



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

INHIBICIÓN DE LAS LESIONES
PRECANCEROSAS DE COLON POR MEDIO DE
UN EXTRACTO PROTÉICO DE VICIA FABA.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A N

JACQUELINE DEL MONTE ALTAMIRANO

LUZ AMALIA SÁNCHEZ AVILA

ASESORA:

DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
**Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la **Tesis:**
Inhibición de las lesiones precancerosas de colon por medio de un extracto proteico de Vicia Faba.

Que presenta la pasante: **Jacqueline del Monte Altamirano**
Con número de cuenta: 303272148 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcallí, Méx. a 16 de agosto de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Gabriela Escalante Reynoso	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er SUPLENTE	M. en C. Verónica Castro Bear	
2do SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Inhibición de las lesiones precancerosas de colon por medio de un extracto protéico de Vicia Faba.

Que presenta la pasante: Luz Amalia Sánchez Avila

Con número de cuenta: 406067162 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcallí, Méx. a 16 de agosto de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Areco	
VOCAL	Q.F.B. Gabriela Escalante Reynoso	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er SUPLENTE	M. en C. Verónica Castro Bear	
2do SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

Agradecimientos:

- ♣ A la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo por cree que nostras seriamos capaces de realizar este gran proyecto, por su confianza, disposición, compromiso y por su inmensa sabiduría que nos guio en el arduo camino hacia nuestro éxito, por ser una de las mejores profesoras de la carrera.
- ♣ Al personal del Laboratorio de citogenética L-521 Sr. Pablo, a laboratorio 9 de la UIM y unidad de aislamiento Dr. Crisóforo por su entera disipación y facilitarnos el trabajo al otorgarnos la ayuda necesaria para la realización de este trabajo.
- ♣ Al M. en C. Germán I. Garrido Fariña por sus amplios conocimientos otorgados, su paciencia y tiempo invertido en la elaboración de una parte primordial de la experimentación, comprensión y guía para la interpretación de los resultados.

Luz Amalia:

- ♣ A Dios que me ilumino el camino para llegar a esta enorme y fabulosa Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, y darme la oportunity de existir bajo el regazo, protección, amor y apoyo de esta mi amada familia, que han caminado a mi lado a cada paso, por ser maravillosos Padres y un buen Hermano.
- ♣ A la grandiosa Universidad Nacional Autónoma de México que me dio la oportunity de ser orgullosamente parte de ella, pues me brindo la oportunity de vivir grandiosas y valiosas experiencia que son fundamentales en mi vida.
- ♣ A todos mis profesores de la carrera, pero en especial a mis queridas maestras del paquete terminal de genética Dra. Sandra Díaz, Q.F.B Rosalba Bonilla, M. en C. Maritere Domínguez y M. en C. Andrea Becerril, que me trasmitieron sus enormes y maravillosos conocimientos, por abrirme a un mundo fabuloso que es la genética, pues gracias a ellas sé que mi camino está en la investigación para mejorar la vida.
- ♣ A mis amigas de la universidad por disfrutar conmigo esta aventura.
- ♣ A Judith y Tania, que emprendieron el camino conmigo y ha sido el aliento mutuo el que nos ha ayudado a seguir las quiero mucho.

Jacqueline:

- ♣ Dios por poner en mi camino los dos ángeles más hermosos, inteligentes y bondadosos de mi mundo mis Mamis a las que les debo todo lo que soy.
 - ♣ A mi amada Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de su familia y a mi querida Facultad quien me dio las mejores experiencias de mi vida.
 - ♣ A mis profesores en general y en especial a los del P.T. de Genética M. en C. Maritere Domínguez, Q.F.B. Rosalba Bonilla, Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo y Andrea Becerril por mostrarme un mundo más allá del que conocía y enseñarme el amor por la genética.
 - ♣ A la Dra. Adriana Días Anzaldúa por aceptarme en su equipo de trabajo y ayudarme con sus consejos y sobre todo por su gran amistad.
 - ♣ José Octavio Lagunas Hernández por su invaluable amistad y su inmensa confianza.
 - ♣ A mi hermana Fanny por aparecer en mi vida y enseñarme a compartir.
 - ♣ A los Srs. Lucy y Agustín les doy las infinitas gracias por haberme adoptado como un miembro más de su familia, por toda su sabiduría, su confianza y por su cariño.
 - ♣ A Luz, Guadalupe, Lucila y Carlos por su gran amistad y su apoyo en la realización de este trabajo.
-

Dedicatorias:

Luz Amalia:

- ❖ Para mis **padres**, ya que ustedes han estado conmigo incondicionalmente, porque me enseñaron a amar la vida, y a enfrentar cualquier reto con valor. Pues gracias a ustedes aprendí a valorar el conocimiento y que es la mejor herencia que me han podido dar. Muchas gracias por reír, llorar, enojarse, disfrutar, creer, celebrar y vivir cada emoción junto a mí a lo largo de toda mi vida. Y por la comprensión y ayuda que me brindaron a lo largo de este gran proyecto, los amo.
 - ❖ A mi querido **hermano** que fue él quien desde niños me enseñó a querer descubrir el mundo a partir de la ciencia, pues has sido un fabuloso compañero en esta travesía de conocer la vida. Muchas gracias por el aliento y la ayuda cuando nadie más estaba ahí tuve tu mano amiga, te quiero mucho. Y a su esposa **Araceli** que ha demostrado ser una gran y excelente amiga muchas gracias por el apoyo y cariño te quiero.
 - ❖ A mi **bebé** que has venido para alegrarme esta maravillosa etapa, porque contigo emprenderé una maravillosa aventura y desde este momento me has enseñado que en este mundo nada es imposible mientras se tenga amor, por eso te dedico a ti este trabajo pues espero que algún día te inspire a lograr cosas maravillosas. Te amo.
 - ❖ A mis grandes amigos **Georgina, Mario, Julia e Iván** que desde el momento en que nos hicimos amigos jamás me han dejado sola, por su confianza, comprensión y por crecer a mi lado muchas gracias, pues cada etapa con ustedes ha sido importante y fundamental. Porque nuestra amistad no tiene comparación ya que somos únicos los quiero mucho.
 - ❖ A mi tía **Clemen** que siempre creyó en mí. A mi tío **Alfonso y Martha** que siempre me alentaron a seguir. A mi tía **Kali y Abuelita** que siempre me han apoyado con su cariño. Y a mi tía **Guadalupe** que siempre confió en que yo llegaría a ser alguien y que desde donde esta se que aun me apoya. Gracias de verdad los quiero mucho.
 - ❖ A mis amigas **Lucila y Guadalupe** por ser únicas y buenas amigas, pues compartimos un camino hermoso que espero que dure muchos más años, las quiero.
 - ❖ A **Jacqueline** por ser una buena amiga y compañera, por aceptar este gran reto a mi lado, ya que vivimos grandes experiencias juntas, espero que nuestra amistad siga creciendo y no se acabe nunca, te quiero.
-

Jake:

- ♣ A **mis Mamis** por que ustedes han sido siempre lo mas importante y mejor de mi vida, por que mis logros ha sido siempre sus logros y por que todo lo que hago es por amor a ustedes, es mas suyo que mío, las amo con todo mi corazón.
 - ♣ A **mi hermana Fanny**, nena te amo y sabes que siempre me tendrás a mi.
 - ♣ A mi otra familia gracias por tanta confianza, apoyo y amor, por que con su presencia se ganaron mi admiración y mi respeto. Mi éxito también es suyo **Lety, Richar, Uri y Diego** los amo.
 - ♣ A la familia eslava del monte por que siempre han estado en mi mente y mi corazón me han enseñado que la vida es mejor cuando se esta acompañado, gracias por todo **Madrina, Papito, Normita, Jeshua, Pedro, Carlos, Alexis, Lupita, Juan, Emiliano, y Paty**.
 - ♣ A mi **Abue, Tere, Yolita y tía Tere** por creer en mi y ayudarme a crecer les doy las infinitas gracias, las quiero.
 - ♣ A **Luz** no tengo palabra para agradecer que halla llegado a mi vida y por trabajar conmigo eres una persona muy especial y me alegra contar contarte como una de mis mejores amigas te quiero mucho.
 - ♣ A **Guada** por que cada momento que hemos pasado juntas, no los imagino con ninguna otra persona, me encanta tu compañía gracias por todo, te quiero mucho.
 - ♣ A **Lucila** por tu preciosa amistad y el honor de compartir contigo los mejores momentos de la vida. **Carlitos, Faresha y Sara** por estar siempre al pendiente y cuidar esta linda amista los quiero amigos.
 - ♣ A **Luis Angel** por enseñarme a vivir y por estar conmigo en cada etapa de la vida por las inmensas experiencias que hemos vivido, por aceptarme como soy y por todo lo que nos falta, eres una de mis personas favoritas, te adoro.
 - ♣ A mis amigos de guardia con los que he crecido, los que han estado en las buenas y malas y las que vienen los quiero y deseo lo mejor a todos **Luis Angel, Marcia, Ian, Ostín, Luis Angel Campos, Paul, Pakito, Carlos, Ivan, Saira, Hugo, Susanita.....**gracias por ser parte de mi vida.
 - ♣ A ti por ser parte fundamental en su momento y por mostrarme el maravilloso arte del amor, por siempre gracias.
-

La presente investigación se realizó en el Laboratorio 9 Genética y Toxicología, así como en el bioterio y unidad aislamiento de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FESC, bajo la dirección de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo.

Las preparaciones histológicas se realizaron en el L-710 de Cs. Morfológicas de Campo 4 bajo la asesoría del M en C. Germán I. Garrido Fariña.



Índice	1
Abreviaturas	3
Índice de figuras	4
Índice de tablas	5
Resumen	6
1. Marco teórico	8
1.1. <u>Introducción</u>	8
1.2. <u>Principales características del intestino grueso humano</u>	9
1.2.1. Anatomía.....	9
1.2.2. Fisiología.....	11
1.2.3. Histología.....	13
1.3. <u>Cáncer de colon</u>	16
1.3.1. Generalidades.....	16
1.3.1.1. Factores de riesgo.....	16
1.3.1.2. Lesiones digestivas precancerosas.....	18
1.3.2. Antecedentes históricos.....	20
1.3.3. Evolución y estadios del cáncer.....	21
1.3.3.1. Genes que participan en la inducción del CCR.....	24
1.3.3.2. Estadios del CCR.....	31
1.3.4. Diagnóstico.....	38
1.3.5. Tratamiento.....	42
1.4. <u>Modelo de inducción de lesiones precancerosas</u>	44
1.4.1. Importancia y antecedentes.....	44
1.5. <u>Sustancias inductoras</u>	49
1.5.1. Mecanismo de acción de la 1,2-Dimetilhidrazina.....	49
1.5.2. 2,4-Dinitrofenilhidrazina.....	53
1.5.2.1. Generalidades y aplicaciones.....	53
1.5.2.2. Síntesis.....	54
1.5.3. Metocarbamol.....	55



1.5.3.1. Generalidades y aplicaciones.....	55
1.5.3.2. Mecanismo de acción del metocarbamol	56
1.6. <i>Vicia faba</i>	57
1.6.1. Generalidades.....	57
1.6.2. Propiedades.....	57
1.6.2.1. Composición del haba.....	59
1.6.3. Toxicidad.....	59
1.6.3.1. Sustancias tóxicas de las habas.....	60
1.6.4. Lectinas.....	61
1.6.4.1. Lectinas como inmunotoxinas para el tratamiento de cánceres humanos y sugerencias de mecanismo de acción del afecto antitumoral.....	67
2. <u>Justificación</u>	69
3. <u>Hipótesis</u>	71
4. <u>Objetivos</u>	71
4.1. <u>Objetivos particulares</u>	71
5. <u>Materiales y metodología</u>	72
6. <u>Resultados</u>	76
7. <u>Discusión</u>	111
8. <u>Conclusiones</u>	120
9. <u>Bibliografía</u>	121
10 <u>Apéndice</u>	126

**Índice de abreviaturas.**

AOM Azometano

APC Adenomatous Polyposis Coli o Poliposis adematosa del colon

CCHNP Cáncer colorectal hereditario no polipoideo.

CCR Cancer colorrectal.

DCC Deleted in Colo-rectal Cancer o delecionado en el cáncer colorrectal

DMH Dimetilhidrazina.

DNA Ácido desoxirribonucleíco

FCA Focos de Criptas Aberrantes.

GST Genes supresores de tumores

ICE Enzima convertidora de interleucina

IP Intraperitoneal.

MAM Metiazoximetanol

MRG *Mismatch repair genes*

MSI Inestabilidad de los microsatélites

Muc. Túnica mucosa.

Musc. Túnica muscular.

PAF Poliposis adenomatosa familiar.

PO Protooncogenes

RER Errores de replicación.

RNA Ácido Ribonucleico

SM. Túnica submucosa.

TSP-1 gen de la tromboespondina-1.

V. Vellosidades.

V.f. *Vicia faba*

**Índice de figuras.**

Figura 1. Anatomía del intestino grueso.....	11
Figura 2. Histología del intestino grueso.....	15
Figura 3. Modelo desde el punto de vista genético y citológico de la tumorogénesis colorrectal.....	29
Figura 4. Cáncer de colon en estadio 0.	31
Figura 5. Cáncer de colon en estadio I.....	32
Figura 6. Cáncer de colon en estadio II.....	33
Figura 7. Cáncer del colon en estadio IIIA.	34
Figura 8. Cáncer del colon en estadio IIIB.....	35
Figura 9. Cáncer de colon en estadio IIIC.....	36
Figura 10. Cáncer de colon en estadio IV.....	37
Figura 11. Cambios genéticos relacionados con la carcinogénesis colorrectal.....	47
Figura 12. Mecanismo de reacción entre la 2,4-DNFH.....	54
Figura 13. Síntesis de la 2,4-dinitrofenilhidracina.....	54
Figura 14. Mecanismo del metocarbamol.....	56
Figura 15. Planta de <i>Vicia faba</i>	57
Figura. 16. Metodología.....	73
Figura 17: Resultados gráficos del grado de tinción.....	107
Figura 18: Gráfica que representa el grado de ruptura.....	107
Figura 19. Representación del grado de congestión.....	109
Figura 20. Representación del grado de edema.....	109
Figura 21. Representación del grado de infiltración.....	110



Índice de tablas.

Tabla 1. Cáncer colorrectal: Genes Implicados.....30

Tabla 2. Composición de la V. f. por cada 100gr.....59

Tabla 3. Mecanismo de acción de productos vegetales en
diferentes líneas celulares malignas *in vitro* e *in vivo*.....64

Tabla 4 Resultados de análisis macroscópico106

Tabla 5 Resultados de histología.....108



Resumen.

De acuerdo con el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM), durante el periodo de 1998 a 2005 se reportaron 18,204 casos nuevos de cáncer colorrectal (CCR) en México, representando el 3.8% de los nuevos casos de cáncer con un incremento del 36% durante este período. Es el segundo tipo de cáncer más prevalente. Razón por la cual este padecimiento ha sido catalogado por las autoridades de salud como el segundo tipo de cáncer más agresivo en el país.

El proceso de carcinogénesis colorrectal es largo, muchas veces tarda años en alcanzar el estadio avanzado, invasivo. Es un proceso de múltiples etapas en el desarrollo de neoplasias malignas en el que se han identificado tres estadios a saber: Iniciación, promoción y progresión.

En la formación y desarrollo de lesiones pre y neoplásicas en el colon y recto, existen factores etiológicos que se explican como resultados de procesos de biotransformación, activación o eliminación de compuestos químicos que se han ingerido por diferentes vías al organismo. La comprensión de los mecanismos de origen de estas lesiones preneoplásicas o precancerosas en el colon es fundamental para entender la carcinogénesis colorrectal y sus eventuales formas de prevención.

Los modelos experimentales animales son una herramienta esencial en pruebas preclínicas que ensayan nuevas terapias *in vivo*. Las ventajas que se argumentan a favorecer del uso de este modelo de inducción química de carcinogénesis, se pueden mencionar: potencia, reproductibilidad, simpleza y similitudes con el CCR humano como por ejemplo la ubicación de tumores que en ratón y humanos se concentra en la parte distal del colon. Muy frecuentemente los tumores se desarrollan a partir de pólipos y continuamente exhiben rasgos histopatológicos muy semejantes a los que se observan en el CCR.

La evidencia sugiere que algunos constituyentes de los alimentos se han asociado en una disminución en el riesgo de cáncer de colon, y es quizá más fuerte en lo relativo al consumo de vegetales. De entre los cuales la *Vicia faba* (V.f.) que pertenece a la familia de las leguminosas, conocida comúnmente como **haba**, se ha considerado de alto valor nutritivo, pudiéndose caracterizar por un alto contenido de proteínas, entre otros, los estudios han demostrado que algunos mitógenos como las lectinas, pueden actuar sobre el sistema inmunológico modulando su respuesta, y el descubrimiento de sus actividades antitumorales han llamado la atención;



por lo cual la utilizamos para estudiar sus propiedades anticancerosas en el daño inducido a los ratones en el medio diseñado para crear lesiones preneoplásicas, debido a que de ser así se podría proponer como tratamiento para mejora o prevención del CCR.

En el presente trabajo se realizó la estandarización previa para las dosis de metocarbamol como de 2,4-Dinitrofenilhidrazina para lograr evidenciar las lesiones preneoplásicas por un periodo de 4 días inducción y 3 días de descanso por 15 días; después de lo cual se probaron diversas dosis del extracto protéico de V.f. las cuales son las siguientes 6.67mg/Kg, 13.33mg/Kg, 20mg/Kg, 26.67mg/Kg, 33.33mg/Kg, administradas por vía intraperitoneal en dos aplicaciones con diferencia de una semana entre cada una de ellas; con el fin de lograr la remisión de las lesiones pre y neoplásicas causadas por los xenobióticos (2,4-Dinitrofenilhidrazina y el metocarbamol), y compararlas para determinar cual es la más eficaz para dicho fin. Encontrándose que la dosis con la que se obtuvo mayor recuperación de los daños fue la 33.33mg/Kg.

Aunque los resultados que obtuvimos fueron satisfactorios se deben realizar muchos más estudios para la mejor utilización y conocimiento de productos de origen natural para su uso terapéutico y la creación de alternativas menos agresivas y costosas en el tratamiento de pacientes con cáncer.



1 Marco teórico.

1.1 Introducción.

El CCR se cuenta entre los tumores malignos de mortalidad más alta, ya que ocupa el segundo lugar en varones, después del cáncer pulmonar, y el tercero en mujeres después del cérvico uterino, luego de los cánceres pulmonar y mamario. La herencia desempeña una función muy importante, puesto que la predisposición hereditaria contribuye con más de la mitad de los casos de CCR. El consumo de etanol y las dietas ricas en grasas y proteínas de origen animal se relacionan con riesgo incrementado de este trastorno, mientras que la fibra de los alimentos, retinoides, calcio y selenio tienen efectos protectores contra él. Los signos y síntomas del cáncer colorrectal abarcan diarrea, estreñimiento, cólicos, dolor abdominal y hemorragia rectal visible y oculta. Las pruebas de detección de este padecimiento incluyen análisis en busca de sangre en las heces, palpación rectal digital, sigmoidoscopia, colonoscopia y enema de bario. El tumor puede extirparse mediante endoscopia o intervención quirúrgica abierta (Grau y Pique 1990).

Se ha enfocado la atención en las fibras de la dieta en la disminución del CCR. Como resultado de una dieta alta en grasa y proteínas y baja en carbohidratos, las heces de los norteamericanos tienen solo la mitad de volumen de fibra de los habitantes del lejano oriente o África y se eliminan del tubo intestinal mucho más lentamente. La incidencia del CCR es mucho más alta entre los norteamericanos, lo que sugiere la retención de una masa fecal cargada de grasa en el intestino inferior puede contribuir al desarrollo del cáncer (Curtis y Barnes, 1989). Se ha intentado identificar factores ambientales y las evidencias no son absolutamente concluyentes, entre ellos se deben mencionar con efecto protector a: dieta rica en fibras, anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), vitaminas (A, D, E), calcio y ejercicio físico (Grau y Pique 1990).



1.2 Principales características del intestino grueso humano.

1.2.1 Anatomía:

Tiene 1.5m de longitud y 6.5cm de diámetro, se extiende entre el íleon y el ano, que se une a la pared abdominal posterior por el mesocolon, que es una capa doble de peritoneo. Desde el punto de vista estructural sus cuatro porciones principales son ciego, colon, recto y conducto anal.

La comunicación del íleon con el intestino grueso esta protegida por un pliegue de mucosa, el esfínter ileocecal, que permite el paso de materiales del intestino delgado al grueso. En plano inferior a dicha válvula, cuelga el ciego, saco de unos 6cm de longitud que esta cerrado en su extremo distal. El apéndice tubo contorneado de unos 8cm esta unido al ciego. El mesenterio del apéndice, llamado mesoapéndice, lo fija en la pared inferior del mesenterio ileal (Tortora y Reynolds, 2002).

El extremo abierto del ciego guarda continuidad con un largo conducto, el colon, que se divide en porciones ascendente, transversa, descendente, y sigmoide.

- Colon ascendente: va del ciego a la cara inferior del hígado pegado a la pared posterior del abdomen, esta sujeto por el peritoneo que muchas veces pasa simplemente por delante de el, algunas veces fija su ángulo por medio de un pliegue seroso que va de este ángulo a la cara interior del hígado y ligamento hepático. Exteriormente presenta tres prominencias en forma de cintas y entre ellos una serie de cavidades no ampollares.
- Colon transverso: este trayecto se eleva de derecha a izquierda y forma una curva de concavidades posterior. Esta sujeto a la pared posterior, por medio del mesacolon transverso. Esta en relación: por arriba con el hígado, con el estómago y con el bazo; por debajo con circunvolución del intestino delgado, por delante con la pared



abdominal, por detrás con el riñón derecho, el duodeno, páncreas y el riñón izquierdo.

- Colon descendente: el límite inferior de este último corresponde a un plano horizontal que pasa por la cresta iliaca. El peritoneo se comporta con el aproximadamente de igual modo que el colon ascendente. Esta porción difiere del colon ascendente en que es más largo, más voluminoso y se encuentra más profundamente situado en el abdomen.
- Colon sigmoide: se inicia cerca de la cresta ileaca izquierda, se proyecta hacia la línea media y termina en el recto, poco más o menos a la altura de la vertebra C3.
- El recto: que conforma los últimos 20 cm. del tubo digestivo, esta por delante del sacro y cóccix. Sus dos a tres centímetros terminales se denominan conducto anal. El ano de 15 a 20mm de altura en que termina inferiormente el tubo digestivo. Se compone esencialmente de un aparato muscular tapizado por dentro por un revestimiento cutáneo especial (Tortora y Reynolds, 2002).

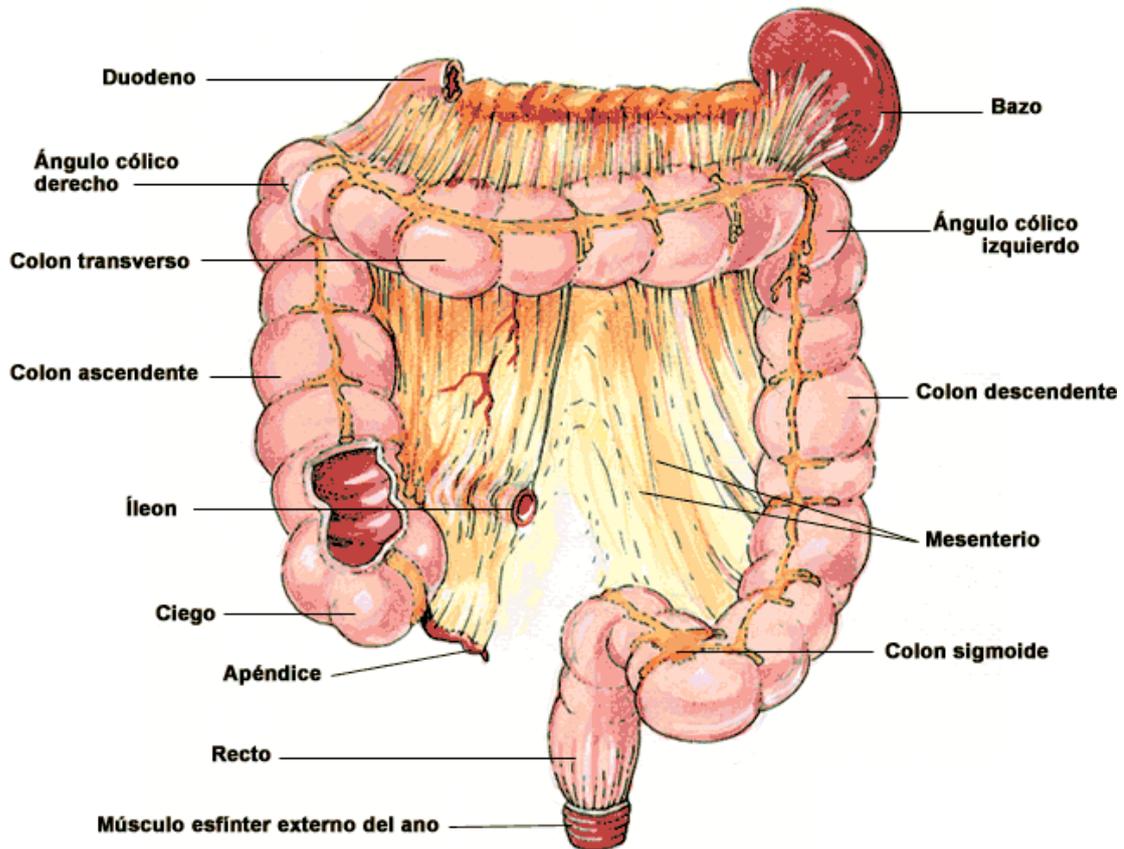


Figura 1. Anatomía del intestino grueso (Molist, et. al 2011).

