólo se incluyeron muestras de tejido obtenidas de los animales tratados con la infusión de *Q. sideroxylla* debido a que disminuyó de manera significativa la incidencia y el número promedio de adenocarcinomas por rata, además de los grupos control negativo y 1,2-DMH.

Como se mencionó, la expresión aberrante de β -catenina es una característica común en tumores colónicos de rata inducidos con 1,2-DMH o su metabolito AOM, y se ha visto que esta expresión se ve significativamente disminuida con diversos tratamientos con polifenoles (Issa y col., 2007). En el presente trabajo y como lo muestra la figura 25

se observó que el tratamiento con la infusión de *Q. sideroxylla* disminuyó (2.2 veces) de manera significativa la expresión de la proteína total β -catenina (14.5 ± 1.3 UA) comparado con los niveles encontrados en adenocarcinomas del grupo 1,2-DMH (47.0 ± 5.3 UA), lo que nos indica que los polifenoles contenidos en esta infusión ejercen un efecto biológico importante al estimular probablemente la degradación de β -catenina o desestabilizar sus RNAm. A este respecto, diversos autores han mostrado que la disminución de los niveles totales, citoplasmáticos y nucleares, de la expresión de β -catenina es debido a un incremento en la degradación vía proteosoma. Issa y colaboradores (2007) reportaron que una solución al 0.6% de té verde disminuyó los niveles de expresión de la proteína β -catenina en FCA; por otro lado, Xiao y colaboradores (2008) mostraron que una dieta estandarizada rica en EGCG (0.24%) disminuyó de manera importante 73% la expresión citoplasmática y nuclear e incrementó (32%) la expresión en membrana de la proteína en adenomas y adenocarcinomas de rata, esto realizado por inmunohistoquímica.

Como se puede apreciar en la figura 25 no se detectó expresión de la proteína β en las muestras de tejido sano. A este respecto se sabe que la proteína β -catenina se encuentra en tres compartimentos celulares distintos: en membrana (formando parte del complejo de adhesión celular cadherinas-cateninas), en el citoplasma (en forma libre o asociada a otras proteínas como APC, axina y GSK3 β) o en el núcleo (unida a factores de transcripción de la familia Tcf/LEF) (Hülsken y Behrens, 2000). La capacidad de β -catenina para translocarse al núcleo depende de los niveles de esta proteína que se encuentren libres en citosol, no asociados a E-cadherina. El control de los niveles citosólicos de la β -catenina está finamente regulado. Así, en una célula normal de colon, la β -catenina que no se encuentra unida a α -catenina y E-cadherina se localiza en el citosol formando un complejo con la axina, APC y GSK3 β , esta última condición estimula su degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma (Liu y col, 2002). Por esta razón, es probable que no se haya detectado la banda correspondiente a 92 kDa para β -catenina, sino más bien se observó un patrón de bandas que pudieran considerarse péptidos derivados de su degradación.

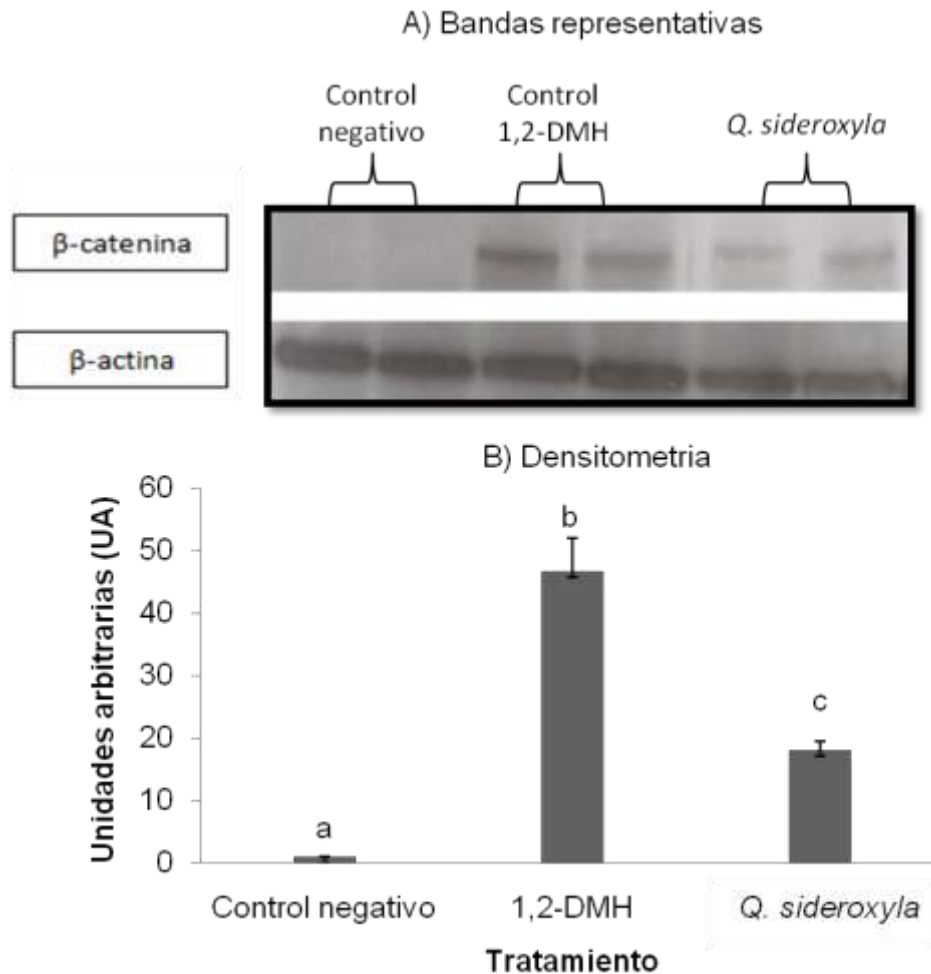


Figura 25. Expresión de la proteína β -catenina en adenocarcinomas de colon de ratas Sprague-Dawley inducidas con 1,2-DMH. A) bandas representativas de western blot para la expresión de la proteína β -catenina y β -actina, respectivamente. B) Densitometría.

Cada barra representa la media \pm EE.

Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.0001$).