1.2.2 Fisiología:

El intestino grueso está bien adaptado para ejercer sus funciones: absorción de agua, formación de masa fecal y producción de moco. La absorción de agua es pasiva, siguiendo el transporte activo de sodio por la superficie basal de las células epiteliales (Anatomía y fisiología del aparato digestivo, 2011).

- Digestión mecánica en el intestino grueso:

El paso del quimo del íleon al ciego está regulado por el esfínter ileocecal. Después de las comidas, el reflejo gastroileal intensifica el peristaltismo del íleon y fuerza el paso del quimo al ciego; cuando este está distendido, se intensifica la contracción del esfínter. Una vez que cruza el esfínter ileocecal, llega al ciego y se acumula en el colon ascendente.



Un movimiento característico es la propulsión haustral, en que las haustras permanecen relajadas y se distienden al llenarse. Cuando están distendidas las paredes se contraen y desplazan el contenido a la haustra siguiente. El peristaltismo masivo, potente onda peristáltica que comienza en la porción media del colon transverso y desplaza rápidamente el contenido del colon al recto. La presencia de alimento en el estomago inicia este reflejo gástrico en el colon, de modo que hay peristaltismo masivo por lo regular tres o cuatro veces al día, durante las comidas o inmediatamente después de ellas (Tortora y Reynolds, 2002).

- Digestión química en el intestino grueso:

La etapa final de la digestión ocurre en el colon por la actividad de las bacterias presentes en su luz. Las glándulas del intestino grueso secretan moco, no así enzimas. El quimo se prepara para la defecación mediante la acción de bacterias, que fermentan los hidratos de carbono residuales y liberan hidrogeno, dióxido de carbono y metano. Además, las bacterias convierten las proteínas residuales en aminoácidos, los cuales desdoblan en sustancias mas sencillas: indol, escatol, sulfuro de hidrogeno y ácidos grasos. Por añadidura, las bacterias descomponen la bilirrubina en pigmentos más sencillos, como estercobilina que confiere su color pardo característico a las heces. Se requieren diversas vitaminas para el metabolismo normal, entre ellas algunas del complejo B y K, las cuales son productos bacterianos que se absorben en el colon (Tortora y Reynolds, 2002).

- Absorción y formación de heces en el intestino grueso:

Cuando el quimo ha permanecido en el intestino grueso 3 a 10 h, adquiere consistencia solida o semisólida como resultado de la absorción de agua y su nombre cambia a heces, las cuales químicamente están compuestas de agua, sales inorgánicas, células epiteliales esfaceladas de la mucosa gastrointestinal, bacterias, productos de la descomposición bacteriana, materiales digeridos y no absorbidos y partes no digeribles de



los alimentos. De los 0.5 a 1 L que entran al intestino grueso, solo 0.11 a 0.2L no se absorbe por osmosis. Además, el intestino grueso absorbe electrolitos, incluidos el sodio y cloruro, y algunas vitaminas (Tortora y Reynolds, 2002).

1.2.3 Histología:

El intestino grueso consiste en una membrana mucosa con pliegues, salvo en su porción distal (recto). Las vellosidades también están ausentes en esta porción del intestino. Las glándulas intestinales son largas y se caracterizan por una abundancia de células enteroendocrinas. Las células absorbentes son columnares y poseen *microvilli* cortos e irregulares.

Al igual que el ciego, el colon comprende cuatro tunicas:

- Túnica Mucosa: consta de tres componentes; un revestimiento epitelial, la lamina propia de sostén y una fina capa de musculo liso, la *muscularís mucosae*, que permite los movimientos locales y los plegamientos de la mucosa. La capa muscular esta formada por las capas circular y longitudinal. No obstante esta capa es distinta de la observada en el intestino delgado, porque las fibras de la capa longitudinal externa se unen para formar tres bandas longitudinales gruesas denominadas tenias del colon. En la región anal la membrana mucosa forma una serie de pliegues longitudinales, las columnas rectales de Morgagni (Junqueira, 1998).
- Túnica Submucosa: es una capa de tejido conjuntivo laxo sostiene a la mucosa y contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios de mayor calibre.
- Túnica Muscular propia: Consiste en un musculo liso, que suele disponerse en una capa circular interna y una longitudinal. La acción de ambas capas, dispuesta en ángulos rectos, constituye la base de la contracción peristáltica. Unos 2 cm por encima de la abertura anal la mucosa intestinal está sustituida por epitelio pavimentoso



estratificado. En esta región la lámina propia contiene un plexo de venas grandes que, cuando se hallan excesivamente dilatadas y varicosas producen hemorroides (Young, Healt, 2005).

- Túnica Serosa: esta capa externa de tejido de sostén laxo conduce a los vasos y nervios principales. En las porciones en que el intestino ocupa la cavidad abdominal, esta se denomina Serosa, y esta revestida por un epitelio escamoso simple (mesotelio), En la demás regiones, la capa adventicia se confunde con tejidos retroperitoneales. En las porciones libres del colon la capa serosa se caracteriza por pequeñas protuberancias pedúnculos formadas por tejido adiposo, los apéndices epiploicos (Junqueira, 1998).

Vasos y Nervios: las arterias cólicas proceden de la mesentérica superior y la mesentérica inferior, el colon iliopélvico recibe tres arterias sigmoideas: izquierda media y derecha. Las venas terminan por un trayecto inverso al de las arterias en las dos mesentéricas. Los linfáticos van a los ganglios del borde adherente del intestino. Los nervios vienen del plexo solar y acompañan a las arterias.

La histología del recto es similar a la del colon, salvo que presenta criptas de Lieberkuhn más profundas pero que se presentan en menor cantidad.

Las columnas de Morgagni son pliegues longitudinales de la mucosa, que se unen entre sí para formar las válvulas anales, que ayudan al ano a dar sostén a la columna de excremento (Tortora y Reynolds, 2002).

El epitelio presenta una transición, desde un epitelio prismático a un epitelio pluriestratificado no cornificado. Luego el epitelio se queratiniza. La lámina propia alberga glándulas anales a nivel de la unión recto-anal y glándulas circumanales a nivel del extremo distal del conducto anal. La capa muscular de la mucosa tiene una constitución prototípica.

La submucosa alberga el plexo venoso hemorroidario interno y externo.



El esfínter anal interno corresponde a un engrosamiento de la capa circular interna de la capa muscular, por lo que está conformada por músculo liso. El esfínter anal externo está formado por músculos del suelo de la pelvis, y corresponde a músculo esquelético voluntario. (Tortora y Reynolds, 2002).

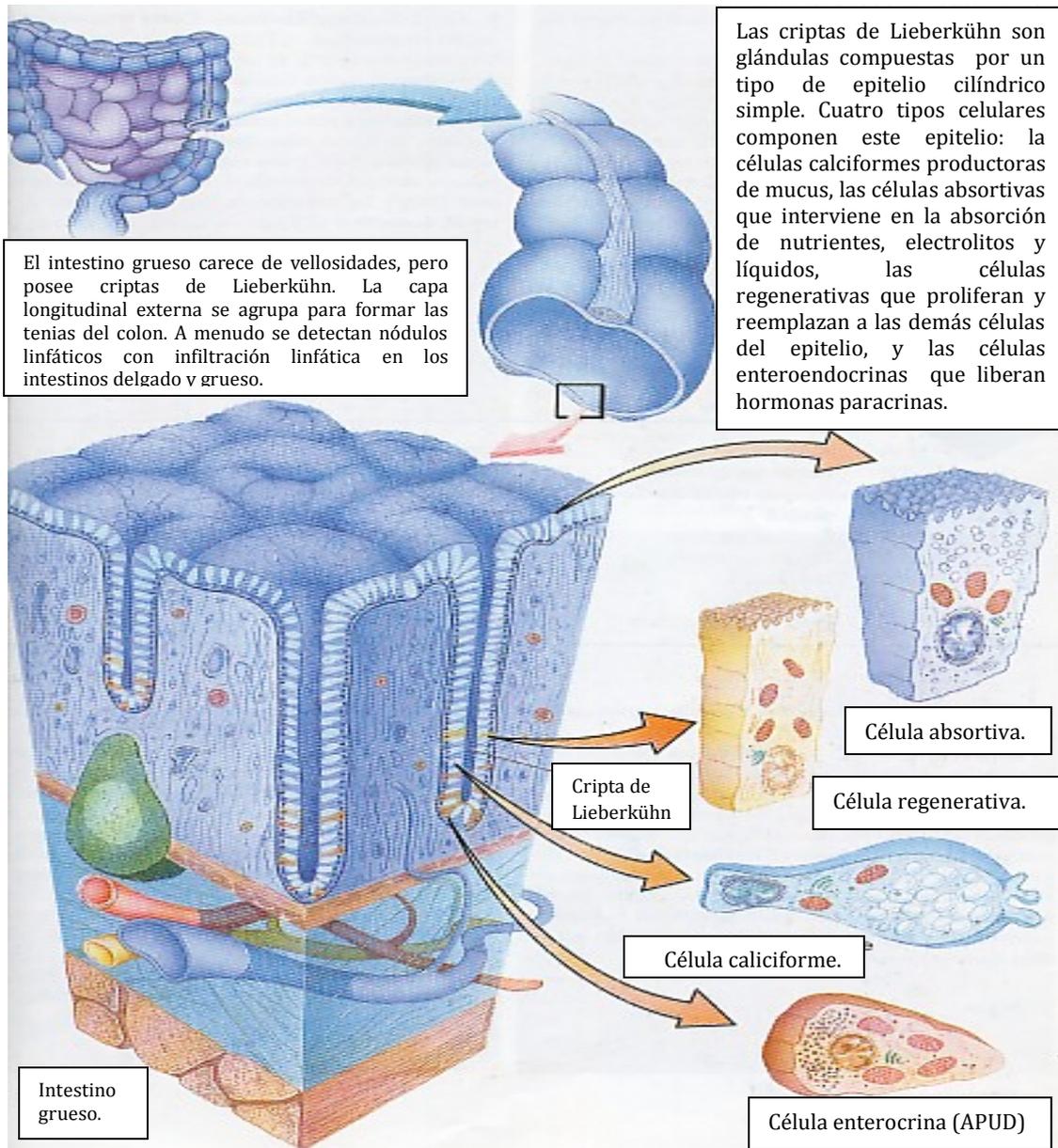


Figura 2. Histología del intestino grueso (Gartner y Hiatt, 2000).



1.3 Cáncer de colon.

1.3.1 Generalidades:

La edad promedio de diagnóstico del cáncer colorrectal es a los 67 años; es mucho menos frecuente en personas menores de 40 años y representa sólo 6% a 8% de los tumores diagnosticados en este grupo etario. De los tumores ubicados en el colon, 44% y 28% se ubicán en colon descendente 22% y 24% en colon derecho, el 22% y 5% en colon transverso y 11% y 42% en sigmoides en las dos poblaciones, muy similar a lo informado por la literatura mundial (Jensen, 2001).

Al menos, 95% de las veces la lesión precursora del CCR es un pólipo, especialmente, los adenomatosos; por lo tanto, más de 95% de los cánceres colorrectales son adenocarcinomas. Esto deja a los otros tipos histológicos de tumores, tales como los carcinoides, los linfomas, los sarcomas y los escamosos, con el 5% restante (Márquez, 2002).

Actualmente, de los cánceres que se detectan, 35% a 40% son localizados, un porcentaje igual muestra compromiso regional y el resto, 20% a 25%, tienen metástasis distantes. La supervivencia estimada a 5 años es mayor de 90% en personas en estadio I, 80% para el estadio II, 65% para la diseminación ganglionar regional, o estadio III, y sólo 8% para el estadio IV (metástasis distantes) (Márquez, 2002).

1.3.1.1 Factores de riesgo

- Edad: Se estima que, a partir de los 50 años, una persona tiene un riesgo de 5% (6,14% para los hombres y 5,92% para las mujeres) de que se le diagnostique un CCR y de 2,5% de morir por esta enfermedad. El cáncer de colon puede presentarse en personas menores y en raras ocasiones, en los adolescentes (Jensen, 2001).



- Dieta: Las dietas bajas en grasa y carnes rojas, y altas en frutas, fibra y vegetales, se han asociado con bajo riesgo de cáncer colorrectal, pero no hay evidencia de que un cambio en la dieta afecte subsecuentemente la tasa de nuevos casos. Los altos niveles de actividad física se relacionan con bajas tasas de cáncer colorrectal pero, nuevamente, no está claro si su relación es casual o si se confunde con otros factores.
- Pólipos: Algunos tipos de pólipos, tales como los adenomas, aumentan el riesgo de una persona de desarrollar CCR. Este incremento de los pólipos se da de una manera exponencial a mayor edad, ya que la incidencia a los 50 años es de 45 por 100.000 personas y se incrementa hasta 475 por 100.000 personas a los 80 años (Jensen, 2001).
- Historia médica personal: un diagnóstico previo de cáncer del endometrio o cáncer de ovario también eleva el riesgo, particularmente para cánceres que ocurren por debajo de los 50 años; una historia de cáncer de seno aumenta el riesgo sólo ligeramente.
- Historia médica familiar: los parientes de primer grado (padres, hermanos, hijos) de una persona que ha padecido de CCR tienen mayor riesgo de desarrollar este tipo de cáncer. Aproximadamente, 20% de estos tumores ocurren en pacientes con historia familiar de CCR en un pariente de primer grado de consanguinidad. El riesgo crece conforme aumenta el número de miembros de familia con diagnóstico de CCR antes de los 60 años (Jensen, 2001).
- Enfermedad intestinal inflamatoria: las personas que padecen varios años de colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn o



alteraciones inflamatorias crónicas del colon, tienen mayor riesgo de sufrir de CCR.

La alta incidencia de CCR, la secuencia aceptada Adenoma-carcinoma y el hecho reconocido de que cuando mayor es la operabilidad y menor estadio clínico-patológico tanto mas alta es la supervivencia, explica la necesidad de efectuar no solo una prevención , sino también un pronostico precoz mediante el seguimiento de los posibles grupos de riesgo (Jensen, 2001).

Existen evidencias de alteraciones a nivel genético que involucran distintos oncogenes, los que responderían a cambios en la secuencia que evoluciona de adenoma a carcinoma. APC, K-ras, DCC (deleciones en el cromosoma 18q) y p-53. Además, participan en el proceso otros genes que se relacionan con la inestabilidad microsatélite (MSH2, MLH1, PMS1, PMS2 y MSH6).

Algunas de estas alteraciones genéticas no sólo están relacionadas con la génesis del cáncer, sino que además influyen en la evolución, el pronóstico y la respuesta al tratamiento (Jensen, 2001).

1.3.1.2 Lesiones digestivas precancerosas.

- ❖ Esofagitis grado IV y esófago de Barrett: La primera es la inflamación del esófago que muy frecuentemente se produce porque el contenido gástrico refluye al estómago por problemas funcionales (por ejemplo, durante el sueño); el esófago de Barrett es una lesión más evolucionada (la mucosa del esófago ha cambiado).
- ❖ Gastritis difusa con anemia perniciosa: El mecanismo de producción no se conoce exactamente. Produce síntomas agrupados con el término médico de dispepsia (los típicos síntomas de estómago). Las gastritis sólo se pueden confirmar y catalogar con biopsia y por lo tanto es necesaria una endoscopia. La prevención no es actualmente



- posible, y tiene componente genético (herencia) (¿Cuáles son las lesiones digestivas precancerosas? 2001).
- ❖ **Enfermedad de Menetrier:** No se conoce cómo se produce. Se sospecha ante dolor de estómago, diarrea, náuseas, vómitos y pérdida de peso en un paciente de edad cercana a los 50 años; y presenta albúmina baja en sangre. Es un tipo de gastritis y, por tanto, sólo se confirma con la biopsia (mediante endoscopia).
 - ❖ **Poliposis familiar colónica:** Consiste en el desarrollo a lo largo de la vida de múltiples pólipos en el colon. Se hereda con mucha facilidad (herencia dominante, penetrancia 90%). Hay que hacer revisiones periódicas con colonoscopias a los familiares de un paciente. Se soluciona extirpando el colon para evitar la aparición del cáncer (¿Cuáles son las lesiones digestivas precancerosas? 2001). Hay otras poliposis hereditarias con riesgo de desarrollar CCR y son los síndromes de Gardner, Olfield y Turcot, estos se reconocen porque se asocian a tumores benignos en abdomen, pared abdominal, grasa de piel, hueso etc., el primero, y múltiples quistes sebáceos el segundo. El síndrome de Turcot que se asocia con tumores en el sistema nervioso central, sólo puede diagnosticarse pronto observando a familiares de pacientes ya diagnosticados aunque su herencia es menos frecuente al ser una enfermedad recesiva (precisa para su aparición haber heredado un gen portador de la madre y otro del padre).
 - ❖ **Enfermedad inflamatoria intestinal: Colitis ulcerosa**
La colitis ulcerosa es de origen desconocido; afecta al recto y colon. Puede aparecer en la juventud o en la vejez y tiene componente hereditario. Hay que sospecharla ante síntomas como hemorragia con las heces, diarrea (diurna y nocturna), y dolor abdominal, aunque en otros casos hay estreñimiento. Los síntomas pueden ir juntos o separados. Son posibles las alteraciones analíticas (de inflamación y/o



desnutrición) pero el diagnóstico solo puede hacerse con biopsias (acudir al gastroenterólogo) (¿Cuáles son las lesiones digestivas precancerosas? 2001).

1.3.2 Antecedentes históricos:

Los FCA fueron descritos por Bird en 1987 en la mucosa de colon de ratas C57BL/6J o CF1 tratadas con carcinógenos específicos y teñidas con azul de metileno. En 1991, Pretlow, Ronucci y colaboradores, describieron y parcialmente caracterizaron esta lesión, misma que encontraron con alta frecuencia en la mucosa de pacientes con cáncer de colon esporádico o hereditario (Barrón y Chanona, 2001).

En 1988 McLellan y Bird encuentran que FCA generalmente poseen aberturas ovales en vez de circulares como en caso de las criptas normales. (McLellan y Bird, 1991).

Existen varias teorías para la génesis de un CCR, pero la más aceptada al menos para el 95% de los casos es la secuencia adenoma carcinomas. Fue descrita inicialmente por Muto en 1975 desde el punto de vista histológico. 15 años más tarde, en 1990, Fearon y Vogelstein la propusieron como base en los hallazgos genéticos y morfológicos que se presentan gracias a los errores y mutaciones de reparaciones proteicas, en los que interviene protooncogenes y genes supresores tumorales (León y Saenz, 2007).

La primera clasificación por estadíos que se estableció fue propuesta por Cuthbert E. Dukes en 1932, sin embargo ya existían otras tentativas de clasificar estos tumores; en 1926 un cirujano inglés, Lockhart-Mumery publicó un artículo en el que estudió 200 casos de cáncer de recto, tratados con excusión perineal clasificado según la extensión de la enfermedad en:

Casos favorables: el tumor no invadía la túnica muscular y no había afectación ganglionar (Díaz, 1998).



Casos intermedios: el tumor invadía la túnica muscular, no había ganglios afectados de forma extensa.

Casos muy desfavorables: el tumor es grande y fijo, hay una extensa afectación ganglionar (Díaz, 1998).

El propio Dukes, patólogo del hospital de San Marcos Londres, publicó en 1929 una modificación a la clasificación de Lockhart, antes de publicar en 1932 su artículo en el que clasificaba al CCR operables en tres estadios.

Estadio A: el tumor esta limitado a la pared del recto (Díaz, 1998).

Estadio B: Crecimiento del tumor hasta tejidos extrarectales pero sin afectación ganglionar.

Estadio C: Existe afectación ganglionar linfática (Díaz, 1998).

A lo largo de la evolución tanto en el pronóstico, como en el diagnóstico oportuno se han desarrollando nuevas clasificaciones del sistema TNM (Tamaño de tumor T, la existencia o no de ganglios regionales metastatizados N, y la presencia o ausencia de metástasis a distancia M).

No obstante hay que tomar en cuenta que existe un número importante de factores pronostico que quedan fuera de esta clasificación, invasión linfática y/o vascular, grado de diferenciación histológico, contenido de DNA, niveles de pre y postcirugía de marcadores tumorales, tipo histológico, oncogenes (H-ras, K-ras, p53), entre otros (Díaz, 1998).

1.3.3 Evolución y estadios del cáncer.

La iniciación toma lugar a nivel del DNA, molécula en la cual los mutágenos introducen mutaciones y con ello se altera la regulación de la expresión de algunos genes importantes para la célula. Como resultado de ello, las células se adentran en un cambio irreversible caracterizado por una capacidad intrínseca de crecimiento autónomo potenciado. En la fase de promoción las células son estimuladas a dividirse y se hacen morfológicamente anormales. Esta fase potencia el desarrollo de



neoplasmas clínica y patológicamente detectables (Zamorano, et. al. 2008). La progresión es la etapa mediante la cual la célula iniciada anormal experimenta nuevos cambios genéticos que terminan por conferirle fenotipo maligno lo que finalmente se traduce en el desarrollo de cáncer. Esta última etapa se ha subdividido en sub-etapas que caracterizan hitos en el desarrollo del cáncer tales como: angiogénesis o vascularización, desprendimiento, liberación, intravasación, supervivencia y extravasación (Zamorano, et. al. 2008). La gran mayoría de las neoplasias se inician por mutaciones o expresiones alteradas de algunos genes que cumplen funciones vitales en el control de procesos tales como: proliferación celular, apoptosis, reparación del DNA y envejecimiento celular. El desarrollo de una neoplasia en colon requiere al menos de cambios en tres tipos de genes celulares: protooncogenes (PO), genes supresores de tumores (GST) y genes de reparación de DNA (Zamorano, et. al. 2008). Se ha demostrado que durante el proceso de carcinogénesis de colon, intervienen factores genéticos (mutaciones) y epigenéticos; los PO son activados a oncogenes que promueven un crecimiento celular potenciado, ya que los productos codificados por protooncogenes ejercen efectos de control positivo sobre la proliferación celular y su mutación les confiere carácter dominante desde un punto de vista genético. A su vez, la inactivación de GST promueve igualmente un crecimiento potenciado debido a que los productos codificados por genes supresores de tumores ejercen una función reguladora negativa sobre los procesos de proliferación celular, lo que determina que su mutación en procesos tumorales les confiera un carácter recesivo (Zamorano, et. al. 2008). Los cambios genéticos que conducen al CCR se inician con la inactivación de Adenomatous Polyposis Coli o Poliposis Adenomatosa de Colon (APC) un GST que puede ser el responsable de la transformación del epitelio colónico desde un estado normal a uno hiperproliferativo. El producto de este gen mutado es una proteína de



300 kDa truncada. Tras inactivarse APC, se observa la activación mutacional del PO llamado K-ras, tras lo cual se evidencia la inactivación del GST denominado Deleted in Colo-rectal Cancer o delecionado en el cáncer colorrectal (DCC) ubicado en la región 18q22 y codifica una proteína de membrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Zamorano, et. al. 2008). El último evento de inactivación se detecta en p53, otro GST, el cual está aparentemente involucrado en el cambio del estado de adenoma al de carcinoma. Mutaciones en cualquiera de los genes de reparación inducen a errores en la duplicación originando lo que se conoce como inestabilidad de microsatélites. Debe señalarse que el orden de los procesos de inactivación o activación descritos, no es absoluto y la acumulación total de cambios es quizás más importante que su orden, en determinar el proceso carcinogénico. Después de todo, siendo el cáncer una enfermedad de muchas etapas, habrá algunas de éstas, en que la célula expresa características de célula normal y célula maligna (Zamorano, et. al. 2008).

Estudios epidemiológicos indican que el 50% de los cánceres que aparecen a partir de los 70 años tienen localización colorrectal. Al incremento de riesgo se ha incluido en ellas el excesivo consumo de grasa animal y carne, la falta de ingesta de alimentos vegetales ricos en fibra, especialmente crucíferas, el consumo de alcohol y el tabaquismo. En el CCR, las mutaciones y/o alteraciones génicas encontradas son múltiples y su aparición no puede relacionarse sólo con una causa.

En la actualidad aceptamos la existencia de tres vías distintas que conducen a la aparición de CCR. Dos de ellas tienen un componente familiar hereditario plenamente establecido. Son el síndrome de Lynch o CCR hereditario no polipoideo (CCHNP) y la poliposis adenomatosa familiar (PAF). La tercera no se ha podido relacionar con mecanismos de transmisión hereditaria y corresponde al CCR esporádico (Díaz, 1998).



1.3.3.1 Genes que participan en la inducción del CCR.

Uno de los sistemas más estudiados en este sentido es el gen represor p53 (recibe este nombre por localizarse entre las bandas p12 y p13 del brazo corto del cromosoma 17 y codificar un factor de transcripción-proteína-de 53 Kd) al que, debido a sus importantes acciones protectoras, se le ha otorgado el nombre de Guardián del Genoma.

El aumento de la expresión de p53 activa a otros genes con funciones dispares. Un sistema precozmente activado está constituido por un grupo que recibe el nombre de *mismatch repair genes* (MRG) conformado, al menos, por nueve genes: “hMSH1, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hMLH1, hMLH2, hMTH, hPSM1, hPSM2”. Éstos, al ser activados por p53 u otros mecanismos, inducen la expresión de una serie de proteínas cuya función es controlar la secuencia correcta de pares de bases en las cadenas de DNA. Evidentemente, cuando los MRG mutan, las proteínas expresadas carecen de la función correctora y se permite la formación de cadenas de DNA que no son las adecuadas. Dichas mutaciones pueden ser de diferente tipo, como desaparición del par de bases, inserción de pares de bases, sustitución de las mismas por otras, etc. De acuerdo con los criterios adoptados en la conferencia del *National Cancer Institute* en diciembre de 1997, la inestabilidad genómica asociada a defectos en la capacidad correctora de los MRG, recibe el nombre de “inestabilidad de los microsatélites” (MSI). Se clasificó el grado de inestabilidad en tres niveles: la MSI de alta frecuencia cuando se detectaban dos o más microsatélites inestables; MSI de baja frecuencia cuando sólo se detectaba alteración en un marcador y estabilidad de los microsatélites cuando no se detectaba ninguna modificación. Los sujetos en los que se detectan alguna de las alteraciones se clasifican dentro de un fenotipo con errores de la replicación en el DNA y a dicho fenotipo se le denomina RER+ (con errores en la replicación, *Replication Error*) (Carreto, et. al. 2001).



En condiciones normales, la hiperexpresión de p53 y activación de los MRG es un mecanismo suficiente para corregir las alteraciones detectadas. Para permitir tal corrección otro de los mecanismos activados por el aumento de la expresión de p53 consiste en actuar sobre el ciclo celular frenando el paso de la fase G1 a G2 y dejando llevar a cabo la acción de los MRG. En el caso de que no se pueda concluir la reparación cromosómica, la concentración de p53 continúa alta, la división celular permanece frenada y se impide la multiplicación de la célula mutada. El mecanismo por el que p53 lleva a cabo este efecto se relaciona con la activación otros dos genes: GADD45 y p21/WAF1 (Carreto, et. al. 2001). El primero de ellos es responsable de la inhibición de la enzima DNA polimerasa, por tanto de la síntesis de las cadenas complementarias de DNA y en consecuencia, también inhibe la replicación celular. El segundo, al bloquear la acción del complejo cdc2/ciclina E, inhibe, igualmente, la replicación celular. El daño celular inducido es excesivo o el sistema reparador no puede complementar su función por cualquier causa, la expresión de la proteína p53 por su gen aumenta y se llegan a alcanzar niveles superiores de ésta. En tal caso, la proteína p53 adquiere concentraciones suficientes para activar la interleucina, la expresión de otros genes y factores de transcripción cuya función es mediar la apoptosis celular. Entre los factores de transcripción inducidos figuran NFk β que es un importante regulador de la apoptosis y la enzima convertidora de interleucina (ICE) cuya función es degradar las proteínas citoesqueléticas. Entre los genes activados figuran Fas y Bax dando lugar al aumento de las concentraciones de sus proteínas expresadas. Al mismo tiempo, p53 inhibe la expresión de otro gen que sería bcl-2. Las proteínas expresadas por los dos primeros tienen como función poner en marcha los mecanismos de apoptosis y por tanto, favorecen la muerte de la célula cuyo error no ha podido ser corregido. La proteína expresada por bcl-2 tiene efectos opuestos, inhibe el proceso de apoptosis. No obstante,



cuando se altera como consecuencia de mutaciones en los MRG o del mismo p53, la aparición de mutaciones, su perpetuación, y en consecuencia la inducción de CCR, se ve facilitada (Carreto, et. al. 2001), (Díaz, 1998).

No es frecuente la mutación y/o hiperexpresión de p53 cuando el sistema de genes mismatch está mutado. En efecto, en los casos de CCHNP se observa frecuentemente mutaciones en los genes mismatch, sin que ello se acompañe de mutación o hiperexpresión de p53. Evidentemente, estamos obligados a pensar que otros sistemas, diferentes a p53, controlan también la actividad de los genes mismatch y que dicha alteración sería predominante en los casos de CCHNP. Del mismo modo, la mutación de p53, al no permitir la activación del sistema de reparación debería cursar, al menos, con inestabilidad de los microsatélites, aunque no sería obligada la presencia de mutaciones en los genes mismatch. Entre estos últimos podemos citar, a modo de ejemplo a APC, DCC, c-myc, Rb, TGFBR II, etc. En consecuencia, cabría suponer que su mutación o hiperexpresión puede ser también trascendente en la inducción de CCR (Carreto, et. al. 2001).

Por una parte, la mutación de los MRG da lugar a la expresión de proteínas anómalas que no pueden llevar a cabo su acción reparadora. La metilación de las cadenas genómicas de los MRG le restan su capacidad de expresar las proteínas correspondientes y se facilita la aparición de MSI, sin que ello presuponga la existencia de mutaciones en su secuencia. De acuerdo con ello, se ha publicado que la metilación de la región CpG de hMLH1 está aumentada en el CCR esporádico apareciendo en el 100% de los casos de MSI+ de alta frecuencia, es más rara en las formas estables o cuando dicho gen está mutado. La consecuencia de dicha hipermetilación es su inactivación y, por tanto, la aparición de mutaciones en otros genes. Inversamente, una de las consecuencias de la MSI es la hipermetilación de las cadenas de DNA. Así, la hipermetilación se observa con mayor frecuencia en los CCR con MSI (60%) que en los que no se detecta MSI (22%). Uno de



los genes cuya hipermetilación parece trascendente en el CCR es TSP-1 (gen de la tromboespondina-1). Como cabría esperar, su hipermetilación, y consecuente pérdida de función, la favorece y se permite el crecimiento celular. Otros genes que se ven afectados por causa de la hipermetilación o disfunción de los MRG y que frecuentemente se encuentran mutados en el CCR son TGFbR II, Bax, Myf-3, IGF1R, MBD4 (MED1), BLM, CBL, HOXA-1, TCF-4, HIC-1 (Carreto, et. al. 2001), (Díaz, 1998).

Sin embargo, dicha inestabilidad es también posible en ausencia de mutaciones de tales genes y coincide, normalmente, con un peor pronóstico y menor supervivencia. La primera es indicio de que existen otros sistemas de reparación distintos a los MRG y que son los responsables de la inestabilidad de los MSI en estos casos. La segunda, obliga a pensar en que la inestabilidad de los MSI inducida es consecuencia de mutaciones más groseras que el sistema de reparación genómica ha sido incapaz de corregir (Carreto, et. al. 2001).

Las alteraciones indicadas hasta el momento pueden verse controladas si abarcan a uno solo del par de cromosomas, dado que el segundo puede compensar las actividades perdidas por el primero. Por el contrario, en otros casos, debido a alteraciones importantes que afectan a ambos cromosomas, o a circunstancias de transmisión hereditaria, ambos cromosomas resultan alterados y desaparece cualquier intento compensador. Nos referimos, entonces, a situaciones de pérdida de la heterocigosidad y parece demostrada la relación entre esta pérdida y MSI de alta frecuencia. En general, la pérdida de heterocigosidad se relaciona con el aumento de la expresión de p53, mayor frecuencia e intensidad de las mutaciones y mayor incidencia de metástasis. Su manifestación en el cromosoma 4, en la región 4p4-16, se ha relacionado con peor pronóstico en el CCR, su existencia en el alelo 17q también se relaciona con mayor frecuencia de metástasis y nódulos linfáticos y su aparición en el gen ATM



es más frecuente en tumores del lado izquierdo que del derecho, pero sin que ello se correlacione con las características clínicopatológicas del tumor. Por el contrario, la pérdida de heterocigosidad en el gen DR5/TRAIL o en el cromosoma 11(11q22-23) no parece tener implicaciones en la tumorigénesis (Carreto, et. al. 2001).

En el 100% de los casos de CCR detectados como consecuencia de PAF se observan mutaciones en el gen APC, situado en el cromosoma 5q, mutación que también es frecuente en CCR esporádico y que da lugar a una proteína truncada en su región carboxilo que carece de efectos represores de la carcinogénesis. Al igual que p53, el gen APC está también implicado en los sistemas de control de la apoptosis y de la replicación celular, y cuando muta se detecta aumento de la actividad ornitín descarboxilasa, que sería indicativa de un aumento de la replicación celular. A diferencia de p53, la mutación de APC se sigue de la aparición de un gran número de pólipos en el colon que llega a superar frecuentemente el millar, siendo, además, que el 10% de los pólipos adenomatosos suele evolucionar a CCR. APC interviene en el control del sistema beta-catenina/caderina, regulando negativamente su expresión y oponiéndose al progreso de la secuencia adenoma carcinoma. Este efecto parece llevarse a cabo no por actuar sobre su gen codificador (WNT1) sino por aumentar su degradación catalítica al unirse a beta-catenina por el extremo (Carreto, et. al. 2001).

C-terminal de la proteína APC. Del mismo modo, la mutación de APC induce el aumento de la metaloproteasa 7 con lo que facilita los mecanismos de invasión y metástasis de las células mutadas. Beta-catenina que interviene en los procesos de adhesión celular y, por tanto, participa en los mecanismos de diseminación y metástasis de las células tumorales. En el proceso de tumorigénesis la mutación de APC suele ir seguida de inactivación de p53. En efecto, en condiciones normales, el aumento de beta-catenina se sigue de incrementos en la expresión de la proteína p53, al



parecer por inhibición de su degradación proteolítica, que actuaría como mecanismo compensador y preventivo de la formación de tumores. De hecho, en los CCR, pero no en los adenomas, encontramos aumentada la expresión nuclear de beta-catenina. Por el contrario, en los CCR y con menor frecuencia en los adenomas, la expresión citoplasmática de beta-catenina se encuentra a aumentada. Estos resultados parecen indicar que el aumento de la expresión de beta-catenina es un evento precoz en la génesis tumoral y que su posterior aumento en el ámbito nuclear marca la conversión de adenoma a carcinoma (Carreto, et. al. 2001), (Díaz, 1998).

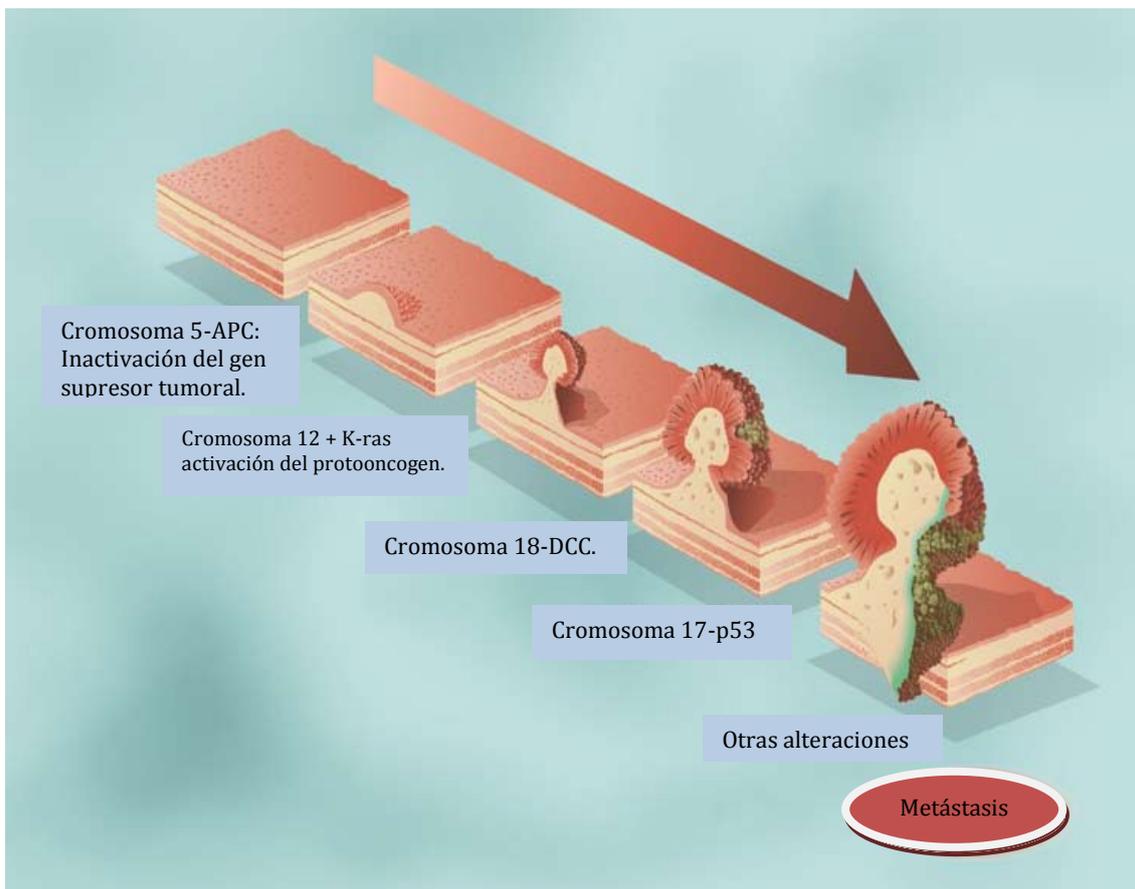


Figura 3. Modelo desde el punto de vista genético y citológico de la tumorogénesis colorrectal (Márquez, 2002).



Tabla 1. Cáncer colorrectal: Genes Implicados. (Calderillo, 2009)

Gen	Función.
Oncogenes.	
K-ras	Traducción de señales.
CTNNB1	Adhesión celular
SRC	Traducción de señales.
Neu/her ²	Receptor factor de crecimiento
MyC	Regulación del ciclo celular
Genes supresores de tumor	
APC	Adhesión celular.
p-53	Regulación del ciclo celular.
DCC	Adhesión celular.
MCC	Traducción de señales.
SMAD4	Traducción de señales.
SAMAD2	Traducción de señales.
TGF_RII	Traducción de señales.
Nm23H1	Inhibe metástasis.
Nm23H2	Inhibe metástasis.
Genes de reparación.	
hMSH-2	Reparación de DNA
hMSH-1	Reparación de DNA
hPMS-1	Reparación de DNA
hPMS-2	Reparación de DNA
hMSH6	Reparación de DNA



1.3.3.2 Estadios de CCR

Se identifican los siguientes estadios para el cáncer del colon:

Estadio 0 (carcinoma in situ)

Carcinoma in situ del colon/recto en estadio 0; en la figura 4 se muestra un corte transversal del colon y recto. También se ven la submucosa, las capas de músculo, la serosa, un vaso sanguíneo y ganglios linfáticos.

En el estadio 0 o carcinoma *in situ*, se encuentran células anormales en la mucosa de la pared del colon. Estas células anormales se pueden volver cancerosas y diseminarse (Instituto Nacional del Cáncer 2011).

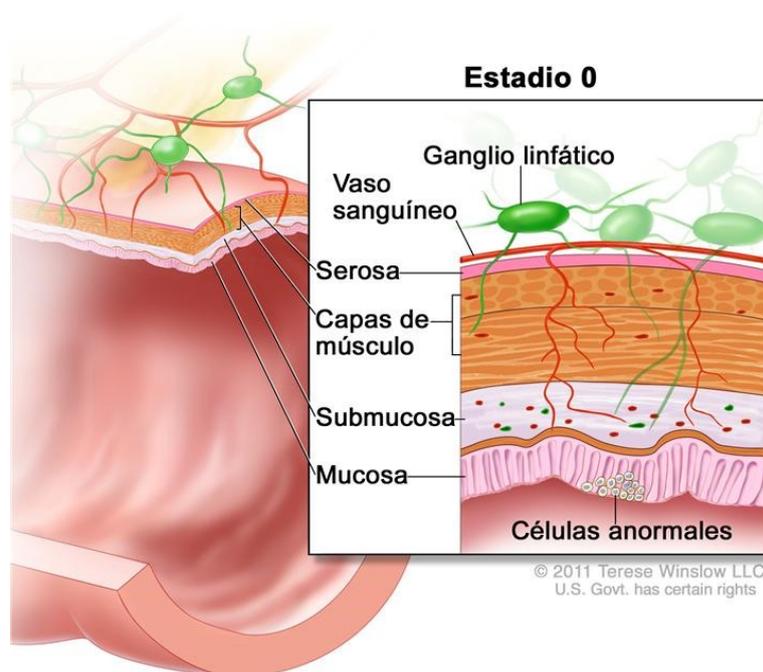


Figura 4. CCR en estadio 0. Se muestran células anormales en la mucosa de la pared del colon (Instituto Nacional del Cáncer 2011).



Estadio I

CCR en estadio I. En la figura 5 se ven las tunicas de la pared del colon y el recto con cáncer en las tunicas de mucosa y submucosa. También se ven las tunicas de músculo, la serosa, un vaso sanguíneo y ganglios linfáticos.

CCR en estadio I. El cáncer se formó en la mucosa de la pared del colon y se diseminó a la submucosa (Instituto Nacional del Cáncer 2011).

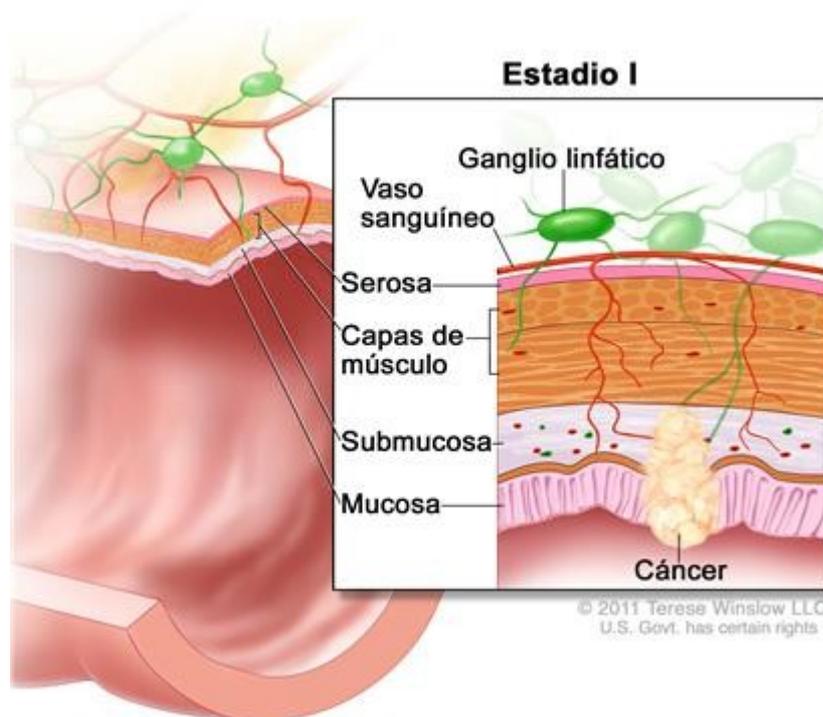


Figura 5. CCR en estadio I. El cáncer se formó en la mucosa de la pared del colon y se diseminó a la submucosa (Instituto Nacional del Cáncer 2011).

Estadio II

CCR en estadio II; la figura 6 muestra un recuadro de tres paneles. Cada panel muestra las tunicas de la pared del colon y el recto: mucosa, submucosa, tunicas de músculo y serosa. También se ven un vaso sanguíneo y ganglios linfáticos. El primer panel muestra el estadio IIA con cáncer en la



mucosa, la submucosa, las túnicas de músculo y la serosa. El segundo panel muestra el estadio IIB con cáncer en todas las túnicas y diseminándose a través de la serosa. El tercer panel muestra el estadio IIC con cáncer que se disemina hasta órganos cercanos.

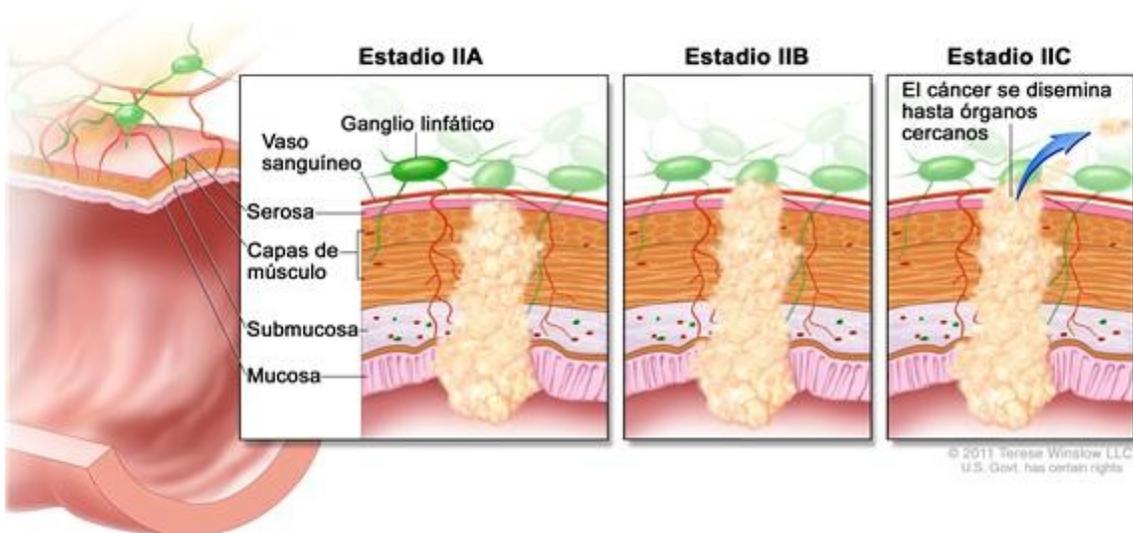


Figura 6. CCR en estadio II. Presenta imagen del estadio IIA, estadio IIB, estadio IIC (Instituto Nacional del Cáncer 2011).

Estadio III

El CCR en estadio III, se divide en estadio IIIA, estadio IIIB y estadio IIIC.

CCR en estadio IIIA; en la figura 7 muestra un recuadro con dos paneles. El primer panel muestra cáncer en la mucosa, la submucosa, túnica de músculo y dos ganglios linfáticos. El segundo panel muestra cáncer en la mucosa, la submucosa y cinco ganglios linfáticos.

CCR en estadio IIIA. El cáncer se puede haber diseminado a través de la mucosa de la pared del colon hasta la submucosa y la túnica de músculo, y se diseminó hasta 1 a 3 ganglios linfáticos o tejidos cerca de los ganglios linfáticos. El cáncer se diseminó a través de la mucosa hasta la submucosa y hasta 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos (Instituto Nacional del Cáncer 2011).



En el estadio IIIA:

El cáncer se diseminó a por lo menos uno, pero no más de tres ganglios linfáticos cercanos, o se formaron células cancerosas en los tejidos cercanos a los ganglios linfáticos, el cáncer se diseminó a través de la mucosa de la pared del colon hasta la submucosa. El cáncer se diseminó a cuatro, pero no a más de seis, ganglios linfáticos cercanos (Instituto Nacional del Cáncer 2011).