Evidencia reciente indica que la activación del protooncogen *ras*, acoplado a la pérdida o inactivación de genes supresores de tumor, induce un fenotipo maligno a células colónicas. Los protooncogenes *ras* (*c-Ki-ras*, *c-Ha-ras* y *N-ras*) constituyen una familia de genes altamente conservada que codifican para proteínas de 21 kD relacionadas estructuralmente y funcionalmente, llamadas *ras-p21*, las cuales están ancladas a la cara citoplasmática de la membrana celular y unidas a nucleótidos de

guanina GTP y GDP. La activación del oncogén *ras* representa uno de las alteraciones genéticas más tempranas y frecuentes asociadas con cánceres humanos, especialmente de colon (Jia y Han, 2000). Varios estudios demuestran una fuerte correlación entre la modulación por la dieta de la activación de *ras* inducida por carcinógenos y la consecuente desaparición de tumores. Por ello, Singh y colaboradores (1994) sugirieron que la determinación de los niveles de expresión de *ras*-p21 a nivel de gen o proteína o bien la determinación del número de mutaciones puede emplearse como marcadores para evaluar las propiedades inhibitorias del crecimiento y desarrollo de tumores en la carcinogénesis de colon.

En este estudio la expresión de la proteína K-*ras* no fue significativamente diferente entre los grupos 1,2-DMH y *Q. sideroxylla* (Figura 26). Además, como se puede observar la expresión de la proteína en el grupo control negativo fue ligeramente mayor a los grupos tratados con el carcinógeno, aunque este aumento no fue significativo.

Los resultados obtenidos son diferentes a lo reportado en la literatura donde se reporta que la proteína K-*ras* está sobreexpresada en tumores de colon de humanos e inducidos químicamente con AOM y 1,2-DMH, comparada con la expresión en tejido normal (Akkiprik y col., 2008; El-Serafi y col., 2010). A este respecto, Jia y Han (2000) también reportaron un incremento importante (3.16 ± 0.32 UA) en la expresión de K-*ras* en tumores de ratas Wistar tratadas con 20 mg/kg de peso de 1,2-DMH durante 10 semanas comparado con la mucosa colónica normal (1.0 UA). Por otro lado, se ha reportado que las mutaciones puntuales en K-*ras* están presentes sólo en el 40-50% de los carcinomas colorrectales humanos y tumores de ratas inducidas con 1,2-DMH y AOM, lo que se asocia con una activación constitutiva y sobreexpresión de la proteína. Sin embargo, también se informa que en algunos tumores conteniendo al gen K-*ras* no mutado la expresión constitutiva de la forma activa de la proteína puede deberse a la alteración en la actividad y/o sobreexpresión de la proteína activada por GTPasa (Ras-GAP) y/o factores intercambiadores del nucleótido guanina (GNEF), tales como Sos.

Existen reportes que señalan que durante la inducción con el carcinógeno 1,2-DMH no se detectan mutaciones en K-*ras* (Jackson y col., 1999), lo que podría estar relacionado con la falta de sobreexpresión de la proteína en este modelo.

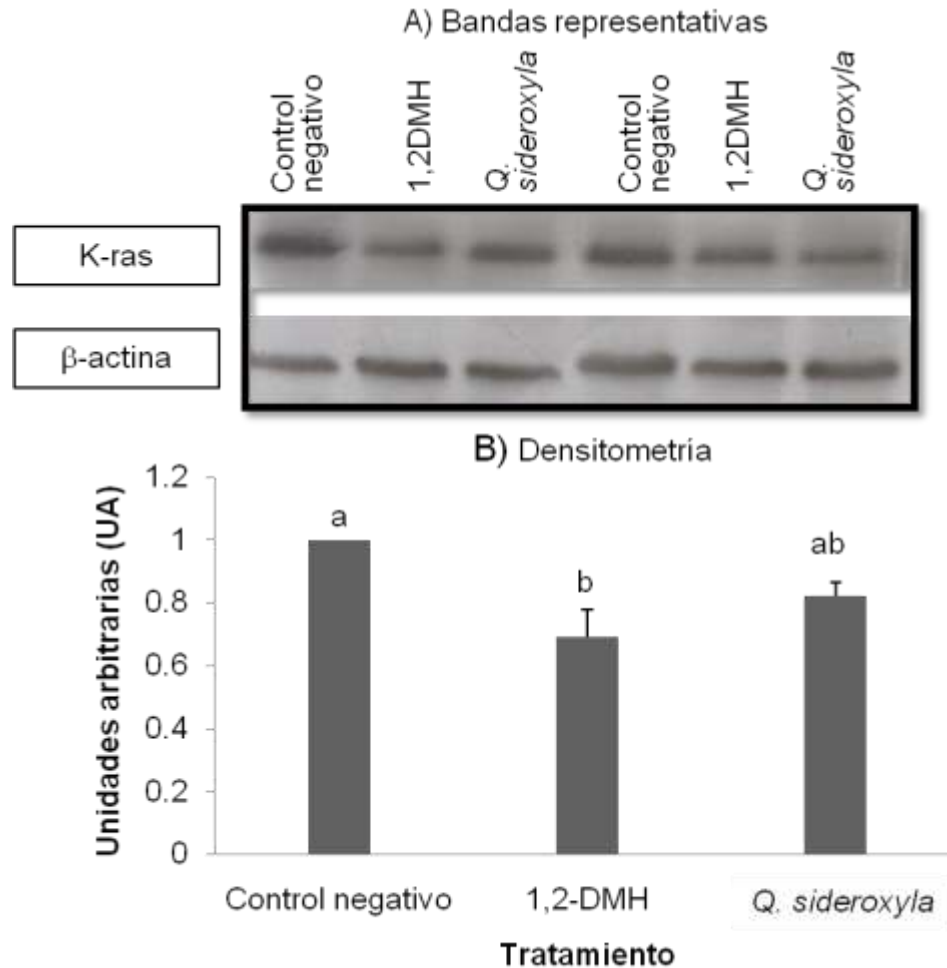


Figura 26. Expresión de la proteína K-ras en adenocarcinomas de colon de ratas Sprague-Dawley inducidas con 1,2-DMH. A) Bandas representativas de western blot para la expresión de la proteína K-ras y β -actina, respectivamente. B) Densitometría.

Cada barra representa la media \pm EE.

Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.01$).

Por otro lado, Endo y colaboradores (2001) observaron que los tumores inducidos con tres inyecciones de 30 mg/kg de 1,2-DMH no causaron ninguna mutación en el gen *ras*, mientras que un 15% de los tumores obtenidos después de 15 inyecciones del carcinógeno sí presentaban mutación. También se ha informado que las alteraciones en el oncogen *ras* son más frecuentes en adenomas o en lesiones con atipia (etapas tempranas) que en cánceres avanzados como los adenocarcinomas y que la presencia de

estas mutaciones depende del tiempo de exposición al carcinógeno 1,2-DMH. Estos resultados coinciden con lo observado en el presente trabajo, ya que la determinación de los niveles de expresión de la proteína K-ras se realizó únicamente en adenocarcinomas, los cuales representan un estadio avanzado de la enfermedad, y no se incluyeron muestras representativas de otras etapas del cáncer de colon.

Los estudios anteriores nos indican la variabilidad de los resultados que se pueden obtener cuando se realizan estudios *in vivo* debido a la gran variedad de factores que pueden influir en el resultado. Las razones para la inconsistencia entre los diferentes estudios en ratas puede estar relacionada a diversos factores: i) la dieta usada, ii) el protocolo de inducción del cáncer, iii) el tipo y dosis de té, infusión o preparación de polifenoles empleada, y si el tratamiento fue administrado en el agua de bebida o en la dieta. Por ello, posteriores estudios son necesarios para corroborar dichos resultados.

Con estos resultados se puede inferir que bajo las condiciones experimentales y el modelo animal utilizado en este estudio la determinación de los niveles de expresión de la proteína K-ras no aportó información suficiente para explicar el efecto quimioprotector de la infusión probada.

En conjunto, estos resultados indican que para nuestros fines la proteína β -catenina resultó ser un mejor marcador, ya que aparentemente su expresión si es modulada por los polifenoles presentes en la infusión, lo que resalta su sensibilidad como marcador. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para definir con certeza el mecanismo de acción de los polifenoles contenidos en esta infusión.

VIII. CONCLUSIONES

La infusión de *Q. sideroxylla* posee la mayor concentración de fenoles y flavonoides, lo que le confirió probablemente una mayor capacidad antioxidante. Por tanto, la concentración de compuestos fenólicos en las infusiones de *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia* está directamente relacionada con la capacidad antioxidante

El perfil fitofenólico de ambas infusiones de encino es similar al encontrado para el té verde; sin embargo, algunos de los componentes más importantes EGCG, EC y C con actividad biológica se encontraron en concentraciones más bajas, pero otros ácido fenólicos también importantes como el AG se encontraron en concentraciones mayores en la infusión de *Q. sideroxylla*.

La inducción con el carcinógeno 1,2-DMH a la dosis empleada no afectó de manera significativa desarrollo de los animales. Sin embargo, la co-administración de las infusiones de *Q. sideroxylla* y *Q. durifolia* junto con el carcinógeno 1,2-DMH a la dosis empleada tuvo un efecto negativo en el crecimiento de los animales, lo que posiblemente está relacionado con alteraciones del intestino delgado.

La infusión de *Q. durifolia* potenció el efecto carcinogénico de la 1,2-DMH, mientras que *Q. sideroxylla* proporciono un efecto protector significativo, esto podría estar relacionado con el perfil y concentración de compuestos fenólicos.

La expresión de la proteína β -catenina disminuyó en los animales tratados con la infusión de *Q. sideroxylla*, sin embargo, un solo marcador no explica por sí solo el efecto protector de este infusión.

El efecto protector de las infusiones de encino contra cáncer de colon es dependiente de la especie en estudio.

Ninguna de las infusiones en estudio reguló los niveles de expresión de la proteína K-ras.

El efecto protector de las infusiones de encino contra cáncer de colon es dependiente de la especie en estudio, ya que el nivel de expresión de la proteína β -catenina disminuyó en los animales tratados con la infusión de *Q. sideroxylla*, por lo que dicha infusión podría regular negativamente la proliferación celular. Sin embargo, ninguna de las infusiones en estudio reguló los niveles de expresión de la proteína K-ras.

Toda la información generada en el presente trabajo contribuye al incremento de los conocimientos acerca del efecto biológico en modelos animales, y hasta el momento aparentemente tóxico, de las infusiones obtenidas a partir de las hojas de algunos encinos del género *Quercus*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Akkiprik, M., Celikel, C.A., Düsünceli, F., Sönmez, O., Güllüoğlu, B.M., Sav, A., and Ozer, A.** 2008. Relationship between overexpression of ras p21 oncoprotein and K-ras codon 12 and 13 mutations in Turkish colorectal cancer patients. *Turk J Gastroenterol.* 19:22-27.
- Albert, B.D., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson.** 1994. *Molecular biology of the cell.* Edit. Garland. p. 769-766, 1288-290.
- Anisimov, V.N., Ukraintseva, S.V., and Yazhin, AI.** 2005. Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans? *Nat Rev Cancer.* 5:807-819.
- Anuario Estadístico.** 2007. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México, D.F. www.inegi.gob.mx.
- Arias, J.** 2000. *Enfermería Médico-quirúrgica.* Edit. Tebar. Madrid, España. 11: p. 120.
- Behrens, J., Kries, J., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W.** 1996. Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.* 382:638–642.
- Belitz, T., and Grosch, J.** 1988. *Química de los alimentos.* Edit. Acribia. España, Zaragoza. p. 25-49.
- Biggs, A., Kapricka, C., and Lundgren.** 2000. *Biología: la dinámica de la vida.* Edit. McGraw-Hill. p.277-278.
- Billard, C., Izard, J.C., Roman, V., Kern, C., Mathiot, C., Ments, F., and Kolb, J.P.** 2002. Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, viniferin and vine-shot derivated polyphenols (vineatrols) on chronic B lymphocytic leukaemia cells and normal human lymphocytes. *Leuk Lymphoma.* 43:1991-2002.
- Cao, G., and Prior, R. L.** 1993. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem.* 44:1309-1315.
- Celik, C., Lewis, D. A., and Mittleman, A.** 1983. Induction of colon mucosal beta-glucuronidase production as a mechanism for 1,2-DMH colon carcinogenesis. *J Surg Oncol.* 24:209-211.
- Chan, J.M., and Giovannucci, E.L.** 2001. Vegetables, fruits, associated micronutrients, and risk of prostate cancer. *Epidemiol Rev.* 23: 82–86.
- Chen, C., Yu, R., Owuor, E.D., and Kong, A.N.** 2000. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch Pharm Res.* 23:605–612.