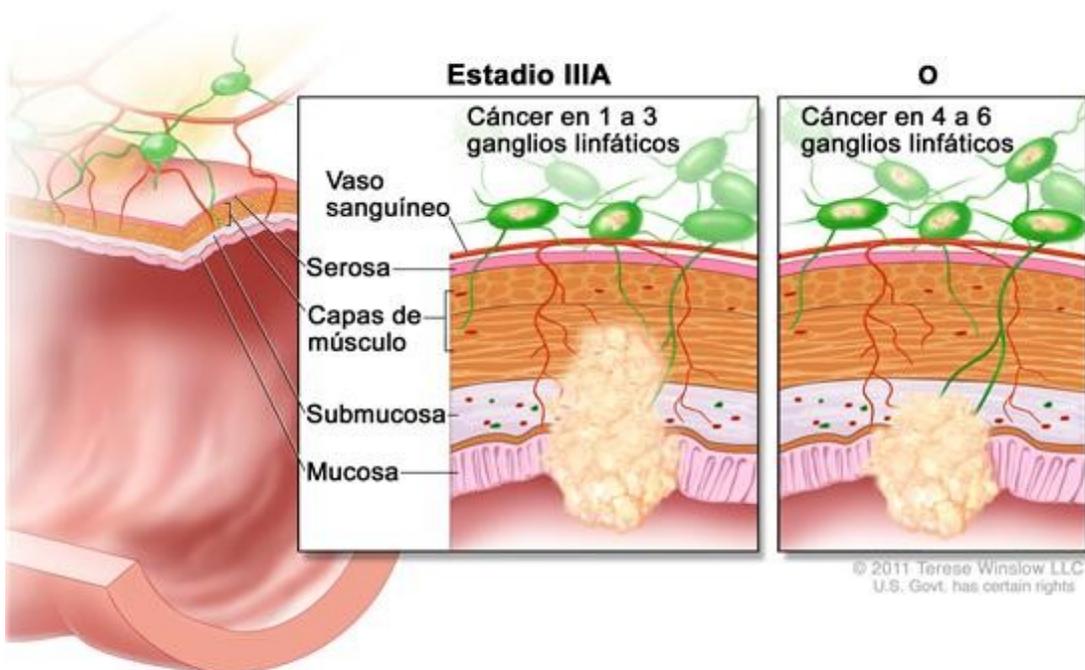


Figura 7. CCR en estadio IIIA. La imagen muestra su diseminación (Instituto Nacional del Cáncer 2011).

CCR en estadio IIIB; en la figura 8 muestra un recuadro de dos paneles. El primer panel muestra el cáncer en todas las tunicas, diseminándose a través de la serosa y en tres ganglios linfáticos. El segundo panel muestra el cáncer en todas las tunicas y en cinco ganglios linfáticos. El tercer panel muestra el cáncer en la mucosa, la submucosa, las tunicas de músculo y siete ganglios linfáticos.



CCR en estadio IIIB. El cáncer se diseminó a través de la túnica de músculo de la pared del colon hasta la serosa, o se diseminó hasta la serosa, pero no hasta órganos cercanos. El cáncer se diseminó hasta 1 o 3 ganglios linfáticos cercanos, o hasta los tejidos cercanos a los ganglios linfáticos. O bien, el cáncer se diseminó hasta la túnica de músculo o hasta la serosa, y hasta 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos. O quizá, el cáncer se diseminó a través de la mucosa hasta la submucosa y se puede haber diseminado hasta la túnica de músculo y hasta siete o más ganglios linfáticos cercanos (Instituto Nacional del Cáncer 2011).

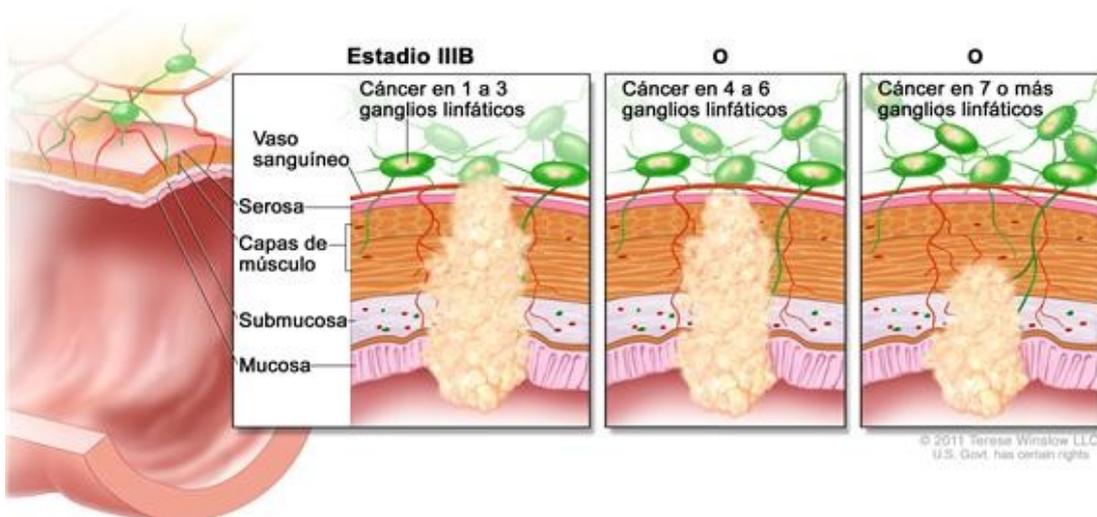


Figura 8. CCR en estadio IIIB. La imagen muestra su diseminación (Instituto Nacional del Cáncer 2011).

CCR en estadio IIIC; en la figura 9 muestra un recuadro de tres paneles. También se muestra un vaso sanguíneo y ganglios linfáticos. El primer panel muestra el cáncer en todas las tunicas, diseminándose a través de la serosa y en cuatro ganglios linfáticos. El segundo panel muestra cáncer en todas las tunicas y en siete ganglios linfáticos. El tercer panel muestra el cáncer en todas las tunicas, diseminándose a través de la serosa hasta dos ganglios linfáticos y diseminándose hasta órganos cercanos.



CCR en estadio IIIC. El cáncer se diseminó a través de la serosa de la pared del colon, pero no hasta órganos cercanos; el cáncer se diseminó hasta 4 a 6 ganglios linfáticos. Probablemente, el cáncer se diseminó a través de la túnica de músculo hasta la serosa o se diseminó a través de la serosa, pero no hasta órganos cercanos; el cáncer se diseminó hasta siete o más ganglios linfáticos cercanos. (Instituto Nacional del Cáncer 2011).

En el estadio IIIC:

El cáncer se diseminó a través de la túnica serosa de la pared del colon, pero no se diseminó hasta los órganos cercanos. El cáncer se diseminó a por lo menos cuatro, pero no más de seis, ganglios linfáticos cercanos.

El cáncer se diseminó a través de la túnica muscular de la pared del colon hasta la serosa de la pared del colon o se diseminó a través de la serosa, pero no se diseminó hasta los órganos cercanos. El cáncer se diseminó a siete o más ganglios linfáticos cercanos.

El cáncer se diseminó a través de la serosa de la pared del colon y se diseminó hasta órganos cercanos. El cáncer se diseminó a uno o más ganglios linfáticos cercanos, o se formaron células cancerosas en los tejidos cercanos a los ganglios linfáticos. (Instituto Nacional del Cáncer 2011).

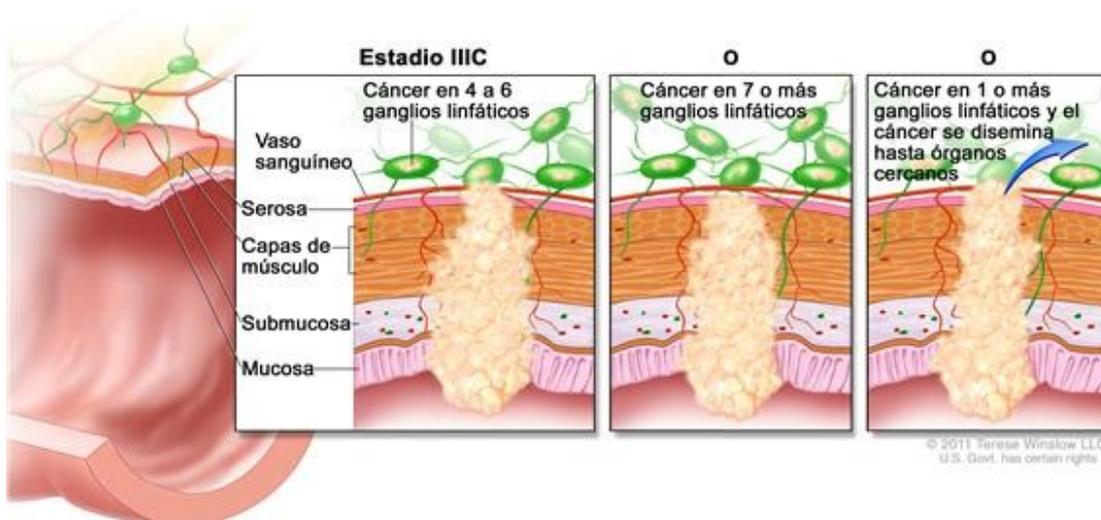


Figura 9. CCR en estadio IIIC. La imagen muestra su diseminación (Instituto Nacional del Cáncer 2011).



Estadio IV

CCR en estadio IV; la figura 10 muestra otras partes del colon hasta donde el CCR se puede haber diseminado, incluso los ganglios linfáticos, el pulmón, el hígado, la pared del abdomen y el ovario. El recuadro muestra el cáncer que se disemina a través de la sangre y los ganglios linfáticos hasta otras partes del cuerpo.

CCR en estadio IV. El cáncer se diseminó a través de la sangre y los ganglios linfáticos hasta otras partes del cuerpo, como el pulmón, el hígado, la pared del abdomen o el ovario (Instituto Nacional del Cáncer 2011).

El cáncer de colon en estadio IV se divide en estadio IVA y estadio IVB.

Estadio IVA: el cáncer se puede haber diseminado a través de la pared del colon y se puede haber diseminado a órganos o ganglios linfáticos cercanos. El cáncer se diseminó a un órgano que no está cerca del colon, como el hígado, un pulmón o un ovario, o hasta un ganglio linfático lejano (Instituto Nacional del Cáncer 2011).

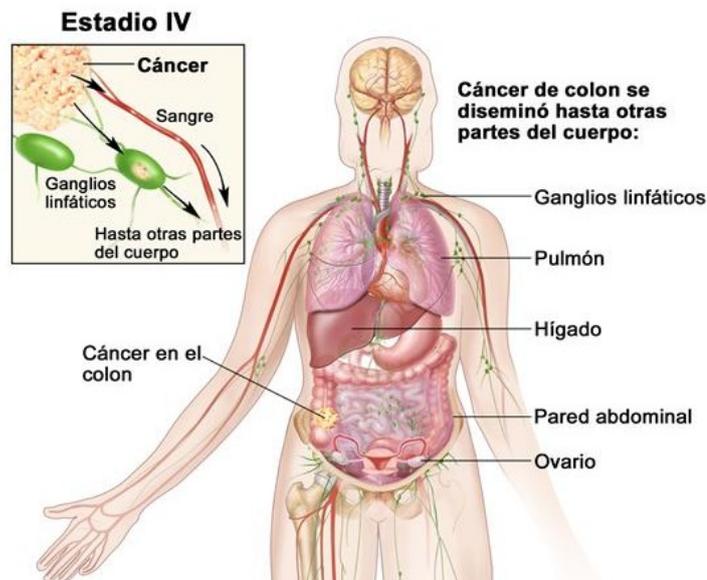


Figura 10. CCR en estadio IV. El cáncer se diseminó a través de la sangre y los ganglios linfáticos hasta otras partes del cuerpo, como el pulmón, el hígado, la pared del abdomen o el ovario (Instituto Nacional del Cáncer 2011).



1.3.4 Diagnóstico.

El CCR suele ser silente durante las fases iniciales de su desarrollo en la pared intestinal. Cuando aparecen manifestaciones clínicas, suelen ser algo diferentes en función de la localización del tumor por lo tanto las técnicas de diagnóstico son diferentes según los signos y síntomas.

- *Análisis de sangre oculta en heces (FOBT, siglas en inglés):* Algunas veces las lesiones cancerosas, o los pólipos, sangran, y este análisis puede detectar pequeñas cantidades de sangre en la materia fecal. Si esta prueba detecta sangre, es necesario hacer otras pruebas para encontrar el origen de la sangre. Dolencias benignas (tales como las *hemorroides*) también pueden provocar sangre en sus heces.
- *Sigmoidoscopia:* El médico le examina dentro del recto y del colon inferior (*sigmoideo*) con un tubo luminoso llamado *sigmoidoscopio*. Si se encuentran pólipos, la recomendación es extirpar. El procedimiento para extirpar pólipos se llama *polipectomía*.
- *Colonoscopia:* Consiste en examinar dentro del recto y todo el colon usando un tubo luminoso, largo, llamado *colonoscopio* (Sobrino, et. al. 2001).
- *Enema de bario con doble contraste:* El paciente bebe una solución de bario y se le bombea aire dentro del recto. Se toman varias imágenes de *rayos X* de su colon y recto. El bario y el aire ayudan a que el colon y el recto se destaquen en las imágenes. Es posible que los pólipos o tumores sean observables.
- *Examen rectal digital:* Un examen rectal forma parte con frecuencia de un examen físico de rutina. Su médico le inserta un dedo enguantado y lubricado en su recto para buscar áreas anormales con el tacto (Charlín, et. al. 2006).



- *Ecografía endorrectal (EER)*: Una sonda de ultrasonido se inserta en el recto. La sonda emite ondas de sonido que no se pueden oír. Las ondas rebotan en los tejidos del recto y tejidos cercanos, y una computadora usa los ecos para crear una imagen. La imagen puede mostrar la profundidad con la que ha crecido un tumor del recto o si el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos o a otros tejidos cercanos.
- *Radiografías del pecho*: Las radiografías del pecho pueden mostrar si el cáncer se ha diseminado a los pulmones.
- *Escanograma de tomografía computarizada*: Una máquina de rayos X conectada a una computadora toma una serie de imágenes detalladas de áreas internas del cuerpo. Es posible que se aplique una inyección de medio de contraste. El escanograma puede mostrar si el cáncer se ha extendido al hígado, los pulmones o a otros órganos (Charlín, et. al. 2006).
- *Oncogenes y diagnóstico de CCR*: Está caracterizado por la presencia de aberraciones cromosómicas cuya detección puede ser utilizada con fines diagnósticos. De hecho, en el 100% de los carcinomas y adenomas se detectan tales alteraciones, mientras que sólo son evidentes en el 37,5% de los pólipos no adenomatosos (Carreto, et. al. 2001). En líneas anteriores se ha mencionado la existencia de, al menos, tres vías de evolución hacia el CCR. Cada una de ellas está relacionada con diferentes alteraciones génicas de las que cada día conocemos más detalles. En estos casos, la rectosigmoidoscopia y la detección de sangre oculta en heces, sobre todo en pacientes de edad comprendida entre 50-60 años, es un procedimiento adecuado que ha demostrado ser capaz de disminuir la mortalidad por CCR (Carreto, et. al. 2001). Sin embargo, las otras dos vías de evolución hacia el CCR, el síndrome de Lynch y la PAF, revisten características netamente



diferentes. En estos casos, el procedimiento más habitual consiste en la realización de endoscopias repetidas en el tiempo a fin de determinar la posible evolución maligna (Carreto, et. al. 2001). Es aquí cuando adquiere mayor importancia el estudio molecular con fines diagnósticos. Incluso, se ha apuntado su idoneidad, atendiendo a la relación coste eficiencia, frente a la realización de colonoscopia y es innegable que determinar qué grupo de pacientes es portador de riesgo genético permite un mejor seguimiento, un tratamiento precoz que puede llegar a ser curativo y, en cualquier caso, la obtención de un mejor pronóstico (Carreto, et. al. 2001). Es más, los métodos génicos parecen ser más adecuados que los histopatológicos, hasta el punto de haber sido publicado que un 20-30% de los ganglios linfáticos infiltrados que histopatológicamente son negativos, pueden ser detectados por estudios moleculares. En el caso del síndrome de Lynch, por detección de inestabilidad de los microsatélites como consecuencia de mutaciones en los MRG, o por detección directa de la mutación en los genes hMLH1 y hMSH2 que se observa hasta en el 90% de los casos de CCHNP (Carreto, et. al. 2001). En los casos de familias con PAF, se investiga la mutación del gen APC que se observa en el 100% de los casos. En este sentido, se ha podido demostrar que los portadores de mutaciones en los MRG resultarán afectados de CCR en el 82% de los casos, además, el 60% de las mujeres con tal mutación desarrollará cáncer de endometrio o de ovario, existiendo también la posibilidad de desarrollar otros tipos de cánceres en menor proporción. Al igual que la mutación de los MRG, el estudio de la MSI también nos permite establecer la existencia de factores de riesgo, de hecho, el 88% de los CCR consecuentes a un síndrome de Lynch manifiestan MSI, aunque sólo el 45% habían dado positividad en la mutación de hMSH2 y hMLH1. En el 40% de los casos de MSI se



ha observado la mutación del gen MBD4 de forma heterocigota, y dicha mutación puede, a su vez, ser responsable del aumento de la MSI (Carreto, et. al. 2001). Otra mutación frecuentemente detectada y que parece consecuencia de la MSI, afecta al gen TGFbIIR. Tal mutación aparece en el 57% de los adenomas en pacientes con síndrome de Lynch y en el 85% del CCR. En el caso de PAF, el 100% de los individuos que la padecen presentan mutaciones en el gen APC, si bien, también aparece en el 50% de tumores no consecuentes a PAF (Carreto, et. al. 2001). De acuerdo con ello, si la mutación producida se lleva a cabo en el codón 1.309, se ha podido determinar que la aparición de CCR es más precoz (aproximadamente 10 años antes) que si la mutación radica en el codón 1.250 o 1.464. La investigación de mutaciones en el gen APC se ha simplificado tremendamente y, a la fecha, existen kits comerciales para la detección de proteína truncada en sangre periférica. En cualquier caso, su detección indica el riesgo incrementado de evolucionar a formas de CCR. En el caso del estudio de las alteraciones del gen APC, se ha investigado, incluso su detección por técnicas no invasivas, como es su determinación en extractos fecales, dando resultados aceptables para la determinación de factores de riesgo de CCR (Carreto, et. al. 2001).

Otras alteraciones encontradas que pueden ser utilizadas para el diagnóstico molecular de riesgo de CCR son la activación de la telomerasa, enzima requerida para la inmortalización celular y oncogénesis y cuya aparición parece ser un paso inicial en la evolución a CCR. Esta proteína se detecta por encima del 88% de los CCR, independientemente de su origen, también en el 50% de los adenomas pero no se detecta en el tejido normal. Su detección, por tanto, es indicativa de un riesgo incrementado de CCR y puede ser observada en estadios evolutivos previos a su aparición. Otra de las



mutaciones con interés diagnóstico es la que afecta a K-ras. Es observable en las formas polipoideas de CCR y solo excepcionalmente en las planas. Esta mutación se observa en el 55% de los adenocarcinomas y sólo en el 27% de los adenomas. En estadios más avanzados incluso se detectan mutaciones de K-ras o de otros genes al estudiar el DNA plasmático liberado a partir de células cancerosas (Carreto, et. al. 2001).

1.3.5 Tratamiento:

La cirugía en el CCR es el tratamiento de elección y tiene como fin el control local y regional de la enfermedad.

El tratamiento del CCR y recto es la cirugía exclusiva o con terapias de neo o coadyuvante, dependiendo de la etapa tumoral y la localización.

Existen numerosos protocolos en marcha uno de los más usados es:

Estadio I. Si el tallo del pólipo no infiltra la mucosa intestinal se puede realizar polipectomía.

Estadio II y III. El tratamiento de elección es la resección quirúrgica que consiste en hemicolectomía derecha o izquierda dependiendo de la localización de la lesión y quimioterapia adyuvante, junto con el seguimiento del paciente.

Estadio IV. Cirugía de tumor primario y de las metástasis, junto con quimioterapia coadyuvante o neoadyuvante (Charlín, et. al. 2006).

- La quimioterapia usa fármacos para destruir células cancerosas. Estos fármacos entran en el torrente sanguíneo y pueden afectar las células cancerosas en todo el cuerpo.

Los fármacos anticancerosos se administran ordinariamente por la vena, aunque algunos pueden darse por la boca. Se puede recibir el tratamiento en la sección ambulatoria del hospital, en el consultorio del médico, o en casa. En raras ocasiones, puede necesitarse la estancia en el



hospital (Departamento de salud servicios humanos de EE. UU. Institutos nacionales de la salud. 2008).

Sabiendo que los tumores de colon son quimiosensibles, se han ido asociando nuevos medicamentos más específicos; por lo tanto, el manejo actualmente más novedoso es la quimioterapia múltiple.

- La radioterapia usa rayos de alta energía para destruir las células cancerosas. Afecta las células cancerosas sólo en el área tratada. Los médicos usan diferentes tipos de radioterapia para tratar el cáncer. Algunas veces los pacientes reciben dos tipos de radiación:
- Radiación externa: La radiación proviene de una máquina. El tipo más común de máquina que se usa para la terapia de radiación se llama acelerador lineal. La mayoría de los pacientes van al hospital o a la clínica para su tratamiento, generalmente 5 días a la semana durante varias semanas (Departamento de salud servicios humanos de EE. UU. Institutos nacionales de la salud. 2008).
- Terapia biológica Algunas personas con cáncer colorrectal que se ha diseminado reciben un anticuerpo monoclonal, un tipo de terapia biológica. Los anticuerpos monoclonales se unen a las células cancerosas del colon o del recto.

Interfieren con el crecimiento de las células cancerosas y con la diseminación del cáncer. Las personas reciben anticuerpos monoclonales por una vena en el consultorio del médico, en el hospital o en la clínica (Grau y Pique 1990).

Algunas personas reciben quimioterapia al mismo tiempo.

Durante el tratamiento, su equipo de atención médica vigilará los posibles signos de problemas. Algunas personas toman medicamentos para prevenir una posible reacción alérgica. Los efectos secundarios dependen



principalmente del anticuerpo monoclonal usado. Los efectos secundarios incluyen sarpullido, fiebre, dolor abdominal, vómitos, diarrea, cambios en la presión arterial, sangrado o problemas respiratorios.

Los efectos secundarios usualmente se hacen más leves después del primer tratamiento. (Departamento de salud servicios humanos de EE. UU. Institutos nacionales de la salud. 2008) y (Grau y Pique 1990).

1.4 Modelo experimental inducible en ratón.

1.4.1 Importancia y antecedentes:

Los modelos experimentales animales han sido y seguirán siendo una herramienta esencial para el estudio genético y de los mecanismos de acción de terapias y nuevos medicamentos (Oshima y Oshima, 2010).

Por ello la búsqueda constante de productos naturales con eficacia demostrada y con mínimos efectos adversos.

La utilización del modelo de cáncer colon es necesario no solo para el estudio del mecanismo de patogenicidad sino que también para establecer tratamientos y métodos preventivos. El ratón del laboratorio (*Mus musculus*) se ha convertido en uno de los mejores modelos de especies animales en la investigación biomédica actual, a causa de la disponibilidad de los recursos de información genéticas/ genómicas precisas y técnicas de mutagénesis bien establecidas para la construcción de transgénicos, y químicos mutagénicos. Para el biólogo experimental las lesiones preneoplásicas pueden ofrecer la oportunidad de observar las alteraciones moleculares que conducen al CCR (Taketo y Edelman, 2009).

Recientemente se han publicado algunos trabajos en los que se proponen protocolos experimentales concretos, con el fin de armonizar de alguna forma lo que se realiza en diferentes laboratorios y de esa forma poder realizar comparaciones validas entre ellos.



Balb/c la cepa empleada en nuestros experimentos, ha sido descrita como una cepa de alta sensibilidad a la inducción de tumores. Efectivamente, debido a que la carcinogénesis de colon ocurre alrededor del día treinta después de la administración del carcinógeno o incluso antes, han sido usadas como referentes de análisis en estudios de carcinogénesis y quimioprevención de corto plazo (Zamorano, et. al. 2008).