- Clayson, D.B.** 2000. Toxicological carcinogenesis. Edit. Lewis publishers. p. 2-5.
- Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S., and 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.
- Cotran, R.S., Kumar, V. and Collins, T.** 2000. Patología estructural y funcional. Edit. McGraw Hill-Iberoamericana. México. (8):277-347.
- Curtis, M., Page, P., Sutter, M., Walker, M., and Hoffman, B.** 1998. Farmacología integrada. 1ª. Edición. Edit. Harcourt. Madrid, España. p. 523-535.
- Darrell, S., Friedman, R., Dzubow, L., Reintgen, D., Bystry, J., and Marks, R.** 2006. Cáncer de piel. Edit. Elsevier Saunders. España. p. 1-62.
- De Vita, V.T., Hellman, and Rosenberg, S.** 1999. Cáncer. Principios y prácticas de oncología. Edit. Médica Panamericana. p.79-102.
- Doll, R., and Peto, R.** 1981. The causes of cancer. Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst.* 66:1191-1308.
- Dreosti, I.E., Wargovich, M.J., and Yang, C.S.** 1997. Inhibition of carcinogenesis by tea: the evidence from experimental studies. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 37:761-770.
- Endo, T., Ookawa, K., Tanaka, M., Nakaji, S., Tsuchida, S. and Sugawara, K.** 2001. Differences in carcinogenesis by the length of carcinogen exposure period in rat colon. *Dig Dis Sci.* 46:109-117.
- El-Serafi, M.M., Bahnassy, A.A., Ali, N.M., Eid, S.M., Kamel, M.M., Abdel-Hamid, N.A. and Zekri, A.R.** 2010. The prognostic value of c-Kit, K-ras codon 12, and p53 codon 72 mutations in Egyptian patients with stage II colorectal cancer. *Cancer.* DOI:10.1002/cncr.25417.
- Erturk, Y., Ercisli, S., Sengul, M., Eser, Z., Hazneder, A. and Turan M.** 2010. Seasonal variation of total phenolic, antioxidant activity and minerals in fresh tea shoots (*Camellia sinensis var. sinensis*). *Pak J Pharm Sci.* 23:69-74.
- Eskin, M., and Tamir, S.** 2006. Dictionary of nutraceuticals and functional foods. CRC Press. New York. USA, 332-334.
- Femia, A.P., Bendinelli, B., Giannini, A., Salvadori, M., Pinzani, P., and Dolara, P.** 2005. Mucin-depleted foci have beta-catenin gene mutations, altered expression of its

protein, and are dose- and time-dependent in the colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. *Int J Cancer*. 116:9–15.

Femia, A.P., and Caderni, G. 2008. Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. *Planta Med*. 74:1602–1607.

Fenoglio, C.M., Kaye, G.I., Lane, N. 1973. Distribution of human colonic lymphatic in normal, hyperplastic, and adenomatous tissue: its relationship to metastasis from small carcinomas in pedunculated adenomas, with two case reports. *Gastroenterology*. 64:51-66

Fenoglio, C.M., and Pascal, R.R. 1982. Colorectal adenomas and cancer: pathologic relationship. *Cancer*. 50:2601-2608.

Fenton, J.I., and Hord, N.G. 2006. Stage matters: choosing relevant model systems to address hypotheses in diet and cancer chemoprevention research. *Carcinogenesis*, 27:893-902.

Fernandez-Correa, J. 2009. Efecto quimioprotector de extractos de *M. parviflora*, *C. murale* y *P. aleraceae* sobre el desarrollo de cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. UAQ. Querétaro, México.

Fornos, R. 1997. Cáncer y trabajo: carcinogénesis laboral inducida por agentes químicos. *Generalitat Valenciana* 23: 1-135.

Gao, X., Xu, Y.X., Divene, G., Janakirama, H., Chapman, R.A., and Gautam, S.C. 2002. Disparate *in vitro* and *in vivo* antileukemic effects of resveratrol, a natural polyphenolic compound found in grapes. *J Nutr*. 132:2076-2081.

Geoffrey, M. 2000. *The cell: a molecular approach*. Edit. SINAUER. p.1358.

Graham, H. N. 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med*. 21:334–350.

Grande, M. 2003. La vía de Ras: En un modelo de fibrosis renal experimental. www.monografias.com/.../via-de-ras.shtml.

Griffiths, D.W. 1979. The inhibition of digestive enzymes by extracts of field vean (*Vicia faba*). *J Sci Food Agric*. 30:458-462.

Griffths, A., Gelbart, W., Miller, J., and Lewointin, R. 2000. *Genetica moderna*. Edit. McGrawHill-Interamericana. p. 479.

Gruenwald, J. 2009. Novel botanical ingredients for beverages. *Clin Dermato*. 27:210–216.

- Hao, X.**, Tomlinson, I., Ilyas, M., Palazzo, J.P., and Talbot, I.C. 1997. Reciprocity between membranous and nuclear expression of beta-catenin in colorectal tumours. *Virchows Arch*, 431:167–172.
- Helen, C.**, and Barnes, N. 2000. *Biología*. 6^{ta} Edición. Edit. Panamericana. p. 286-287.
- Henning, S. M.**, Lira, C. F., Lee, H. W., Youssefian A. A. Go, V. L. W., and Heber, D. 2003. Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity. *Nutr Cancer*. 45(2):226-235.
- Hernández-Rivera, E.** 2009. Efecto de los extractos de verdolaga (*Portulaca oleraceae*) y malva (*Malva parviflora*) en la expresión de los proteínas K-ras y PKB y mutaciones en los genes *K-ras* y *Nrf2* en un modelo de cáncer de colon. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. UAQ. Querétaro, México.
- Ho, K.**, Yazan, L.S., Ismail, N., and Ismail, M. 2009. Apoptosis and cell cycle arrest of colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin. *Cancer Epidemiol*. 33:155-160.
- Horigome, T.**, Kumar, R., and Okamoto, K. 1988. Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plants on digestive enzymes in vitro and in the intestine of rats. *Br J Nutr*. 60:275-285.
- Hülsken, J.**, and Behrens, J. 2000. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. 113: 3545.
- http://biogenmol.blogspot.com/2008_08_10_archive.html).
- <http://www.darmcontrole.nl,2007>.
- http://.piaichinh.org/index.php?page/el_alimento/2.
- <http://www.botanical-online.com/plantasvenenosas.htm#taninos>.
- Issa, A.Y.**, Volate, S.R., Muga, S.J., Nitcheva, D., Smith, T., and Wargovich, M.J. 2007. Green tea selectively targets initial stages of intestinal carcinogenesis in the AOM-ApcMin mouse model. *Carcinogenesis*. 28:1978-1984.
- Itzkowitz, S.H.**, and Yio, X. 2004. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 287:G7-17.
- Ivanova, D.**, Gerova, D., Chervenkov T., and Yankova, T. 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 96:145-150.

- Jackson**, P.E., Cooper, D.P., O'Connor, P.J., and Povey, A.C. 1999. The relationship between 1,2-dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumors: tumor development in female SWR mice does not require a K-ras mutational event. *Carcinogenesis*. 20:509–513.
- Jackson**, P.E., O'Connor, P.J., Cooper, D.P., Margison, G.P., and Povey, A.C. 2003. Associations between tissue-specific DNA alkylation, DNA repair and cell proliferation in the colon and colon tumour yield in mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis*. 24:527–533.
- Jeon**, S., Jeong, S., Lee, C., Kim, J., Kim, Y., Chung, H., Park, S., and Seong, R. 1998. Expression of Tcf-1 mRNA and surface TCR-CD3 complexes are reduced during apoptosis of T cells. *Int Immunol*. 10:1519–1527.
- Jia**, X.D., and Han, C.H. 2000. Chemoprevention of tea on colorectal cancer induced by dimethylhydrazine in wistar rats. *World J Gastroenterol*. 6:699-703.
- Jiménez**, A. C. D. 1990. Catálogo de plantas comestibles en la República Mexicana. I. Árboles, arbustos y otras leñosas. Informe del Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México, D.F.
- Katiyar**, S.K., and Mukhtar, H. 1996. Tea in chemoprevention of cancer: epidemiologic and experimental studies. *Int J Oncol*, 8:221-238.
- Klaassen**, C.D., Amdur, M.O., and Doull, J. 1996. Cassarett y Doull's Toxicology: The basic science of poisons. 5^a Edition. Edit. McGrawHill. New York. (14): 201-205.
- Kohlmeier**, L., Weterings, K.G., Steek, S., and Kok, F.J. 1997. Tea and cancer prevention: an evaluation of the epidemiologic literature. *Nutr Cancer*. 27:1-13.
- Korinek**, V., Barker, N., Morin, P., Wichen, D., Weger, R., Kinzler, K., Vogelstein, B., and Clevers, H. 1997. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science*. 275:1784–1787.
- Liener**, I.E. 1990. Naturally occurring toxic factors in animal feedstuffs. In: J. Wiseman and D.J.A. Cole (Ed) feedstuff evaluation. Butterworths London.
- Linares**, S.E., Sánchez, C.J.A., Capitán, M.L., Gómez, P.M., González, M.M.J., Mendoza, O.F.J. 2002. Relación entre el grado de diferenciación celular del cáncer colorrectal y su distribución topográfica. *Rev Esp*. 94 (2): 78-87.
- Liu**, M., Li, X.Q., Weber, C., Lee, C.Y., Brown, J., and Liu, R.H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J Agric Food Chem*. 50:2926-2930.
- Luna**, A.L., Montalvo, E.L., y Rendón, A.B. 2003. Los usos no leñosos de los encinos en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 72:107-117.

- Luczaj, L.**, and Szymanski, W.M. 2007. Wild vascular plants gathered for consumption in the Polish countryside: a review. *J Ethnobiol Ethnomed.* 3:17.
- Ma, Q.Y.**, Williamson, K. E. and Rowlands, B.J. 1990. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Edit. Cold Spring Harbor Laboratory. p. 9-14.
- Madhavi, D.L.**, Desphande, S.S., Salunkhe, D.K. 1996. *Technological, Toxicological and Health perspectives.* 1^a. Edition. Edit. Marcel Dekker, Inc. EUA. p. 73-105.
- Manju, V.**, and Nalini, N. 2006. Effect of ginger on bacterial enzymes in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev.* 15:377-383.
- Markham, K.R.** 1982. *Techniques of flavonoid identification.* Academic Press Inc. New York, N.Y. p. 16-24.
- Miller, N. J.**, Rice-Evans, C. A., Davies, M. J., Gopinathan, V., and Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84:407-412
- Molenaar, M.**, Wetering, M.V.D., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Odsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O., and Clevers, H. 1996. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell.* 86:391–399.
- Mukhtar, H.**, and Ahmad, N. 1999. Green tea in chemoprevention of cancer. *Toxicol Sci.* 52:111-117.
- Mukhtar, H.**, and Ahmad, N. 2000. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr.* 7:1698-1702.
- Muto, T.**, Bussey, H.J., and Morson, B.C. 1975. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer.* 36:2251-2270.
- 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.
- Nalini, N.** Manju, V., and Menon, V.P. 2004. Effects of coconut cake on the bacterial enzyme activity in 1,2-dimethylhydrazine induced colon cancer. *Clin Chim Acta.* 342:203-210.
- Nurmi, K.**, Ossipov, V., Huakioja, E., and Pihlaja, K. 1996. Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Berula pubescens* ssp. *tortuosa*). *J Chem Ecology.* 22:2023-2040.