Los modelos experimentales en roedores pueden imitar con un elevado nivel de significación muchos de los rasgos principales del CCR humano. Entre las ventajas que sean descrito y que argumentan a favor del uso de este modelo de inducción química de carcinogénesis, se pueden mencionar: potencia, reproducibilidad, simpleza y similitud con el CCR humano como por ejemplo la ubicación de tumores que en el ratón y el humano se concentra en la parte distal del colon (Zamorano, et. al. 2008). Muy frecuentemente ellos se desarrollan a partir de pólipos y frecuentemente exhiben rasgos histopatológicos muy semejantes a los que se observan en el CCR. También se han revelado semejanzas significativas entre el modelo de inducción química y el CCR humano en el nivel molecular. En ambos casos se observa expresión aberrante del gen APC además de mutaciones y localización celular alterada de catenina y desregulación demostrada de algunas vías de señalización como el caso del oncogén celular de mielocitomatosis, ciclina D1 y cinasas dependientes de ciclina (Zamorano, et. al. 2008). Al igual que en el humano, en CCR el sistema de inducción química también promueve un funcionamiento de regulado del proto-oncogen K-ras y elevados niveles de óxido nítrico sintetasa y ciclo oxigenasa-2. Las lesiones preneoplásicas con varios grados de displasia representan un paso obligatorio en la carcinogénesis de colon, cuya identificación y caracterización han centrado muchos esfuerzos en los últimos años. (Zamorano, et. al. 2008).



Los estudios sobre las dos condiciones genéticas que predisponen al CCR han resultado de gran utilidad, puesto que se ha logrado elucidar sus mecanismos básicos. El primero de ellos es la poliposis adenomatosa familiar, un trastorno hereditario de carácter autosómico dominante. Una deleción observada citogenéticamente sugirió que el gen responsable de este trastorno se localizaba en el cromosoma 5q subsecuentemente se aisló el gen supresor de tumores, llamado APC y se observó que las mutaciones de la línea germinal constituían la causa de la poliposis adenomatosa familiar. En 1990, Fearon y Vogelstein propusieron un modelo genético para explicar el desarrollo del CCR. Las principales características son las siguientes:

1. El desarrollo del CCR implica un gran número de pasos (El cáncer es un proceso multifacético).
2. Las mutaciones del gen APC inician el proceso y la progresión tumoral resulta de las mutaciones de otros genes que se muestra en la fig. 9.
3. Están implicadas las mutaciones del oncogén K-ras
4. Las mutaciones de otros genes supresores de tumores, incluyendo P53 y muchos otros localizados en el cromosoma 18q 21, también están involucradas.
5. Las mutaciones de genes que intervienen en la reparación celular aceleran el proceso global.
6. En total son 6 o 7 genes involucrados de forma inicial
7. El orden preciso de los cambios no resulta tan importante como lo es la acumulación de los mismos.
8. Mutaciones adicionales son necesarias para que se desencadene la diseminación y metástasis.
9. En otros padecimientos malignos, el espectro de oncogenes y genes supresores de tumores implicados, posiblemente difiera de aquel implicado en el presente modelo (Murray, et. al. 2001).

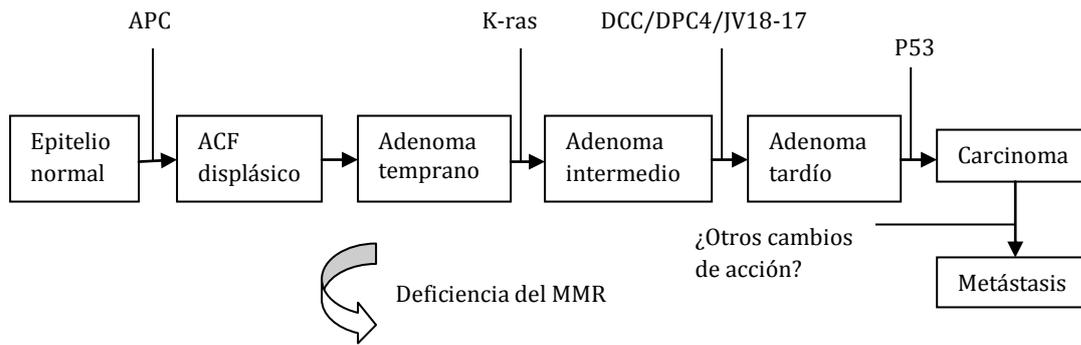


Figura 11. Cambios genéticos relacionados con la carcinogénesis colorrectal. (Murray, et. al. 2001)

Las mutaciones del gen APC inician el proceso neoplásico y la progresión tumoral surge de la mutaciones de los otros genes señalados. Los pacientes con poliposis adenomatosa familia heredan mutaciones del gen APC y desarrollan muchos foci displásicos aberrantes en forma de FCA, algunos de los cuales progresan conforme adquieren las mutaciones señaladas en la fig. 11 (Murray, et. al. 2001). Los tumores de pacientes con cáncer de colon hereditario no relacionado con poliposis, pasan por una serie de mutaciones similares, más no idénticas; las mutaciones del sistema de reparación de apareamiento (deficiencia de MMR en la fig. 11) aceleran este proceso. El K-ras es un oncogén que requiere solo de un único evento genético para su activación. Los otros genes específicos señalados constituyen genes supresores de tumores que requieren de dos eventos genéticos (uno para cada alelo) para su inactivación (Murray, et. al. 2001). El cromosoma 18q21 puede poseer varios genes supresores de tumores distintos implicados en la neoplasia colorrectal, siendo los genes DDC, DPC4 Y JV18-1 propuestos como candidatos. Una gran variedad de alteraciones genéticas distintas también se han descrito en una pequeña fracción de los cánceres colorrectales avanzados, las cuales podrían resultar responsables



de la heterogeneidad de las propiedades biológicas y clínicas observadas en los diversos casos (Murray, et. al. 2001).

El modelo anterior representa un gran estímulo para continuar con las investigaciones; no obstante, aún falta mucho por aprender sobre las vías hacia la carcinogénesis en las células colónicas y otros tipos celulares.

Las lesiones preneoplásicas son de extrema utilidad para realizar experimentos con factores ambientales que permiten estimar la etiología, el tratamiento y la prevención del CCR (Murray, et. al. 2001).

El tratamiento previo para el caso del uso de infusiones de plantas medicinales como agente quimiopreventivo, se basa en evidencias que dan cuenta de la eficiencia en la prevención de daño inducido por agentes químicos como cisplatino o extractos de hierbas medicinales (Zamorano, et. al. 2008).

La quimiopreención fue originalmente definida por Sporn en el año de 1976 para indicar, la potenciación farmacológica o fisiológica mediante las cuales la progresión de una lesión preneoplásicas puede ser prevenida, detenida o revertida. Aunque muchos constituyentes en los alimentos y dietéticos se han asociado a una disminución en el riesgo del CCR, la evidencia epidemiológica es quizá más fuerte en lo relativo al consumo de vegetales. Muchos constituyentes químicos vegetales o fotoquímicos han sido asociados con propiedades protectoras. Las hierbas y vegetales medicinales constituyen una fuente de muchos de esos compuestos químicos. Muchos antioxidantes naturales han mostrado una relación inversa de riesgo en varios tipos de cáncer distintos incluyendo el cáncer de colon (Zamorano, et. al. 2008).

El protocolo permite además la posibilidad de examinar el efecto de agentes preventivos putativos que inhiban la formación de displasias colónicas y avanzar así dentro de posibilidades terapéuticas futuras. Las lesiones preneoplásicas son especialmente válidas como biomarcadores de



efecto para ensayar infusiones de hierbas medicinales a las cuales se les atribuyen propiedades preventivas y en las que se ha podido comprobar dicho efecto (Justil, et. al. 2010) (Zamorano, et. al. 2008).

1.5 Sustancias inductoras.

1.5.1 Mecanismo de la 1,2-Dimetilhidrazina:

Debido a que no se encuentra en el país la 1,2- Dimetilhidrazina dihidroclorato (1,2-DMH). Se utilizó la 2,4-Dinitrofenilhidrazina, por lo cual se desconoce el mecanismo exacto de esta, y tomando en cuenta sus similitudes estructurales se cree que es semejante al que a continuación se explica.

El compuesto 1,2-DMH es el carcinógeno intestinal más usado. En 1967 Druckrey pusieron de manifiesto que la DMH era estructuralmente semejante al compuesto natural cicasina, descubriendo que posee una específica capacidad de producir tumores de colon en diversas especies de roedores. Es un compuesto de síntesis, no se sabe que aparezca en la naturaleza. Es sintetizado para su uso en laboratorio en cantidades limitadas. La cantidad de carcinógeno final está en función de la actividad de las vías metabólicas que conducen a su formación, de la actividad de las vías de detoxificación y también en la vida media biológica de las especies implicadas (Piñols, 2010).

Es un carcinógeno efectivo y selectivo de colon, debido a su actividad alquilante en los ácidos nucleicos del epitelio intestinal y sus propiedades mutagénicas. Actúa modificando el genoma de la célula, ocasionando eventualmente alteraciones del fenotipo celular, tales como diferenciación, invasividad o conducta proliferativa anormal. La N-Metilguanina y la O-6 Metilguanina han sido aisladas del ADN de la mucosa colónica de ratas inyectadas con DMH y en colon de rata cultivado tras su incubación con DMH marcado (Piñols, 2010).



La potencia y organoespecificidad de procarcinógenos químicos están en gran medida determinada por la reactividad química y por la capacidad de que haya suficiente cantidad de sus formas carcinogénicas últimas en los tejidos diana.

La carcinogénesis por DMH en el colon de la rata es un proceso en 2 etapas y el producto de las tasas a las que cada paso aparece es de alrededor de 2×10^{-8} /célula en riesgo/dosis de DMH/año (Piñols, 2010).

El tratamiento con DMH es capaz de inducir directamente un cambio estable y transmisible en un número de células epiteliales que por consiguiente estarían en riesgo respecto a un segundo suceso capaz de iniciar el crecimiento tumoral.

Este cambio es transmisible dentro de la mucosa, que se renueva por períodos prolongados. Las células afectadas no tienen expresión fenotípica en términos de ventaja proliferativa (Piñols, 2010).

El segundo cambio no requiere exposición al carcinógeno (aunque la presencia continuada del carcinógeno puede probablemente contribuir a ello) y afecta aleatoriamente a las células expuestas al carcinógeno a una tasa que es constante, al menos dentro del tejido considerado.

La suposición más razonable es que el primer paso representa una mutación somática. Las propiedades químicas y biológicas de la DMH, sus propiedades mutagénicas así como la naturaleza transmisible y estable de sus efectos en el epitelio intestinal apoyan este mecanismo. Cada inyección de DMH entra en interacciones inespecíficas diseminadas con el ADN y otros constituyentes macromoleculares celulares y es probablemente capaz de inducir, sobre una base aleatoria, una primera mutación específica en una proporción dada de células del colon (Piñols, 2010).

Estas células estarían en riesgo para el segundo cambio, que permitiría la expresión del fenotipo cáncer. En tal sistema, el umbral teórico de la dosis de carcinógeno sería la dosis más pequeña capaz de inducir la



primera mutación específica en al menos una célula. En este momento, existe un mecanismo en el epitelio del colon que puede aparecer independientemente de la exposición al carcinógeno y es capaz ya de producir un efecto mutacional específico en las células.

El cáncer en este ejemplo es el resultado de una mutación somática recesiva inducida por 1,2-DMH, seguida de una conversión del mutante recesivo a un estado homocigótico, siendo la tasa de conversión una propiedad intrínseca del tejido cólico. Durante una exposición prolongada la DMH puede, en consecuencia, incrementar también la incidencia de cáncer afectando al segundo gen homólogo en las células heterocigóticas. (Piñols, 2010)

La organoespecificidad de la 1,2-DMH depende de reacciones de oxidación catalizadas por reacciones enzimáticas no identificables en los tejidos diana. Estudios autorradiográficos utilizando 1,2-DMH marcado muestran que este agente es captado por el hígado aproximadamente 1 hora después de la inyección y en las células epiteliales del colon 3 horas después de la misma (Piñols, 2010). La 1,2-DMH es excretada primariamente por el pulmón y riñones que eliminan del animal aproximadamente un 50% de la dosis inyectada. Los principales metabolitos en aire espirado son CO₂ y azometano; la orina contiene, 1,2-DMH inalterada, azoximetano, azometano y metilazoximetanol. Se presume que el hígado es el lugar primario de oxidación de 1,2-DMH a metilazoximetanol (MAM), que es entonces transportado vía sangre y /o corriente fecal al colon y otros órganos, aunque otros estudios indican que el colon en sí mismo contiene tipos celulares epiteliales o enzimas capaces de convertir la 1,2-DMH en productos mutagénicos sin implicar necesariamente metabolismo intermediario por hepatocitos, de hecho la mucosa colorrectal implantada en el estómago es sensible a la tumorigénesis causada por 1,2-DMH (Piñols, 2010). También se ha observado que el tránsito intestinal enlentecido induce un número



aumentado de neoplasias colónicas en relación con el contacto prolongado con la mucosa del carcinógeno o debido a una mayor concentración en la luz colónica. Los estudios de Stralka y Strobel, 1991 usando anticuerpos policlonales anti P450, IIB1 y IIA1 postulan un sistema de metabolización de la droga P450-dependiente en el colon capaz de activar y metabolizar el modelo de carcinógeno colon-específico 1,2-DMH. Algunos inhibidores metabólicos pueden interrumpir la activación del 1,2-DMH y prevenir la inducción tumoral. Algunos antioxidantes como el disulfiram y otros compuestos relacionados como el carbón disulfuro o el bis (etilxantógeno) son capaces de inhibir la carcinogénesis inducida por DMH y azometano (AOM) inhibiendo la N-oxidación in vivo de AOM a azoximetano y la C-oxidación del AOM in vivo (Piñols, 2010).

Los estudios de Davies et al. 1991 demuestran que aparecen alteraciones en la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en la mucosa premaligna de animales tratados con 1,2-DMH meses antes de que se desarrollen tumores visibles y estos cambios pueden explicar parcialmente los niveles alterados de Na^+ y K^+ en el citoplasma y membrana basal de colonocitos premalignos y malignos. La despolarización epitelial se produce tras la inyección del carcinógeno (Piñols, 2010).

Llor, et. al. 1991 describen mutaciones K-ras de G a A en aproximadamente un tercio de los carcinomas inducidos por 1,2-DMH y, en líneas celulares de tumores de colon de rata derivados de tumores inducidos por la misma 1,2-DMH, mientras que no observaron mutaciones H-ras. Estas mutaciones se produjeron en el segundo nucleótido de los codones 12 ó 13 o en el primer nucleótido del codón 59 del gen K-ras.

Las mutaciones k-ras fueron observadas en mucosa colónica premaligna a las 15 semanas de la inyección de 1,2-DMH, en zonas sin displasia, adenoma o carcinomas, sugiriendo que la mutación ras es un evento precoz en la carcinogénesis colónica (Piñols, 2010).



En tumores colónicos de ratones tratados con 1,2-DMH se observa una ausencia de pérdida alélica en el locus p53, lo que sugiere que las pérdidas alélicas del locus p53 no intervienen en la carcinogénesis inducida por DMH o que la alteración de los productos del gen podría tener un efecto de abolición de la función normal del p53 (Piñols, 2010).

1.5.2 2,4-Dinitrofenilhidrazina.

1.5.2.1 Generalidades y aplicaciones.

Es un compuesto orgánico relativamente sensible a golpes y fricción, por lo que debe tener especial cuidado con su uso. Es una hidrazina substituida usada generalmente como prueba cualitativa para grupos carbonilos (Ficha de seguridad, 2011).

Número CEE: 2043093

Numero del abstracto químico: 119-26-6

Rango del porcentaje de concentración: 60,0 - 70,0

Unidades del Rango de Porcentaje: peso/peso

Símbolo CEE para este ingrediente: F - FACILMENTE INFLAMABLE Xn - NOCIVO

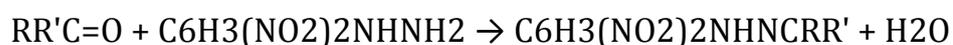
Frase(s) R de este ingrediente: R 1: Explosivo en estado seco. R 11: Fácilmente inflamable. R 22:

Nocivo por ingestión.

VLU (Valor Límite del Umbral): No establecido

LPE (Límite Permisible de Exposición): No establecido Reactivo de Brady (Ficha de seguridad www. 2011).

La 2,4-dinitrofenilhidracina puede usarse para detectar cualitativamente los grupos carbonilo de cetonas y aldehídos. El resultado es positivo cuando hay un precipitado rojo o amarillo (dinitrofenilhidrazona):





Esta reacción puede describirse como una reacción de condensación: se unen dos moléculas y pierden agua. También es llamada reacción de adición-eliminación: una adición nucleofílica del grupo -NH_2 al grupo carbonilo C=O , seguida de la remoción de una molécula de H_2O (Sustitución nucleofílica aromática obtención de 2,4 Dinitrofenilhidrazina, 2011).

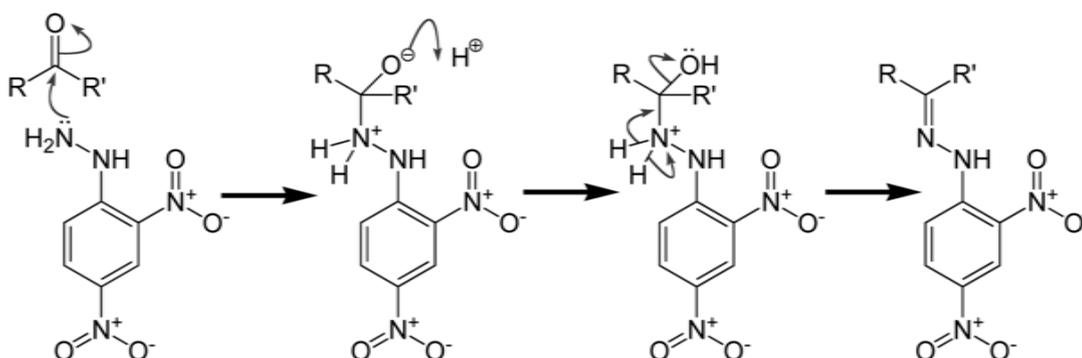


Figura 12. Mecanismo de reacción entre la 2,4-DNFH y un aldehído o cetona (Sustitución nucleofílica aromática obtención de 2,4 Dinitrofenilhidrazina, 2011).

1.5.2.2 Síntesis:

La obtención de 2,4-dinitrofenilhidracina es una reacción de *sustitución Nucleofílica aromática*.

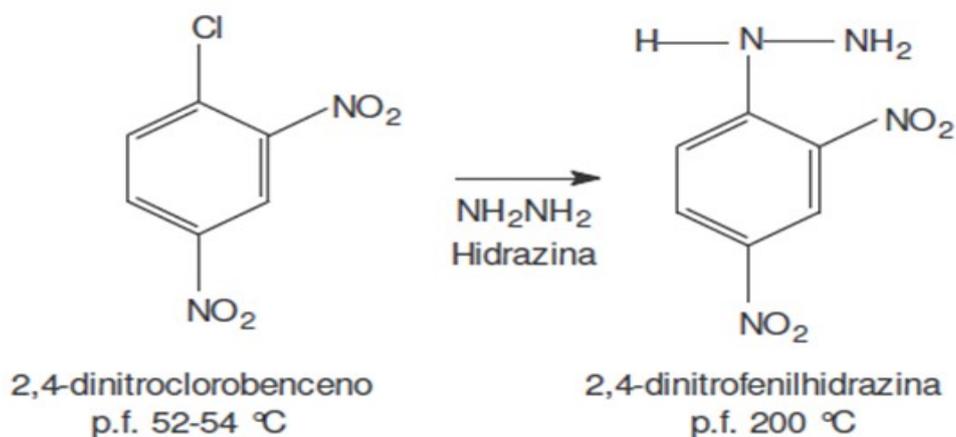


Figura 13. Síntesis de la 2,4-dinitrofenilhidracina (Sustitución nucleofílica aromática obtención de 2,4 Dinitrofenilhidrazina, 2011).



La sustitución de un halógeno por un nucleófilo en un halogenuro de arilo que no tiene grupos electro atractores como sustituyentes es muy difícil. El anillo aromático es un sistema rico en electrones, lo que le dificulta reaccionar con reactivos que también son ricos en electrones. Sin embargo cuando hay grupos electro atractores, especialmente grupos nitro en posición orto o para al halógeno, la sustitución nucleofílica toma lugar con relativa facilidad. Este cambio de reactividad del anillo aromático es debido a que los grupos nitro además de que hacen menos rico en electrones al anillo, estabilizan la carga negativa por efecto inductivo (con el nitrógeno cargado positivamente) y por efecto de resonancia (con un doble enlace C=N) (Sustitución nucleofílica aromática obtención de 2,4 Dinitrofenilhidrazina, 2011).

1.5.3 Metocarbamol:

1.5.3.1 Generalidades y aplicaciones:

Es un carbamato, derivado de la guaifenesina; el cual posee un potente efecto relajante musculo esquelético de acción central, mediante un efecto sedativo gracias a su función como depresor del SNC.

Absorción: El metocarbamol es rápidamente y casi completamente absorbido desde el tracto gastrointestinal. Las concentraciones en sangre y suero para obtener la sedación, relajación muscular o efectos tóxicos no son conocidas con exactitud. (Orellana, 2003).

La mucosa intestinal está compuesta por una sola capa de células, que se renueva cada dos días. Sólo 25 milésimas de milímetros separan el contenido intestinal de la sangre. Dada la extrema delgadez de esta capa, de su estado va a depender que se pueda hacer una adecuada selección de lo que debe, o no debe, ingresar en el torrente sanguíneo o linfático, los carbamatos pueden dañar esta mucosa al alterar las enzimas digestivas. (Orellana, 2003).



1.5.3.2 Mecanismo de acción del Metocarbamol:

Los carbamatos tienen una gran afinidad por las esterasas, tales como la quimiotripsina, la acetil colinesterasa, la pseudocolinesterasa, carboxilesterasas plasmáticas y hepáticas, paraoxonas, y otras específicas dentro del cuerpo. Funcionan como el sustrato normal de las enzimas acetilasas de este grupo, así los carbamatos son capaces de inhibir la acetilcolinesterasa en el sistema nervioso, mediante la competencia con la acetilcolina por el sitio activo. Las enzimas afectadas por los carbamatos afectan a la absorción intestinal (Costa y Lutz, 2011).

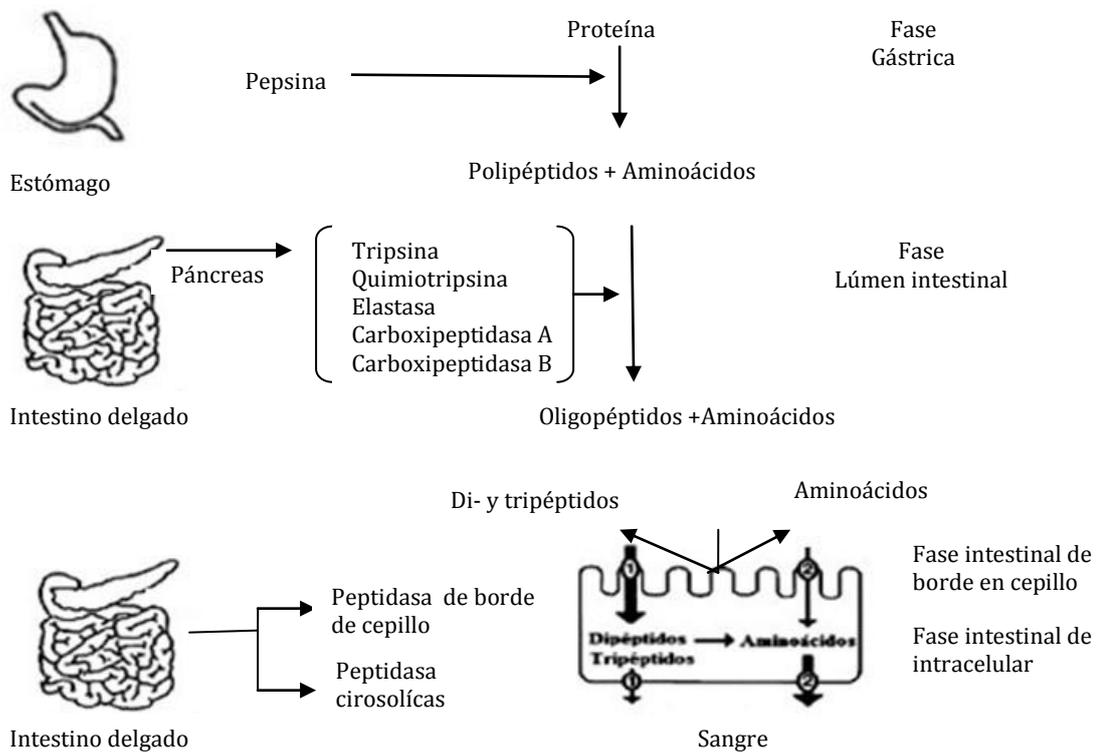


Figura 14. Mecanismo del metocarbamol en las células epiteliales (Costa y Lutz, 2011).