- OMS**, Organización Mundial de la Salud. 1995. Programas nacionales de lucha contra el cáncer. p. 7-26.
- Orford**, K., Crockett, C., Jensen, J., Weissman, A., and Byers, S. 1997. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem.* 272:24735–24738.
- Pawson**, T., and Bernstein, A. 1990. Receptor tyrosine kinases: genetic evidence for their role in *Drosophila* and mouse development. *Trends Genet.* 6:350-355.
- Peralta**, O., Bahwna, M., Díaz, C., and Madrid, V. 1997. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública Mexicana.* 39:451-462.
- Piñols**, C. 1995. Estudio de los cambios en la mucosa colónica de rata y cinética celular durante la carcinogénesis experimental inducida con 1,2-Dimetilhidracina. Tesis para obtener el título de doctor en ciencias. Universidad de Lleida. Barcelona, España. 31-50, 86-95.
- Povey**, A. C., Badawi A.F., Cooper, D.P., Hal C. N., Harrison K. I., Peta E. J., Lees, N. P., O’connor P.J., and Margison G. P. 2002. DNA alkylation and repair in the large bowel: animal and human studies. *J Nutr.* 132:3518S-3521S.
- Pretlow**, T.G., and Pretlow, T.P. 1994. Biochemical and molecular aspects of selected cancers. Volumen 2. Edit. Academic Pres. Inc. p. 47-70.
- 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: standarized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol.* 14:931-968.
- Rocha-Guzmán**, N.E., Gallegos-Infante, J.A., Gonzales-Laredo, R.F., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., García-Gasca, T., Rodríguez-Muños, M.E., Guzmán-Maldonado, S.H., Medina-Torres, L., and Lujan-García, B.A. 2009. Antioxidant activity and genotoxic effect on HeLa cells of phenolic compounds from infusions of *Quercus resinosa* leaves. *Food Chemistry* doi:10.1016/j.foodchem.
- Rostango**, H.S. 1972. Nutritive evaluation of sorghum grains in Chicks. These de doctorat. Purdue University, West Lafayette, Indiana, Etats-Unis.
- Sánchez-Negrete**, M., Montenegro, M. A., Catuogno, M.S., Lértora, W.J., and M.C. Guanziroli. 2007. Decrease of intestinal tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats fed with cow milk and buffalo milk. *Biocell.* 31:391-396.

- Sengupta, A., Ghosh, S., and Das, S.** 2003. Tea can protect against aberrant crypt foci formation during azoxymethane induced rat colon carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res.* 22: 185-191.
- Shahrzard, S., Aoyagi, K., Winter, A., Koyama, A., and Bitsch, I.** 2001. Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J Nutr.* 131:1207-1210.
- Sheng, H., Williams, C.S., Shao, J., Liang, P., DuBois, R.N., and Beauchamp, R.D.** 1998. Induction of cyclooxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblasts and the role of mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* 273:22120–22127.
- Shimizu, M., Fukutomi, Y., Ninomiya, M., Nagura, K., Kato, T., Araki, H., Suganuma, M., Fujiki, H., and Moriwaki, H.** 2008. Green tea extracts for the prevention of metachronous colorectal adenomas: A pilot study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17:3020-3025.
- Silanikove, N.** 1996. Goats fed tannin-containing leaves do not exhibit toxic syndromes. *Small Ruminants Res.* 21:195-201.
- Singh, J., Kulkarni, N., Kelloff, G., and Reddy, B.S.** 1994. Modulation of azoxymethane-induced mutational activation of *ras* protooncogenes by chemopreventive agents in colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 15:1317–1323.
- Stoisa, D., Costamagna, C., Giacosa, S., Bonini, C., Lucena, M.E. and Villavicencio, R.L.** 2004. Tumores primarios de vejiga: Evaluación tomográfica del parámetro T. *Anuario Fundación Dr. J.R. Villavicencio.* p. 139-143.
- Suárez, T.H.** 2003. Forjadores de la ciencia en la UNAM. Universidad autónoma de México.
- Sugimura, T.** 2000. Nutrition and dietary carcinogen. *Carcinogenesis,* 21:387-395.
- Sun, Y., and Li, Y.** 1988. Induction of beta-glucuronidase activity during dimethylhydrazine carcinogenesis and additive effects of cholic acid and indole. *Cancer Let.* 39:69-76.
- Takahashi, M., Fukuda, K., Sugimura, T., and Wakabayashi, K.** 1998. Beta-catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. *Cancer Res.* 58:42–46.
- Takahashi, M., Mutoh, M., Kawamori, T., Sugimura, T., and Wakabayashi, K.** 2000. Altered expression of beta-catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 21:1319–1327.

- Takahashi, M.**, and Wakabayashi, K. 2004. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci.* 95:475-480.
- Teague, C.A.** 1990. Experimental colon carcinogenesis. Edit. McGraw-Hill. p. 108-123.
- Tijburg, L.B.**, Mattern, T., Folts, J.D., Wiesgerber, U.M., and Katan, M.B. 1997. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 37:771-785.
- Valencia, S.** 2004. Diversidad del género *Quercus* en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 75:33-53.
- Villalón-Corona, B.** 2004. Efecto de la luteína sobre genes K-ras y beta-catenina durante la quimioprotección del cáncer de colon en ratas Spague-Dawley. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. UAQ. Querétaro, México.
- Watson, R.** 2003. Functional foods and nutraceuticals in cancer prevention. CRC, p. 4-5.
- Organización Mundial de la Salud, OMS World Health Organization.** 2007. The World Health Organization's fight against cancer: strategies that prevent, cure and care. ISBN 978 92 4 159543.
- Xiao, H.**, Hao, X., Simi, B., Ju, J., Jiang, H., Reddy, B.S., and Yang, C.S. 2008. Green tea polyphenols inhibit colorectal aberrant crypt foci (ACF) formation and prevent oncogenic changes in dysplastic ACF in azoxymethane-treated F344 rats. *Carcinogenesis.* 29:113-119.
- Yamada, Y.**, Yoshimi, N., Hirose, Y., Kawabata, K., Matsunaga, K., Shimizu, M., Hara, A., and Mori, H. 2000. Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 60:3323–3327.
- Yang, C.S.**, Chung, J.Y., Yang, G., Chhabra, S.K., and Lee, M.J. 2000. Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *J Nutr.* 130:472S-478S.
- Yang, C. S.**, Landau, J. M., Huang, M.T., and Newmark, H.L. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr.* 21:381–406.
- Young, C.**, Kitamura, M., Hardy, S., and Kitajewski, J. 1998. Wnt-1 induces growth, cytosolic b-catenin, and Tcf/Lef transcriptional activation in Rat-1 fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 18:2474–2485.

X. ANEXO I

10.1. Soluciones para la determinación de fenoles.

10.1.1. Folin Ciocalteu 1 N.

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

10.1.2. Carbonato de sodio al 20%.

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

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

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

10.2. Curva de calibración de ácido gálico:

Cuadro 1. Mezclas de reacción del estándar ácido gálico para la elaboración de la curva de calibración.