1.6 Vicia faba.

1.6.1 Generalidades.

Nombre común o vulgar: Haba, Habas verdes

Nombre científico o latino: *Vicia faba*

Familia: Leguminosas (Font, 1992).



Figura 15. Planta de la *Vicia faba* (Font, 1992).

1.6.2 Propiedades.

La evidencia sugiere que los constituyentes de los alimentos se han asociado en una disminución en el riesgo de cáncer de colon, y es quizá más fuerte en lo relativo a consumo de vegetales. De entre los cuales la *Vicia faba* que pertenece a la familia de las leguminosas, comúnmente conocida como haba; se ha considerado de alto valor nutritivo, pudiéndose caracterizar por un alto contenido de proteínas, vitaminas del grupo B, minerales, fibra y muchos otros compuestos definidos como no nutrientes desde hace algún tiempo, los estudios han demostrados que algunos mitógenos como las lectinas, derivado del haba, pueden actuar sobre el sistema inmunológico modulando su respuesta, y el descubrimiento de sus actividades antitumorales ha llamado la atención; por lo cual la utilizaremos para estudiar sus propiedades anticancerosas en el daño inducido a los ratones



en el modelo diseñado para crear criptas aberrantes, debido a que de ser así se podría proponer como tratamiento para la mejora o prevención del cáncer de colon (Font, 1992).

A continuación se cita textualmente de un libro de herbolaria mexicana en un lenguaje popular los usos y cualidades del haba. “El haba posee numerosas propiedades medicinales importantes tanto en estado fresca como seca. El cocimiento de las habas es eficaz para combatir la formación de los cálculos en las vías biliares o urinarias, para la cual se tomará en tazas. La infusión de habas tostadas son magnificas contra la gripe y el asma, para estos casos se beberá en tacitas. Por su contenido en yodo es muy recomendable comer habas verdes para tratar el bocio exoftálmico. También las habas son buenas contra la colitis ulcerosa, inflamación del páncreas, cirrosis del hígado y tuberculosis. La decocción de las habas es magnifica para los anémicos y enfermos de los pulmones, así como para los que sufren de dolores de costado. Las habas tostadas se comen para acrecentar y conservar la memoria, siendo apropiada especialmente para los estudiantes. La harina de las habas sirve para calmar los dolores en las hinchazones y esta misma en cataplasma con leche, es excelente contra las hinchazones de los testículos. Además disuelve los tumores que se presentan en los órganos genitales. También la harina haba es muy efectiva contra las quemaduras de todo género. Esta misma es también buena contra las hinchazones de los senos, debido a una excesiva secreción de la leche, para lo que se aplicará en cataplasma. De la harina se prepara ponche que es excelente para la neumonía, tos, resfríos, etc. La cáscara de las habas tostadas, bien molida y cernida es buena para combatir los vómitos de sangre, para la cual se administrará $\frac{1}{2}$ cucharadita en una taza grande o en una copa de vino. Para desgrasar y tonificar el cuero cabelludo, se hará lavados con agua y polvo de semillas tostadas de habas. Las habas partidas se aplican contra los abscesos dentoalveolares. La parte



interna de las vainas del haba verde se usa con buenos resultados contra los empeines de la cara. Finalmente, las hojas frescas de las habas molidas con aceite de almendras, se aplican contra las erisipelas, quemaduras y todo género de inflamaciones” (Font, 1992).

1.6.2.1 Composición del Haba

Las leguminosas contienen tirosina, dioxifenilalanina, tiramina, convicina. En las semillas hay vicinas y convicinas, alcaloides o glucósidos nitrogenados: diversos proteicos, legumelina, vicilina, proteasas, algo de sacarosa, ácido inositolhexafosforico.

Las habas desprovistas de su hollejo constituyen un alimento de elevado valor nutricional de fácil digestión (Font, 1992).

Tabla 2. Composición de la *Vicia faba* por cada 100gr (Font, 1992).

	Tiernas	Secas
Proteínas	7 %	23%
Hidratos	11, 3 %	55%
Minerales	Calcio (26 mg.) Fósforo (98 mg.)	Calcio (90 mg.) Fósforo (380 mg.)
Vitaminas	C (25 mg.) A, P, E, K	C (5 mg.) A, P, E, K

1.6.3 Toxicidad de la *Vicia faba*.

El favismo consiste en una enfermedad genética, la deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de los eritrocitos, que tiene como consecuencia que una serie de sustancias, inocuas para la población general, sean tóxica para esas personas, al producir hemólisis. Dado que el gen que codifica este enzima se encuentra en el cromosoma X, la enfermedad es mucho más frecuente en los hombres que en las mujeres. Existen dos alelos



defectuosos, uno extendido en la cuenca del mediterráneo y el otro en África. El favismo ha pervivido en la población probablemente porque proporciona cierta protección contra la malaria. En algunas zonas del Mediterráneo, como Sicilia o Rodas, la incidencia entre la población masculina supera el 5 por mil (Oliva, et. al. 2008).

1.6.3.1 Substancias tóxicas de las habas

En las habas se encuentran la vicina y la convicina, dos glucósidos que se hidrolizan en el tubo digestivo por la acción de la beta-glucosidasa para dar lugar respectivamente a divicina e isouramilo.

La divicina y el isouramilo son capaces de actuar como oxidantes y producir la lisis de los eritrocitos en situaciones de deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, pero no en situaciones de presencia normal de esta enzima. El mecanismo pasa probablemente por la oxidación irreversible del glutatión (Oliva, et. al. 2008).

En un ensayo genotóxico y citotóxico donde se utilizó a diferentes concentraciones un extracto proteico de *Vicia faba* (EpVf), realizado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, aplicando la técnica de Intercambio de cromátidas hermanas (ICH) *in vitro*; se llegó a la conclusión que no produce genotoxicidad alguna a ninguna de las concentraciones empleadas en el estudio pues no induce la formación de ICH. El EpVf tiene la capacidad de contrarrestar el daño sobre el material genético al disminuir la frecuencia de formación de ICH mediante la protección al DNA por lo que se puede decir que posee un efecto antigenotóxico. Al no verse alterado el índice de replicación por la presencia del EpVf se puede decir que no induce citotoxicidad (Macías, 2009).



1.6.4 Lectinas.

Las lectinas son un grupo de proteínas de origen no-inmune que comparten la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a los carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas. Estas proteínas usualmente tienen al menos dos sitios de unión por molécula: un azúcar específico y una molécula glicosilada. Como característica particular tienden a aglutinar a las células las cuales se unen. Este tipo de moléculas se encuentra distribuida en la naturaleza, en diferentes organismos como microorganismos, hongos, animales y plantas (Hernández, et. al. 2005).

Reconocen de manera específica carbohidratos de la superficie celular o en suspensión, aglutinan células y precipitan glicoconjugados; las lectinas poseen por los menos dos sitios de reconocimiento a carbohidrato, de ahí su capacidad para aglutinar células, aunque en la actualidad el término de lectina se ha aplicado a proteínas con un solo sitio de reconocimiento a carbohidrato como es el caso de las selectinas. Las lectinas no poseen actividad enzimática y no son producto de una respuesta inmune.

Debido a la capacidad de estas proteínas para interactuar con células de la respuesta inmune, algunas lectinas poseen efectos inmunosupresores, otras también son tóxicas, inhiben el crecimiento de células tumorales y participan en la adhesión celular. Todas las actividades biológicas reportadas para las lectinas tienen en común el reconocimiento de un receptor oligosacárido (Hernández, et. al. 2005).

En las plantas, la mayoría de estas moléculas están presentes en los cotiledones y endospermos de las semillas y constituyen de 2 a 10% del total de proteína de éstas. Se sugiere que dentro de la planta, estas proteínas pueden tener diferentes funciones como son: regulación fisiológica, defensa mecánica contra el ataque de microorganismos, almacenamiento de proteínas, transporte de carbohidratos, estimulación mitogénica,



reconocimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium*, y algunas más.

Algunas de sus aplicaciones son: análisis de funciones linfoproliferativas y citotóxicas en células mononucleares causadas por algunas drogas, detección de anomalías cromosómicas, como marcadores fluorescentes para estudiar cambios estructurales en los glicoconjugados presentes en las superficies celulares, y la detección de transformaciones malignas en las células, entre otras (Hernández, et. al. 2005).

En diversas especies animales se han reportado evidencias de que las lectinas participan en fenómenos tales como el reconocimiento y la eliminación de glicoproteínas del sistema circulatorio, así como de células envejecidas, células tumorales y microorganismos, mediante un proceso de opsonización y la participación de células con actividad fagocítica. Las Lectinas también participan en procesos de reconocimiento que permiten la diferenciación celular, la organogénesis, la migración de linfocitos y como factores determinantes en la metástasis (Hernández, et. al. 2005).

En 1963 que Aub et. al describen que las lectinas de plantas pueden distinguir entre células normales y células malignas y que la diferencia está en la superficie, en otras palabras, que la alteración de la superficie celular es propiedad de células cancerígenas. Debido a sus propiedades específicas, las lectinas se han utilizado como herramientas en la bioquímica, biología celular, inmunología, genética y biomedicina con propósitos analíticos y preparativos, así como para el diagnóstico y terapia en el cáncer (Aub; et. al., 1963).

Los glicoconjugados de las superficies celulares son conocidos por su desempeño importante en las interacciones célula-célula, tales como el reconocimiento, la comunicación y adhesión. Tales interacciones son también importantes en la tumorigénesis, progresión del tumor y



metástasis. Durante la diferenciación celular y la transformación maligna, la biosíntesis de las cadenas de oligosacáridos de glicoproteínas es frecuentemente alterada y esta alteración puede ser detectada por las lectinas. Dentro de los estudios de membrana se ha reportado el uso de lectinas para investigar cambios estructurales en las superficies celulares (Castillo y Abdullaet, 2005).

En el campo de la quimioterapia contra el cáncer, el estudio de las lectinas ha jugado un papel importante. Diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* (tabla 3) con numerosas lectinas de plantas han demostrado que poseen actividad antitumoral (efecto inhibitorio en el crecimiento del tumor) y actividad anticarcinogénica (efecto inhibitorio en la inducción del cáncer por carcinógenos). Los trabajos reportados utilizando diferentes lectinas de plantas en casos de cáncer, nos permiten entender que los mecanismos de acción de estas proteínas son muy variados dependiendo de diferentes factores como pueden ser el origen celular, clase de tumor y concentración de lectina. (Castillo y Abdullaet, 2005).



Tabla 3. Mecanismo de acción de lectinas de plantas en diferentes células malignas *in vitro* e *in vivo* (Castillo, Abdullaet, 2005).

In vitro.			
Lectina	Mecanismo de acción	Línea celular	Tipo
PHA-L (Phaseolus vulgaris)	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones.	LoVo. HCT-15 SW837	Cáncer colorrectal humano.
Con A (Concavalina A)	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones.	LoVo. HCT-15 SW837	Cáncer colorrectal humano.
GSA (Griffonia simplicifolia 1-A)	Estimula el crecimiento celular a altas y bajas concentraciones. Inhibe el crecimiento celular a altas concentraciones.	SW837 LoVo.	Cáncer colorrectal humano.
WGA (Triticum vulgare)	Inhibición del crecimiento a altas concentraciones.	LoVo. HCT-15 SW837	Cáncer colorrectal humano.
DSA (Datura stramonium)	Inducción de diferenciación irreversible e inhibición de proliferación.	C6 glioma, U251, SNB-75, SNB-78	Glioma de rata, tumor de cerebro humano.
VCA (Viscum álbum, L coloratum)	Inhibición del crecimiento dosis-dependiente. Inhibición de proliferación dosis-dependiente con inducción de apoptosis. Inducción de la apoptosis a través de la activación de caspasa-3. Inhibición de la telomerasa. Inducción de apoptosis por la desfosforilación de Akt.	Molt-4 B16-BL6 HL-60 SK-Hep-1, Hep3B A253	T linfoblastico humano agudo. Melanoma metastasico. Leucemia promieloide aguda. Hepatocarcinoma humano. Cáncer humano.
ML-1 (Viscum álbum)	Inducción de la apoptosis:	Jurkat T-cell, BJAB B-cell	Leucemia humana.



	Inactivación intracelular de caspasas.		
ABL (Agaricus bisporus I)	Inhibición de proliferación sin citotoxicidad. Se internaliza y selectivamente bloquea la importación de proteínas nucleares dependientes de NLS a través de Orp-150 truncada.	HT29	Adenocarcinoma de colon humano.
V.f (Vicia faba)	Inhibición de proliferación no asociado a citotoxicidad, posible interacción con la molécula de adhesión epCAM.	LS174T, SW1222 y HT29	Cáncer de colon humano.
AAL (Agrocybe aegerita)	Inducción de apoptosis con actividad de DNAasa.	HeLa, SW480, SCG-7901, MGC80-3, BGC-823, HL-60, S-180	Cánceres humanos. Sarcoma de ratón.
In vivo			
Lectina.	Mecanismo de acción.	Tipo.	
PHA (Phaseolus vulgaris)	Inhibición del crecimiento de tumores.	Murina linfomas ascíticos.	
SBA (Glycine max)	Fortalecimiento del sistema inmune del huésped.	Murina linfoma ascítico.	
TMA I y II (Triholoma mongolicum)	Inhibición del tumor y prolongación de la vida de los animales.	Ratón con células de sarcoma 180.	
GS-1 (Griffonia simplicifolia)	Inhibición del crecimiento de tumor.	Ratón con células ascíticas Ehrlich.	
VCA (Viscum album, L coloratum)	Inhibición del crecimiento de tumores y metástasis por el incremento de la apoptosis y la inhibición de la angiogénesis.	Ratón inoculado con células de melanoma B16-BL6	
KML-C (Korean mistletoe: Viscum album coloratum)	Actividad inmunomoduladora para fortalecer el sistema de defensa del huésped, efecto en metástasis asociado a muerte natural y macrófagos.	Murina melanoma, carcinoma de colon y linfoma.	
ML-I (Viscum album)	Efecto antitumoral con reducción del crecimiento del linfoma trasplantado.	Ratón con tumores de linfoma no-Hodgkin.	



Los efectos bioquímicos que se han reportado de las Lectinas de plantas en células malignas son la inhibición de la síntesis de DNA, RNA y proteínas. Sin embargo, si el efecto es directo o si es un resultado indirecto de las lectinas, aún es cuestionable. También se describen otros posibles mecanismos por los cuales las lectinas pueden actuar, como su actividad citotóxica vía apoptosis, el efecto de las lectinas en la actividad de dos enzimas la DNA polimerasa y RNA polimerasa, y en la regulación del sistema de adenilación en la membrana celular. De esta manera, Abdullaev y González (1997) revisaron que las lectinas de plantas pueden modular procesos biológicos en las células tales como el crecimiento, la adhesión, transformación maligna, metástasis y apoptosis, proponiendo que las lectinas pueden ser una herramienta útil en las investigaciones sobre el cáncer, para su diagnóstico y como terapéutico. Sin embargo, aún se requieren de más estudios para entender el o los mecanismos del efecto antitumoral de éstas (Abdullaev y González, 1997).

En 1999, se realizaron estudios con V.f. en la proliferación celular, la adhesión celular, la incorporación de aminoácidos y en la diferenciación de tres líneas celulares derivadas de adenocarcinoma colorrectal (LS174T, SW1222 y HT29). En las tres líneas celulares se observó agregación (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incrementa la diferenciación morfológica relacionada con la adhesión de la molécula ep-CAM. También se describe la inhibición en la proliferación de las líneas celulares de una manera dosis-dependiente y reversible, que no está asociada a la citotoxicidad y se ve incrementada la incorporación de aminoácidos (Castillo y Abdullaet, 2005).



1.6.4.1 Lectinas como Inmunotoxinas para el tratamiento de cánceres humanos y sugerencias de mecanismo de acción del efecto antitumoral.

Dada las propiedades de las lectinas como proteínas RIP, algunos estudios se han enfocado en el uso de éstas para la producción de inmunotoxinas contra el cáncer, donde la lectina o su parte activa es unida a un anticuerpo monoclonal, que posee un sitio receptor específico para células tumorales.

Los estudios realizados *in vitro* e *in vivo* sobre las lectinas y su participación en el cáncer han sido numerosos y demuestran que éstas pueden modular diversos procesos biológicos, tales como el crecimiento celular, la adhesión, acoplamiento, transformación maligna, metástasis y apoptosis. En los últimos años los trabajos que se han realizado con diferentes lectinas de plantas en células cancerígenas demuestran que la acción de éstas varía desde la especificidad de unión a azúcares hasta el mecanismo de acción a nivel molecular (Castillo y Abdullaet, 2005).

La utilización de las lectinas como moléculas marcadoras en células transformadas ha demostrado que la unión de las lectinas es específica en las líneas celulares y esto podría reflejar distintas vías de progresión de las líneas individuales celulares tumorales.

A nivel metabólico se describe una secuencia de eventos desde que las lectinas entran al tracto digestivo:

1. Unión a linfocitos
2. Liberación de citocinas en la sangre.
3. Activación y liberación de linfocitos del bazo en la circulación.
4. Activación de células NK y macrófagos.
5. Producción de factores antiangiogénicos, dando como resultado una escasa vascularización y estancamiento de suministros de oxígeno.



6. Combinación de hiperplasia intestinal y efecto antiangiogénico reduciendo la disponibilidad de nutrientes para el tumor.

7. Efecto citotóxico sobre las células tumorales (Castillo y Abdullaet, 2005).

A nivel bioquímico y molecular del efecto antitumoral de las lectinas, se proponen diferentes mecanismos de acción. Un mecanismo describe la unión de lectinas a moléculas de adhesión de la superficie (epCAM) que participan en una gran variedad de señales de traducción que son importantes para la regulación celular. Un segundo mecanismo sugiere que la lectina se internaliza en la célula y afecta el proceso celular fundamental para la división celular. Un tercer mecanismo explica que la lectina induce apoptosis por diversas vías: (Castillo y Abdullaet, 2005)

1. Dependiente de la activación intracelular de la caspasa 8 requiriendo la internalización de la lectina e involucra su actividad inhibitoria ribosomal y de la síntesis de proteínas.

2. A través de la activación de la caspasa-3 y la ruptura de PARP.

3. Por la activación de Bax (acelerador de apoptosis) y la inhibición tanto de Bcl-2 (supresor de apoptosis) como de la telomerasa.

En estudios más recientes se ha descrito que las lectinas inducen la muerte celular apoptótica a través de la desfosforilación de Akt en correlación con la inhibición de la actividad de la telomerasa y la activación de la caspasa-3. Con todos estos estudios se sugiere que las lectinas disparan cambios moleculares que dan como resultado la inhibición del crecimiento celular y la inducción de la muerte celular apoptótica de células cancerígenas. Por otro lado, cabe mencionar que también se han reportado trabajos en donde las lectinas aumentan la sensibilidad de las células tumorales a drogas, y su utilización en el diseño de inmunotoxinas para el tratamiento del cáncer (Castillo y Abdullaet, 2005).



2 Justificación.

El CCR es la 3ª causa de cáncer a nivel mundial; en los países desarrollados se calcula que es la 2ª causa de mortalidad por cáncer si consideramos solo aquellos que afectan ambos sexos, además estudios epidemiológicos indican que el 50% de los cánceres que aparecen a partir de los 70 años tienen localización colorectal.

En la formación y desarrollo de lesiones preneoplásicas y neoplásicas en el colon y recto, existen factores etiológicos que se explican como resultado de procesos de biotransformación, activación o eliminación de compuestos químicos que se han ingerido por diferentes vías al organismo como la 2,4 Dinitrofenilhidrazina, además se ha incluido otras razones como el excesivo consumo de grasa animal y carne, la falta de ingesta de alimentos vegetales ricos en fibra especialmente crucíferas, el consumo de alcohol, y tabaquismo. No cabe duda que como cualquier otro tipo de cáncer, el CCR tiene un componente génico definitorio.

Por todo lo anterior ha surgido la necesidad de crear nuevos modelos experimentales en animales como una herramienta esencial en pruebas preclínicas que ensayan nuevas terapias *in vivo*, por ello la formación de lesiones preneoplásicas tales como edemas, congestión e infiltraciones celulares, pueden ofrecer la oportunidad de observar las alteraciones moleculares más tempranas que conducen al CCR por eso constituye una herramienta excepcional en el estudio de inducción/prevención.

La evidencia sugiere que los constituyentes de los alimentos se han asociado en una disminución en el riesgo de cáncer de colon, y es quizá más fuerte en lo relativo a consumo de vegetales. De entre los cuales la *Vicia faba* que pertenece a la familia de las leguminosas, comúnmente conocida como haba; se ha considerado de alto valor nutritivo, pudiéndose caracterizar por un alto contenido de proteínas, vitaminas del grupo B, minerales, fibra y muchos otros compuestos definidos como no nutrientes desde hace algún



tiempo, los estudios han demostrados que algunos mitógenos como las proteínas, derivadas del haba, pueden actuar sobre el sistema inmunológico modulando su respuesta, y el descubrimiento de sus actividades antitumorales han llamado la atención; por lo cual la utilizaremos para estudiar sus propiedades anticancerosas en el daño inducido a los ratones en el modelo diseñado para crear criptas aberrantes, debido a que de ser así se podría proponer como tratamiento para la mejora o prevención del CCR.



3 Hipótesis.

- Si el extracto protéico de *Vicia faba* tiene propiedades anticancerígenas entonces disminuirá el daño causado a las células intestinales producido por la 2,4 Dinitrofenilhidrazina; afirmando su efecto adjudicado a las proteínas de dicha leguminosa.

4 Objetivos generales.

- Estudiar la inhibición de las lesiones pre y neoplásicas en el colon por medio de un extracto protéico de Vicia Faba.

4.1 Objetivo particulares:

- Determinar el efecto de la 2,4 Dinitrofenilhidrazina, para observar el progreso de la formación de lesiones precancerosas que alteran la morfofisiología de las células colónicas, mediante la inducción por vía intraperitoneal a ratones Balb C observando microscópicamente los órganos dañados, a través de una tinción simple de azul de metileno y H.E.
- Estudiar el potencial de remisión de un extracto protéico de *Vicia faba*, en ratones previamente sometidos a la formación de lesiones preneoplásicas, utilizando como vía de administración la intraperitoneal a diferentes concentraciones.



5. Materiales y metodología.

- Cajas de policarbonato para animales con rejilla de acero inoxidable
- Bebederos
- Cama sanitaria (estéril)
- Alimento para roedores (Nutricubos)
- Jeringa de 1ml
- Aguja de 25gx 16mm
- Estuche de disección (Tijeras, bisturí, pinzas, etc.)
- Guantes
- Cubrebocas
- Vasos de precipitados
- Cajas petri
- Pipetas graduadas de 1,2,5 y 10 ml

Reactivos:

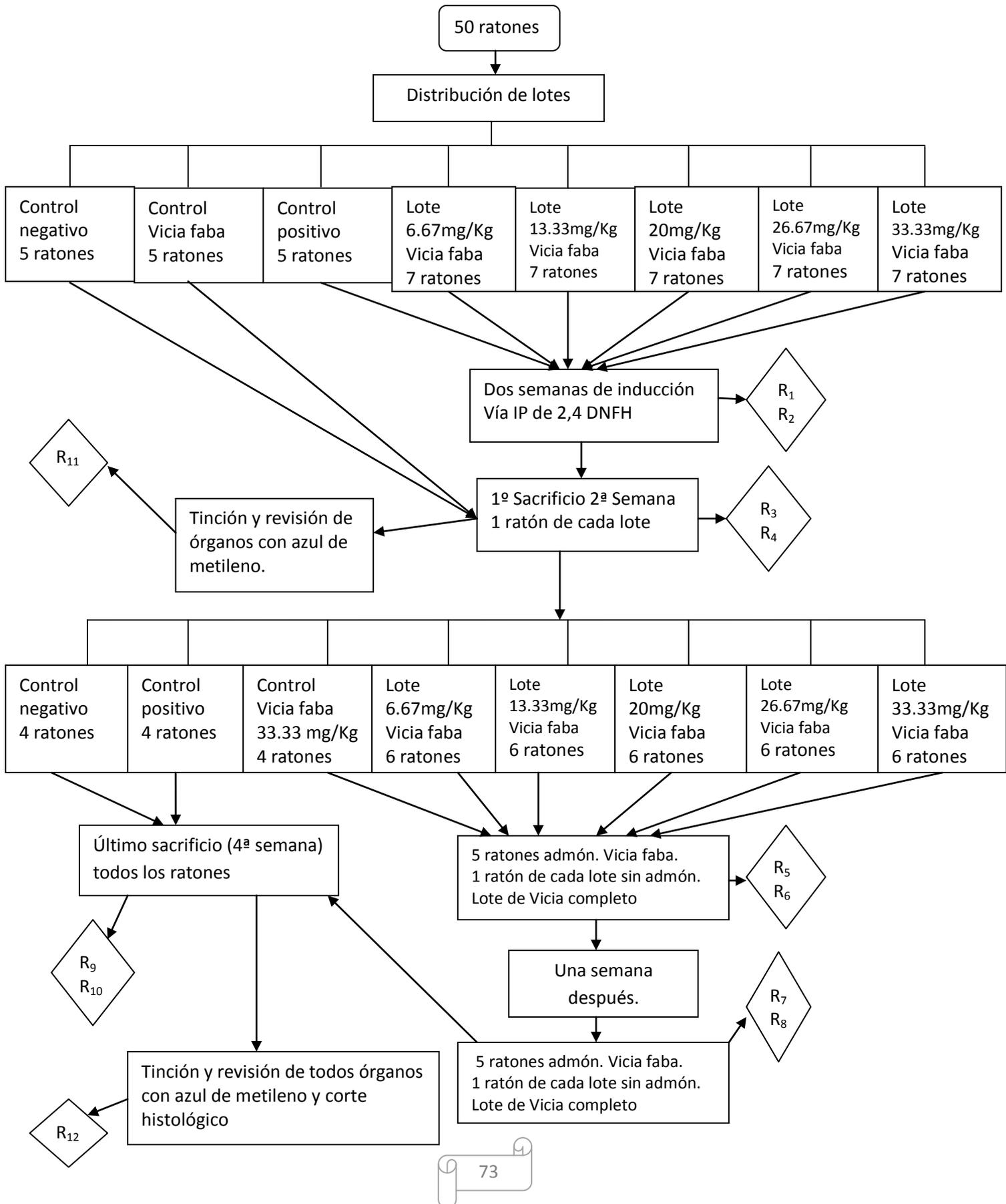
- ❖ 2,4 Dinitrofenilhidrazina
- ❖ Metocarbamol (Robaxisal)
- ❖ PBS/ Formaldehído 10%
- ❖ Solución Salina Fisiológica NaCl 0.9%
- ❖ Etanol 70%
- ❖ Azul de metileno

Biológicos:

- 50 ratones Balb C (machos 30-40g) provenientes del bioterio y la unidad de aislamiento de la UIM FESC.
- Extracto protéico de *Vicia faba* liofilizado. (6.67mg/Kg, 13.33mg/Kg, 20mg/Kg, 26.67mg/Kg y 33.33mg/Kg)



Figura. 16. Metodología.





Para este trabajo se busco la estandarización de un modelo para la inducción de CCR con el fin de probar sustancias anticancerígenas para la remisión del mismo. Basándonos en un modelo de rata con dosis de 21mg/Kg de hidrazina administrada vía intraperitoneal y 100mg/Kg de metocarbamol vía oral, se comenzó a trabajar en el modelo, pero con estas dosis el daño era tan severo en el tejido, que dificultaba la revisión de éste, por lo que se tuvieron que realizar 7 ensayos con variaciones de dosis, las cuales iban en disminución, además se probaron diferentes tiempos de administración; encontrando que la dosis adecuada para el metocarbamol donde sensibilizaba a la célula sin crear un daño importante era a 25mg/Kg y para que la hidrazina hiciera el efecto deseado sin destruir el tejido se llego a la conclusión de 10mg/Kg, en periodos de 4 días de administración contra tres días de descanso por 15 días para el inducción del cáncer.

Quedando así el siguiente modelo: se administró por vía intraperitoneal 10mg/kg de 2,4-Dinitrofenilhidrazina y 25mg/kg de metocarbamol por vía oral, en lapsos de 4 días y 3 días sin administración a casi todos con excepción de control negativo y el de solo V.f., por un periodo de 15 días. Después se llevo acabo el primer sacrificio para comprobar el daño preneoplásico del tejido, con un ratón de cada lote, con lo cual se formó el denominado lote prueba. Una vez comprobado esto se procedió a la inmediata administración de la *Vicia faba* a la mayoría de los lotes a las dosis indicadas que corresponden a los llamados 6.67mg/Kg, 13.33mg/Kg, 20mg/Kg, 26.67mg/Kg, 33.33mg/Kg y a solo V.f.; de cada uno de estos se dejo un ratón sin administración de V.f. que servirían de comparación para saber si el tejido por si solo se lograba recuperar y estos formaron el correspondiente lote llamado "sin V.f."; después de una semana se llevo a cabo la segunda administración por vía intraperitoneal de V.f., los lotes control positivo y negativo se dejaron sin administración de V.f. A las cuatro semanas se llevo a cabo el segundo sacrificio de todos los animales



restantes. De cada ratón se extrajo el intestino grueso y fue tomada una porción de este para la tinción con azul de metileno con el cual se reviso las características morfológicas tales como las vellosidades, los pliegues del intestino, la formación de FCA y pólipos; también se realizó la técnica de tinción H.E. que permitió la revisión a detalle de cada una de las tunicas del intestino y revelar el grado de congestión, infiltración y edema que tenía cada una.

Listado de residuos.

R1, R5, R7 Jeringas basura común.

R2, R6, R8 agujas bote rojo de punzocortantes RPBI de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2001-RPBI.

R3, R9 Cadáver de ratón bolsa amarilla para incineración

R4, R10 Navaja de bisturí bote rojo de punzocortantes RPBI de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2001-RPBI.

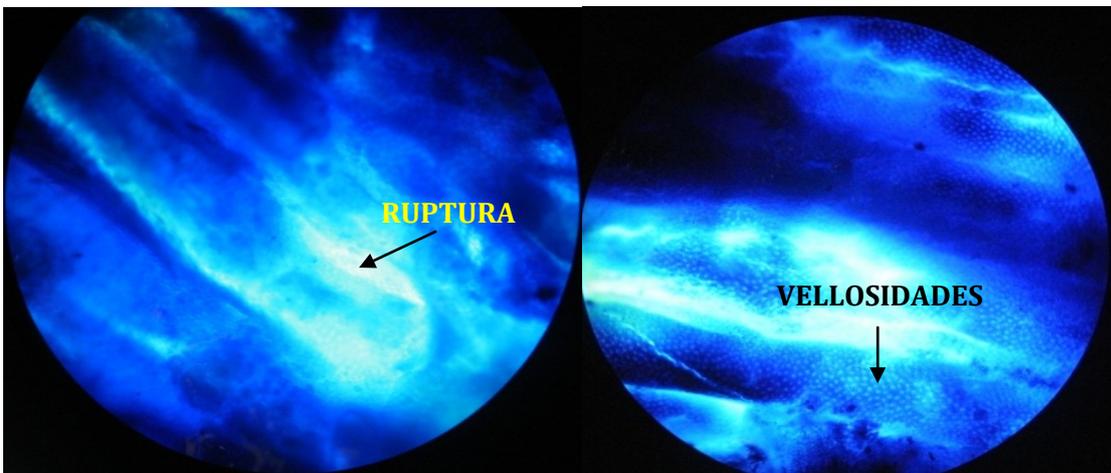
R11 y R12 sobrante de azul de metileno, contenedor de residuos para el colorante, indicando sus propiedades.



6. Resultados.

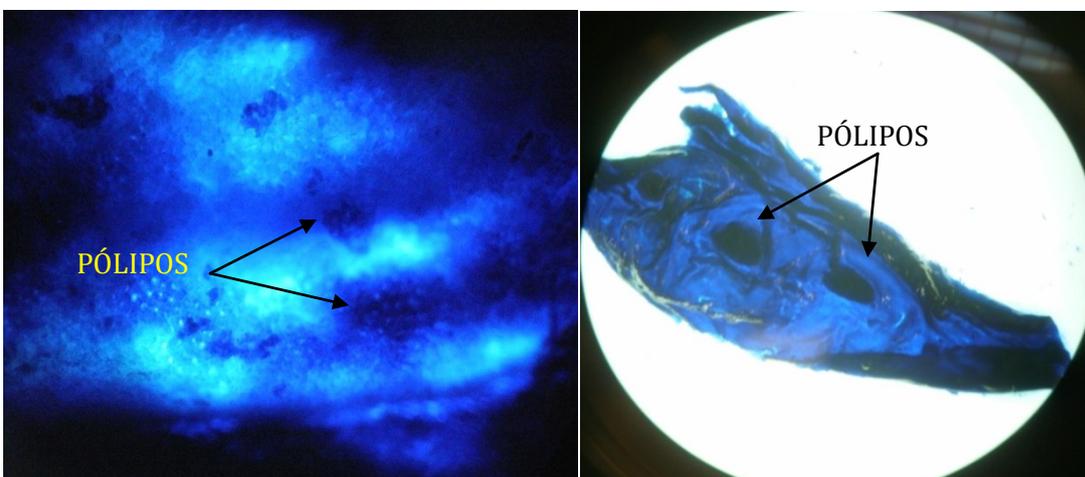
Lote prueba.

Tinción azul de metileno del intestino grueso y observado con 10x.



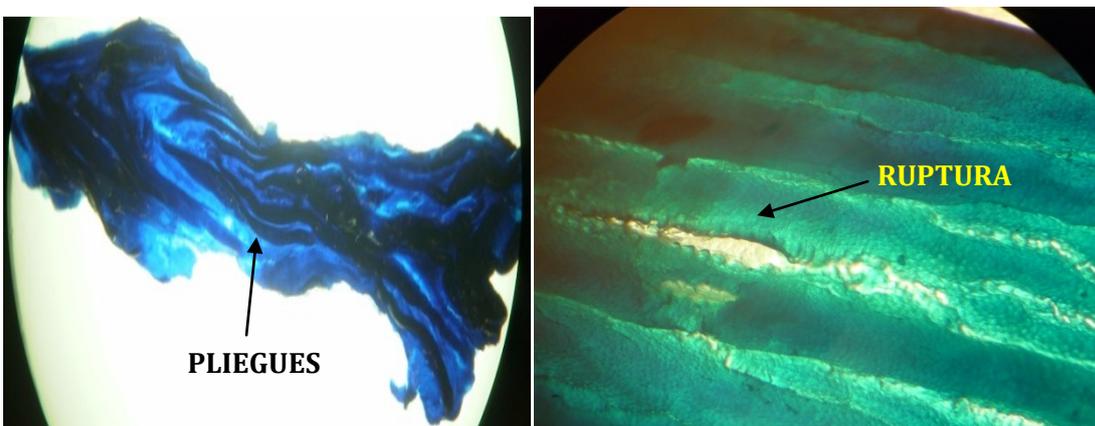
1.

2.



3.

4.



5.

6.



Lote prueba corte histológico.

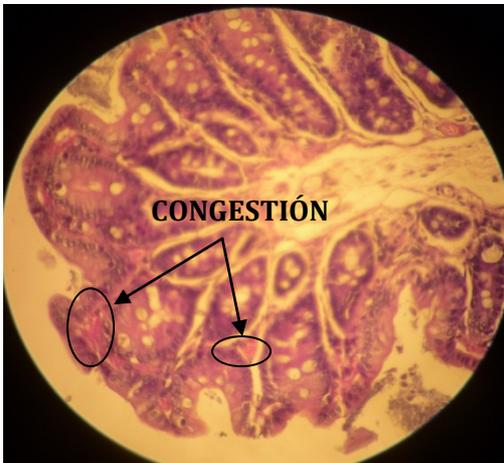
Tinción H.E. del intestino grueso, observado a 40x.



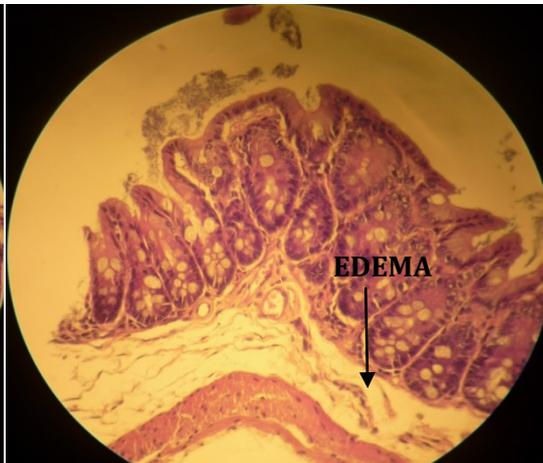
1.



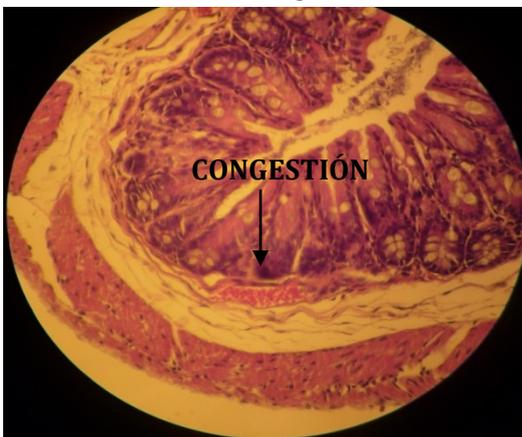
2.



3.



4.



5.



6.



Interpretación de las fotos con azul de metileno.

Fotos 1,2 y 3. Se aprecian las vellosidades intestinales, sin embargo ya se comienza a ver afectada, puesto que hay masas irregulares en el tejido que pueden ser la formación de pólipos. El tejido se presenta delgado y delicado, lo que lo hace propenso a las rupturas.

Fotos 4 y 5. El tejido muestra los pliegues normales, sin embargo hay presencia de pólipos y su manipulación fue difícil ya que el tejido tendía a contraerse.

Foto 6. Esta imagen muestra ruptura del tejido, una coloración débil y las vellosidades no se logran apreciar tan bien.

En general este lote estuvo muy teñido, salvo por algunos segmentos pequeños, era susceptible a la ruptura pues era muy frágil y hay comienzo de formación de pólipos.

Interpretación de las fotos de H.E.

Fotos 1 y 5. En la túnica muscular se observan infiltraciones, aunque esta completa. La submucosa presenta edema y en la mucosa se observa una congestión de un vaso sanguíneo. Y las vellosidades se ven normales.

Foto 2. En esta foto se observa en la túnica submucosa edema y en la mucosa presencia de congestión en vasos sanguíneos, además de que resalta la proliferación de moco intestinal.

Foto 3. Esta es una foto de vellosidades donde claramente se observan congestionados los vasos sanguíneos.

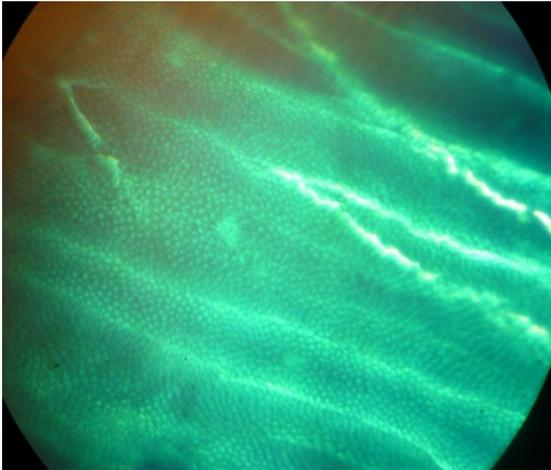
Foto 4. En esta lo que resalta, son las infiltraciones de la túnica muscular y el edema presente en la túnica submucosa.

Foto 6. Lo más representativo de esta imagen es el edema en la túnica submucosa y la congestión de vasos sanguíneos en las vellosidades.

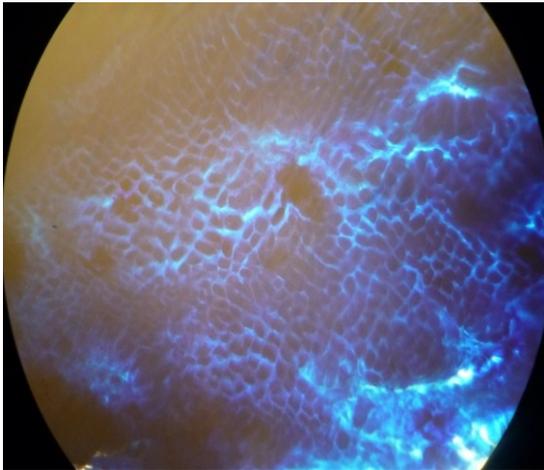


Lote control (-).

Tinción azul de metileno del intestino grueso y observado con 10x.



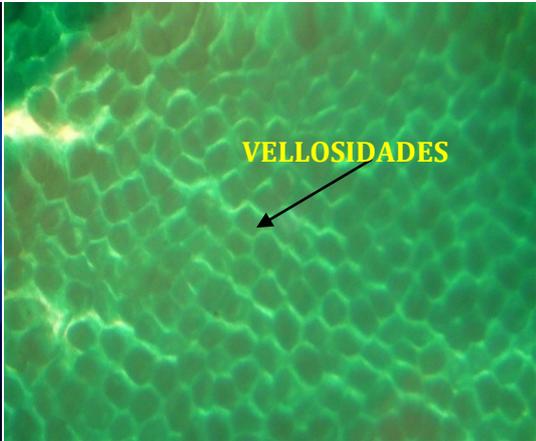
1.



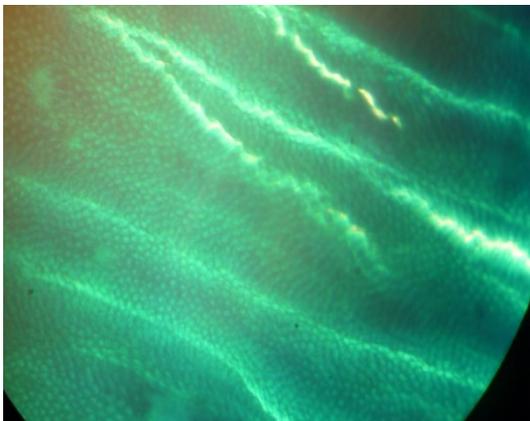
2.



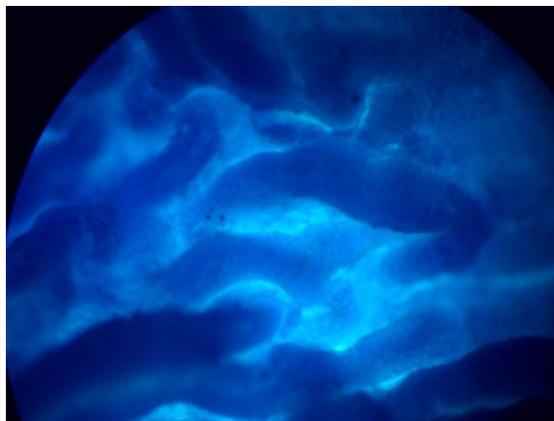
3.



4.



5.



6.

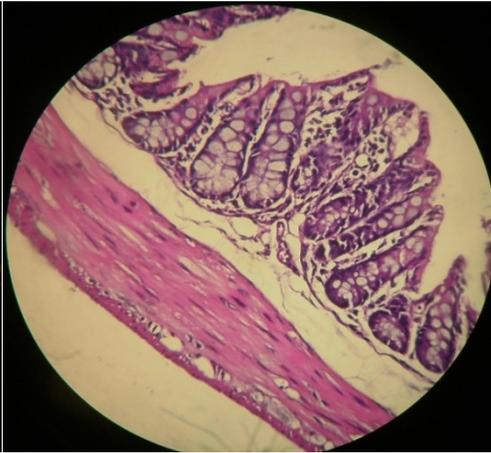


Lote control (-) corte histológico.

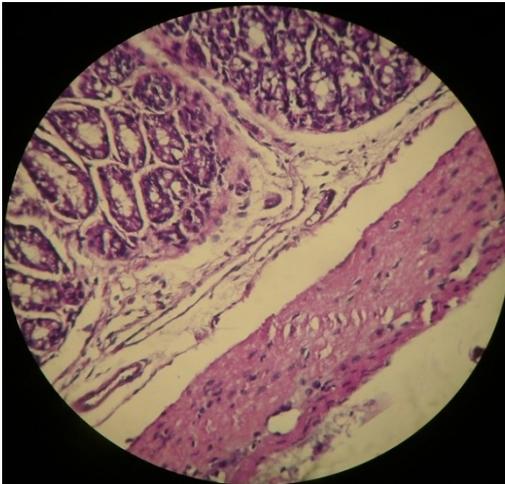
Tinción H.E. del intestino grueso, observado a 40x.



1.



2.



3.



4.



5.



6.



Interpretación de las fotos con azul de metileno.

En general el lote se ve muy sano, se logran apreciar las vellosidades enteras sin ningún problema como fotos 2 y la 4, conserva sus pliegues normales apreciables en las fotos 3 y 6, sin embargo en la 1 y 5 se ven ligeras rupturas debido a la manipulación, pues el tejido era fuerte y resistente.

Interpretación de las fotos con h. e.

Se aprecia en las imágenes un tejido bastante sano, sin alteraciones importante, no hay presencia de moco, hay infiltraciones normales, no hay congestión de vasos sanguíneos, las vellosidades están completas y con morfología normal.

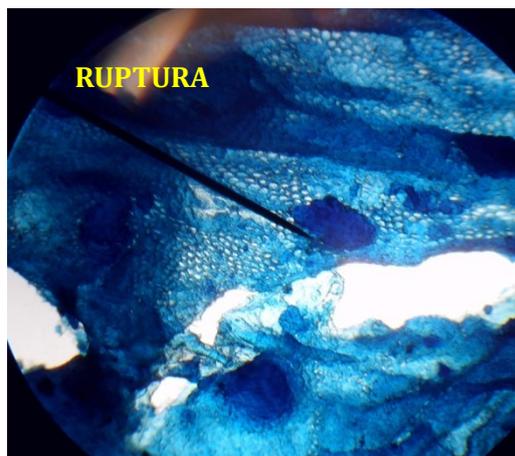


Lote control (+) (2,4-DNFH y metocarbamol).

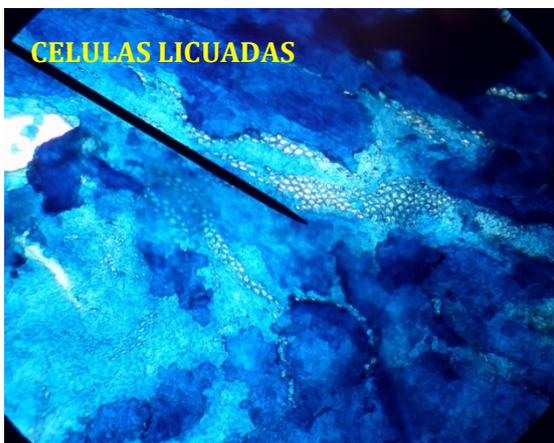
Tinción azul de metileno del intestino grueso y observado con 10x.



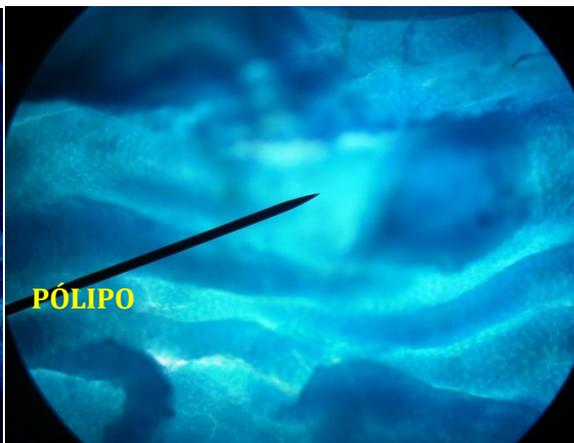
1.



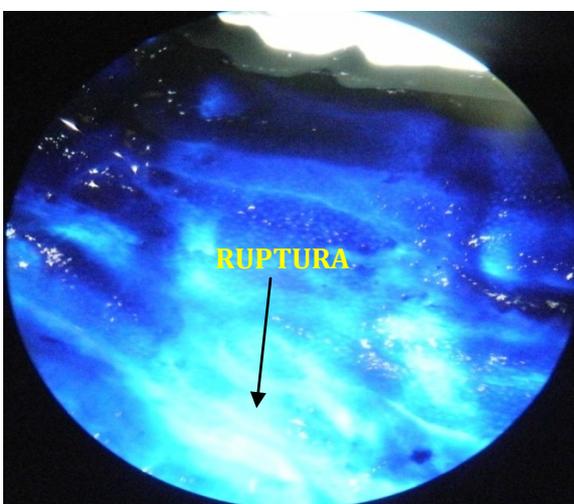
2.