Tubo	µl de ácido gálico 0.1mg/ml	µl agua destilada	µl de reactivo de folin 1N	µl de carbonato de sodio 20%
1	0	500	250	1250
2	20	480	250	1250
3	40	460	250	1250
4	60	440	250	1250
5	80	420	250	1250

6	100	400	250	1250
7	120	380	250	1250
8	140	360	250	1250
9	160	340	250	1250
10	20 (muestra)	480	250	1250

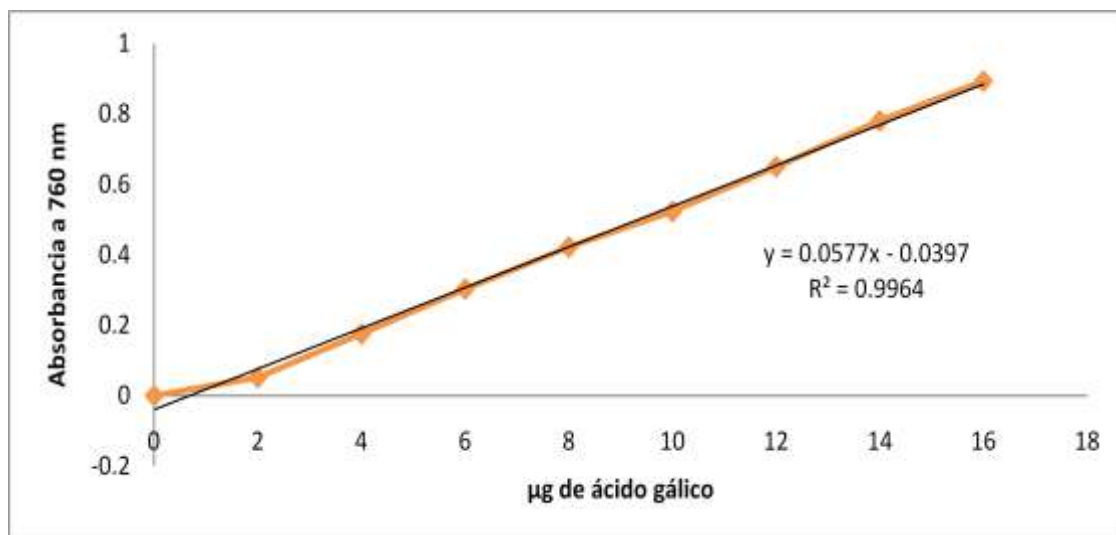


Figura 1. Curva de calibración del estándar **ácido** gálico para la cuantificación de fenoles totales.

10.3. Soluciones para la determinación de flavonoides totales.

10.3.1. Nitrito de sodio al 5%.

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

10.3.2. Cloruro de aluminio al 10%.

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

10.3.3. Hidróxido de sodio 1 M.

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

10.3.4. Solución estándar de (+)-catequina.

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

10.4. Curva de calibración (+)-catequina:

Cuadro 2. Mezclas de reacción del estándar (+)-catequina para la elaboración de la curva de calibración

Tubo	µl catequina 1mg/ml	µl agua destilada	µl nitrito de sodio 5%	µl cloruro de aluminio 10%	µl hidróxido de sodio 1M	µl agua destilada.
1	0	1250	75	150	500	525
2	20	1250	75	150	500	505
3	40	1250	75	150	500	485
4	60	1250	75	150	500	465
5	80	1250	75	150	500	445
6	100	1250	75	150	500	425
7	100 (muestra)	1250	75	150	500	425

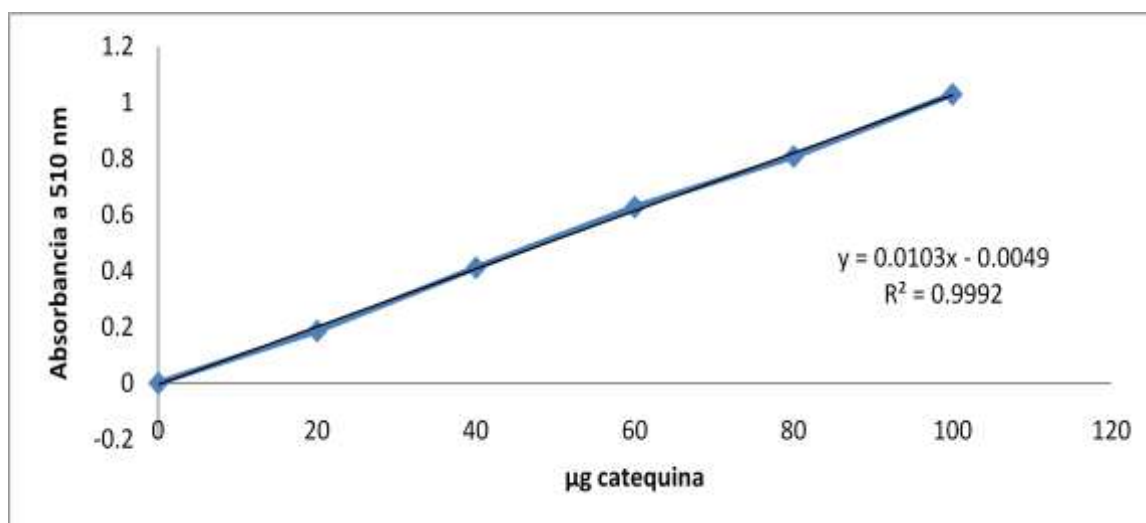


Figura 2. Curva de calibración del estándar (+)-catequina para la determinación de flavonoides totales.

10.5. Reactivos para la determinación de capacidad antioxidante.

10.5.1. Solución ABTS.

Preparación primaria de ABTS 7 mM (se pesa 0.01920 g de ABTS y se disuelven en 5 ml de agua HPLC) y persulfato de potasio 140 μ M (se pesa 0.1892 g y se disuelven en 5 ml de agua HPLC). La solución ABTS se preparará poniendo a reaccionar 5 ml de la solución acuosa de ABTS 7 mM con 88 μ l de persulfato de potasio 140 μ M, se almacena a oscuridad por 12 horas.

10.6. Curva de calibración Trolox:

Cuadro 3. Mezclas de reacción para la obtención de la curva de calibración del estándar Trolox.

Tubo	μl de Trolox 2500 μM	μl de metanol
1	0	1000
2	50	950
3	100	900
4	200	800
5	300	700
6	400	600
7	500	500
8	600	400
9	700	300
10	800	200

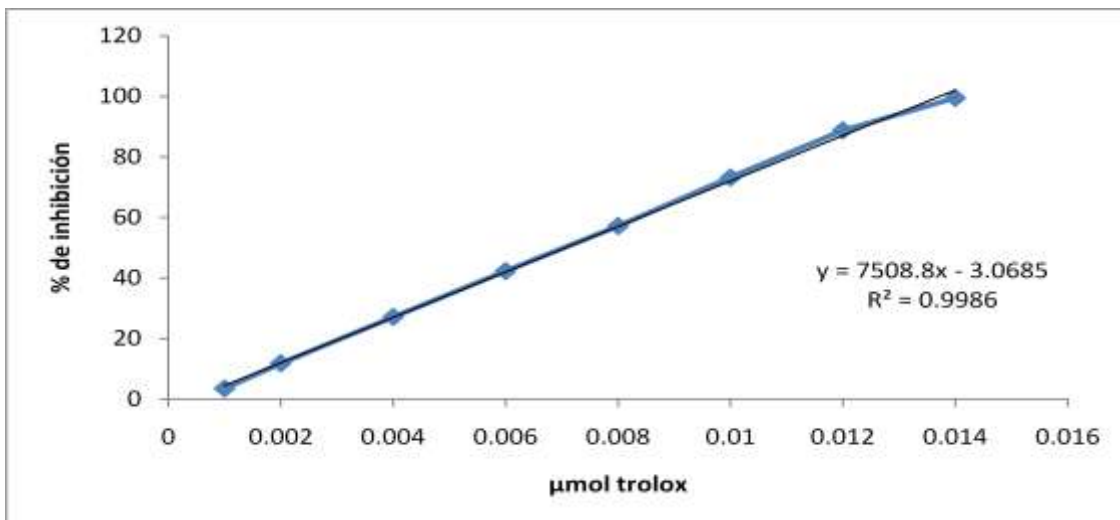


Figura 3. Curva de calibración de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante.

XI. ANEXO II

11.1. Preparación de 1,2-dimetilhidrazina.

Se pesan 400 mg de 1,2-DMH, posteriormente se disuelven en 100 ml de agua destilada al 0.9% de solución salina (NaCl) con 37 mg de EDTA, ajustando el pH a 6.5 usando NaOH 5 M.

11.2. Curva calibración Albumina.

Cuadro 4. Mezclas de reacción del estándar albumina para la obtención de la curva de calibración.

Tubo	µl solución estándar	µl agua	Concentración final µg/50µl
1	135	90	60
2	90	135	40
3	45	180	20
4	22.5	202.5	10
5	11.3	213.7	5
6	5.6	219.4	2.5
7	2.8	222.8	1.25
8	0	225	0

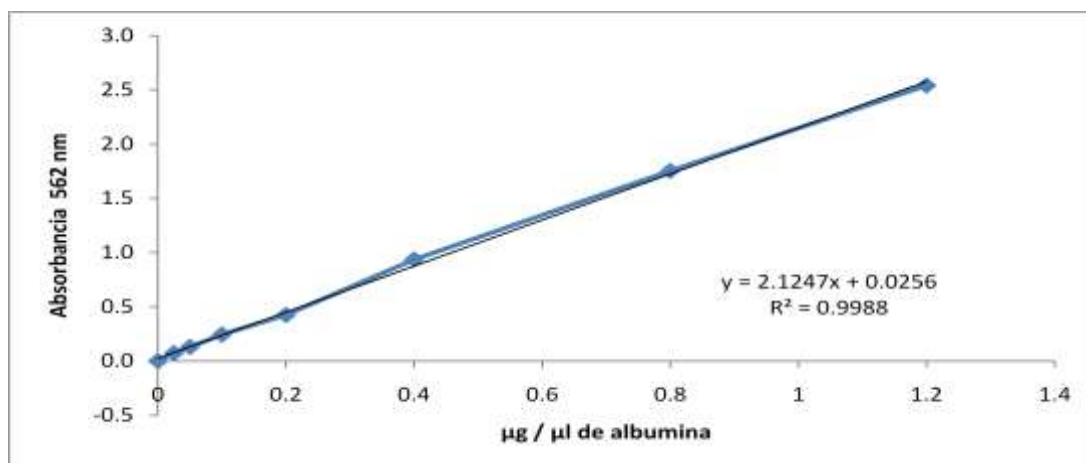


Figura 4. Curva de calibración de albumina para la determinación del contenido de proteínas totales.

11.3. Soluciones para gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes.

11.3.1. Acrilamida-bisacrilamida 30%.

Pesar 58.4 g de acrilamida y 1.16 g de bis-acrilamida, disolverlos en 100 ml de agua y aforar a 200 ml. Almacenar en frasco ámbar a 4°C.

11.3.2. Tris-HCl 3M –SDS 30%.

Pesar 71.66 g de tris base y, 0.6 g de SDS, disolverlos en 100 ml de agua y agregar 16.32 ml de HCl concentrado y aforar a 200 ml. Guardar a T ° ambiente.

11.3.3. Glicerol 79.5%.

Mezclar 79.5 ml de glicerol por cada 100 ml de agua.

11.3.4. Persulfato de amonio 10%.

Disolver 1 g de persulfato de amonio en 5 ml de agua y aforar a 10 ml. Alicuotar y congelar.

11.3.5. Solución digestora para proteínas (2X).

Tris HCl 100mM pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20% y azul de bromofenol al 0.02% (concentraciones finales). Almacenar a T° ambiente. Al momento de utilizarlo adicionar 2-mercaptoetanol en concentración final de 5%.

11.3.6. Solución amortiguadora superior.

Disolver 12.11 g de tris base, 17.92 g de tricina y 1 g de SDS en 500 ml de agua y aforar a 1 L.

11.3.7. Solución amortiguadora inferior.

Disolver 24.22 g de tris base en 500 ml de agua, ajustar pH a 8.9 con HCl concentrado y aforar a 1 L.

11.4. Soluciones para transferencia semi-seca.

11.4.1. Solución amortiguadora de transferencia

Disolver 5.8 g de tris base y 2.93 g de glicina en 500 ml de agua y aforar a 1 L.

11.5. Soluciones para western blot.

11.5.1. TBS.

Mezcal 30 ml de NaCl 5M, 10 ml de Tris-HCl 1 M en 500 ml de agua y aforar a 1 L.

11.5.2. TTBS.

Mezcal 30 ml de NaCl 5M, 10 ml de Tris-HCl 1 M, 1ml de Tween-20 en 500 ml de agua y aforar a 1 L.