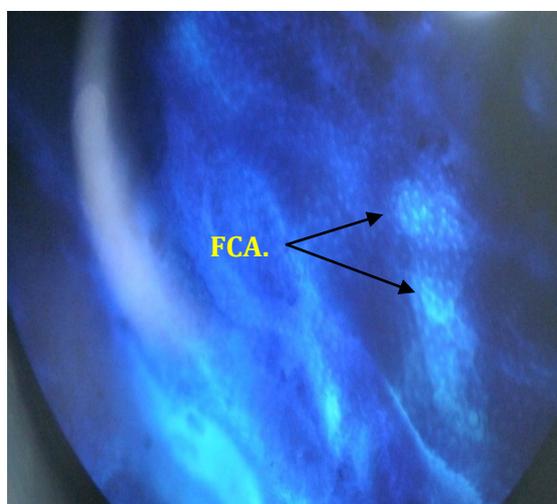
3.



4.



5.

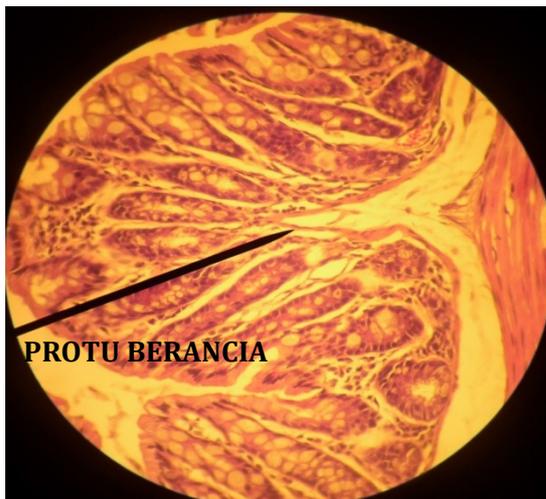


6.



Lote control (+) (2,4-DNFH y metocarbamol) corte histológico.

Tinción H.E. del intestino grueso, observado a 40x.



1.



2.



3.



4.



5.



6.



Interpretación de las fotos con azul de metileno.

En este lote el tejido era delgado y frágil y el daño es evidente como se muestra en la fotos 2 y 3 donde las rupturas son graves, en todas las fotos hay presencia de pólipos, las vellosidades están casi en su totalidad licuadas, hay muy pocos pliegues, en la foto 5 la tinción es dispareja debido al daño tan severo en tejido y en la foto 6 se aprecian dos FCA. La tinción en todos los tejidos fue intensa.

Interpretación de las fotos con H.E.

Foto 1. En esta lo más apreciable es la expansión de la túnica submucosa y un poco de la muscular.

Foto 2. Esta muestra el grupo, donde hay ruptura de vellosidades.

Foto 3. La túnica muscular se aprecia con infiltraciones y en las vellosidades hay un poco de congestión.

Foto 4. Hay infiltración en todas las tunicas hay presencia de edema en la submucosa y hay un poco de congestión en las vellosidades.

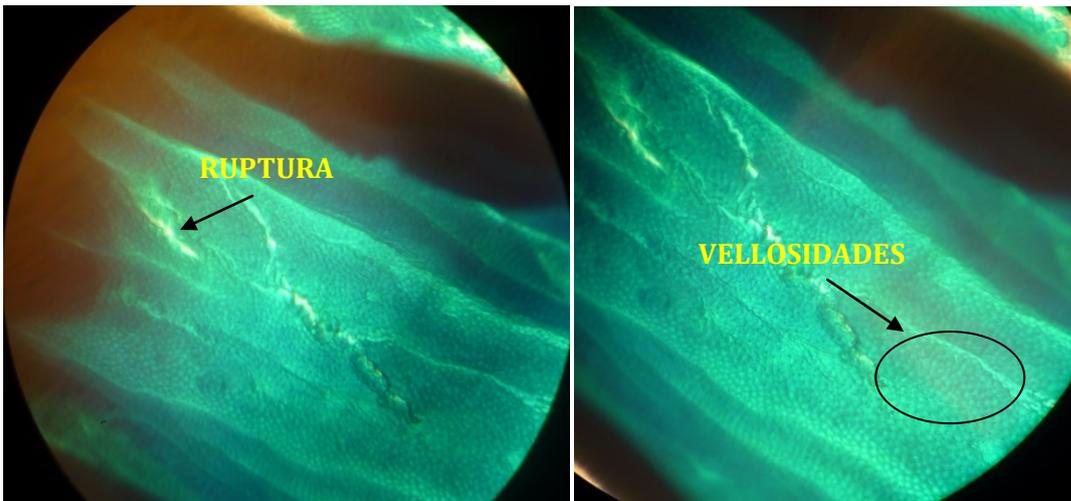
Foto 5. En esta hay infiltración en la túnica muscular y edema en la túnica submucosa.

Foto 6. Las vellosidades se ven cortas y sin continuidad.



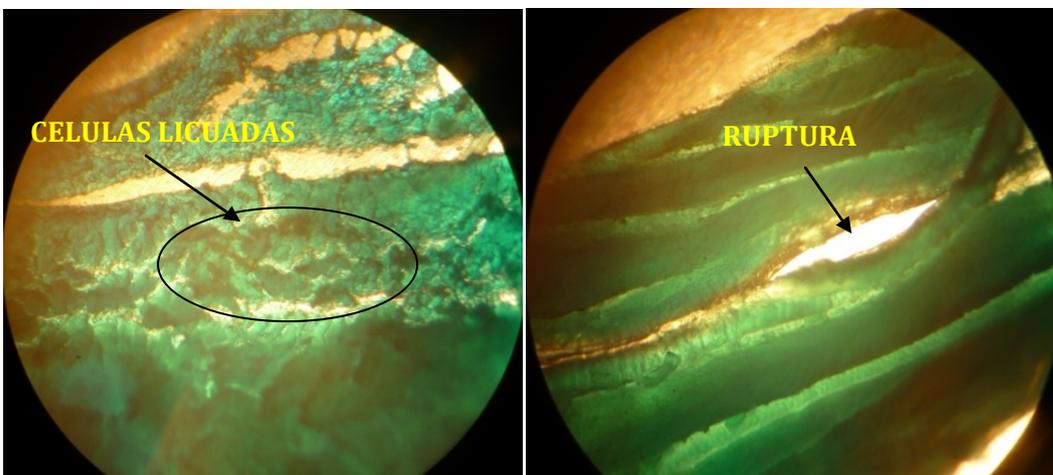
Lote 6.67mg/Kg V.f.

Tinción azul de metileno del intestino grueso y observado con 10x.



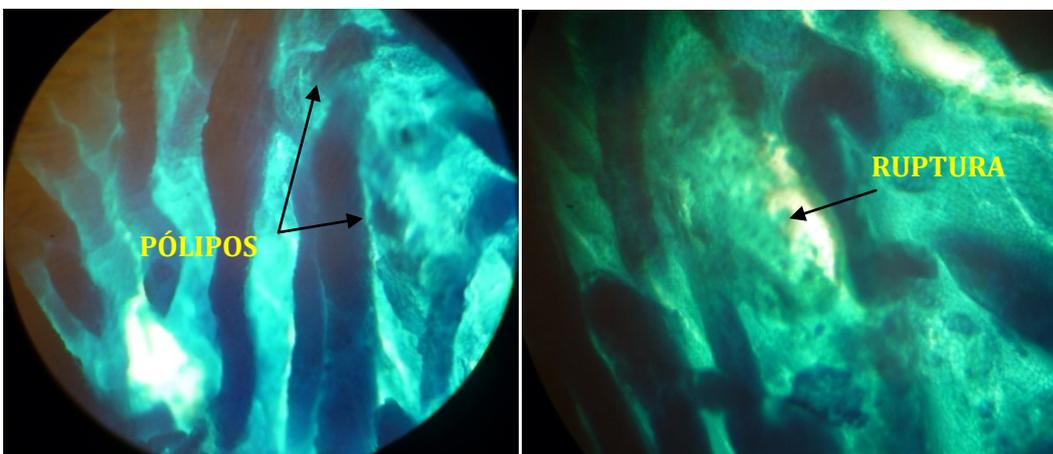
1.

2.



3.

4.



5.

6.



Lote 6.67mg/Kg V.f. corte histológico.

Tinción H.E. del intestino grueso, observado a 40x.



1.



2.



3.



4.



5.



6.



Interpretación de las fotos con azul de metileno.

Fotos 1 y 2. Ya se notan las vellosidades, hay ligeras rupturas, pero casi no hay pliegues en éstas.

Fotos 3 y 4. Aquí lo que más destaca son rupturas, la licuefacción de las células y la falta de pliegues normales.

Fotos 5 y 6. Hay presencia de pólipos, las células se ven licuadas y hay rupturas.

Este lote destaca por que la tinción fue débil, y no se aprecia mucha mejoría.

Interpretación de las fotos con H. E.

Fotos 1 y 2. En estas fotos lo más representativo es la congestión presente en vellosidades y la túnica mucosa, no hay presencia de edema y las infiltraciones son normales.

Foto 3. Hay una congestión severa en la túnica mucosa, hay un ligero edema.

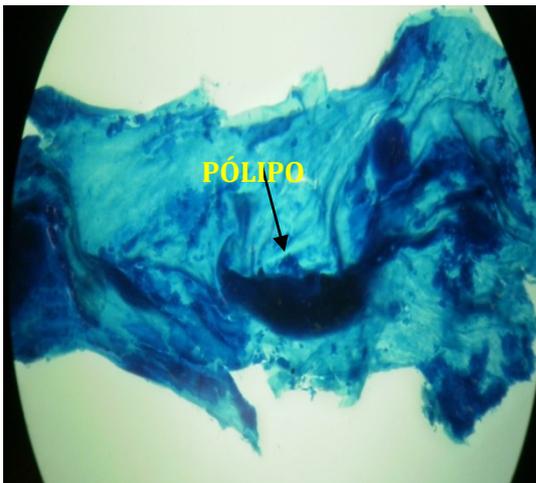
Foto 4. Lo más representativo de ésta es la formación de moco y la presencia de edema en la túnica submucosa.

Fotos 5 y 6. En la túnica muscular hay infiltraciones importantes, en la submucosa se observa edema, en las vellosidades y en la mucosa hay un poco de congestión.

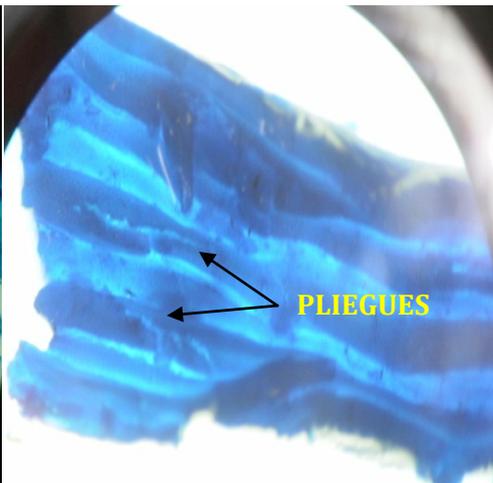


Lote 13.33mg/Kg V.f.

Tinción azul de metileno del intestino grueso y observado con 10x.



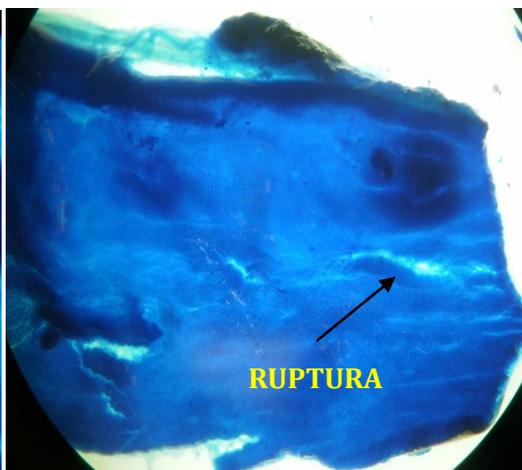
1.



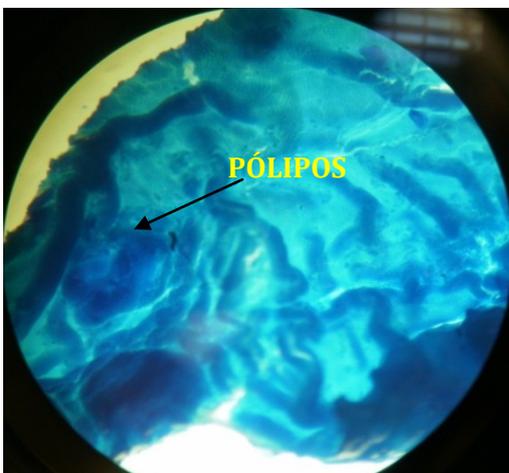
2.



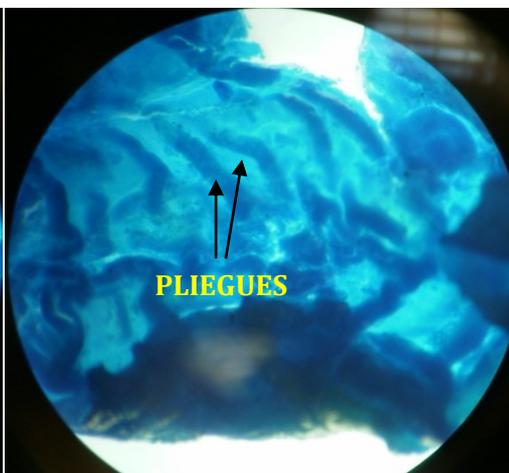
3.



4.



5.

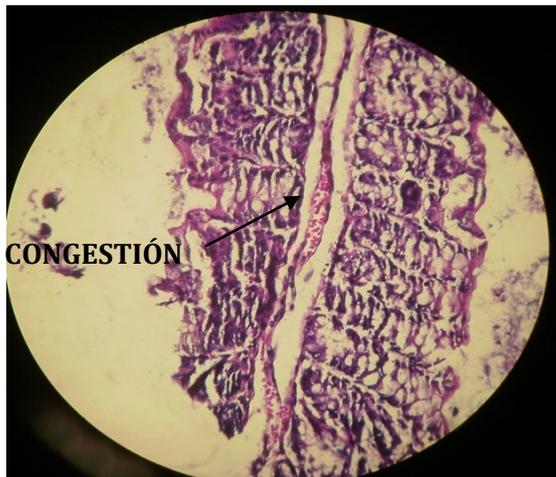


6.



Lote 13.33mg/Kg V.f. corte histológico.

Tinción H.E. del intestino grueso, observado a 40x.



1.



2.



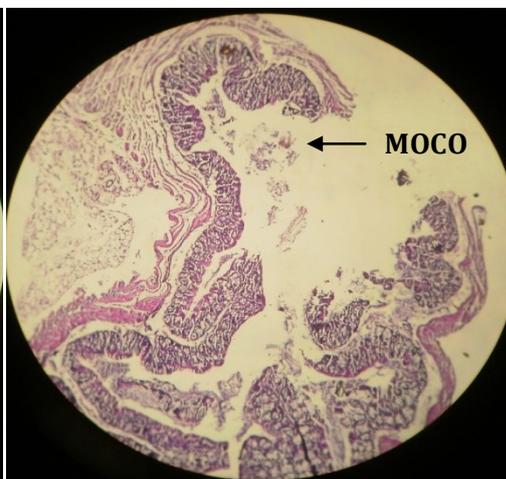
3.



4.



5.



6.



Interpretación de las fotos con azul de metileno.

Fotos 1 y 4. En éstas, casi no se ven pliegues, hay pólipos, tiene rupturas importantes y es frágil en la manipulación.

Fotos 2, 5 y 6. Se comienzan a ver más definidos los pliegues hay presencia de pólipos y con presencia de ligeras rupturas en el tejido.

Foto 3. En esta fotografía predominan los pólipos.

Interpretación de las fotos con H.E.

Foto 1. Aquí se observa congestión entre las vellosidades.

Foto 2. Destaca la fragmentación e infiltración en la túnica muscular, la congestión es muy evidente en la submucosa y entre las vellosidades.

Fotos 3 y 4. Se nota edema en la túnica de la submucosa, congestión en la mucosa y las vellosidades están uniformes y enteras.

Fotos 5 y 6. En la túnica muscular se ve un poco de infiltraciones, hay un poco de edema en submucosa, las vellosidades son uniformes.

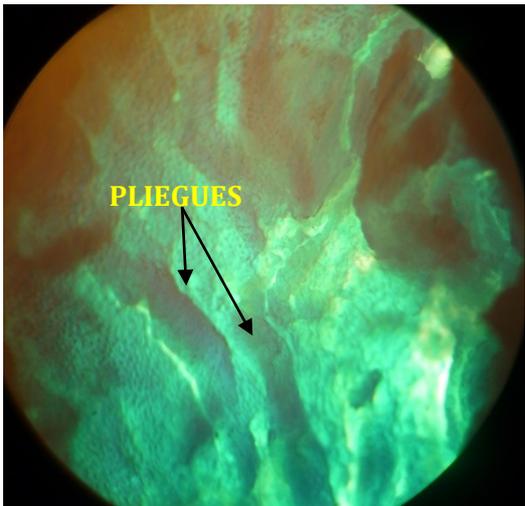


Lote 20mg/Kg V.f.

Tinción azul de metileno del intestino grueso y observado con 10x.



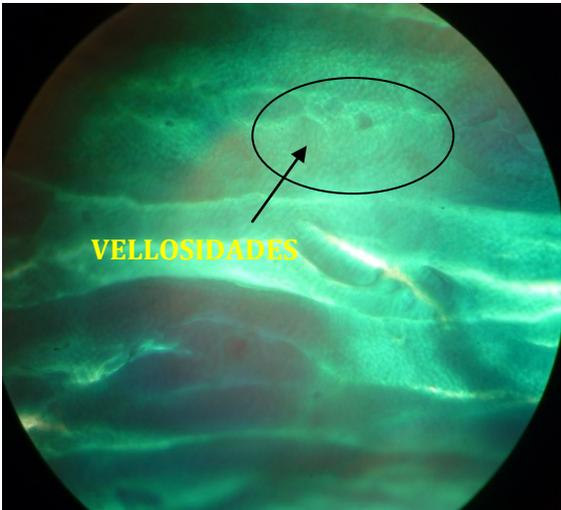
1.



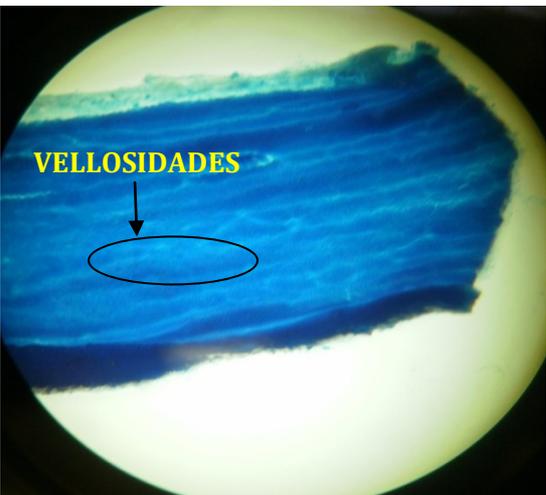
2.



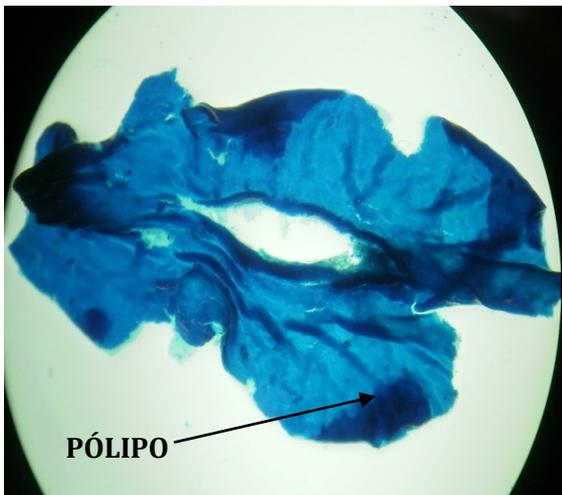
3.



4.



5.

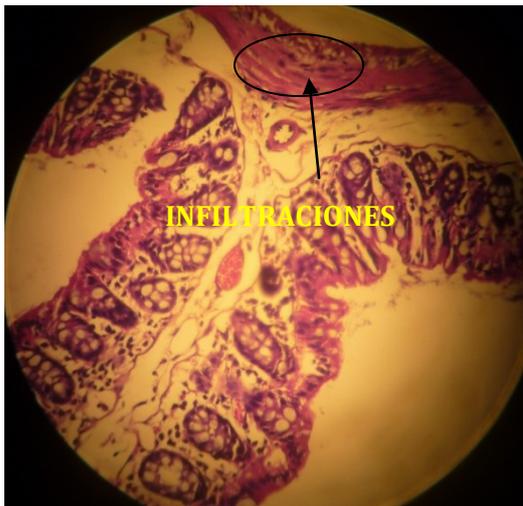


6.

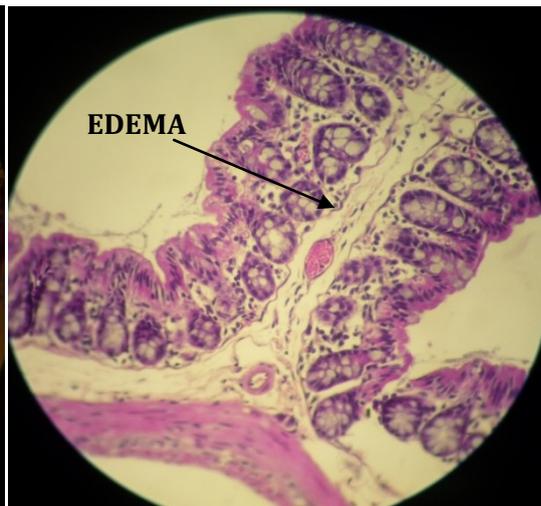


Lote 20mg/Kg V.f. corte histológico.

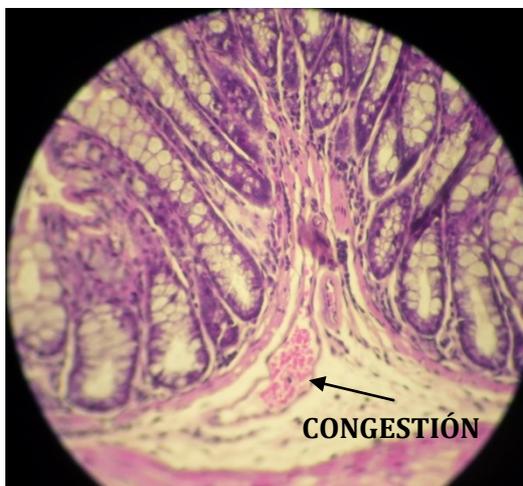
Tinción H.E. del intestino grueso, observado a 40x.



1.



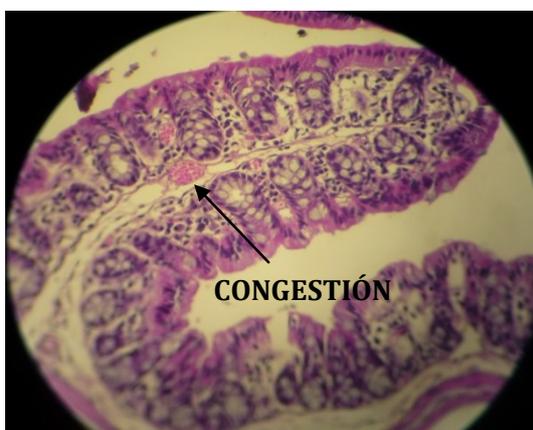
2.



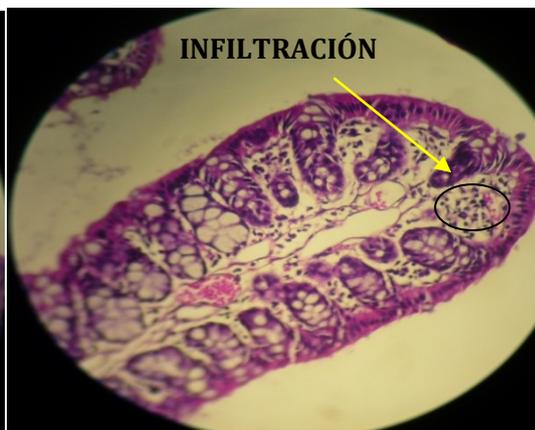
3.



4.



5.



6.



Interpretación de las fotos con azul de metileno.

Fotos 1, 3 y 6. En estas imágenes destacan las rupturas que son muy graves, casi no hay presencia de pliegues, hay un importante daño en las vellosidades, y la presencia de pólipos se ve disminuida.

Fotos 2, 4, y 5. Las vellosidades muestran un comienzo de sanación, ya no hay tantas rupturas y los pliegues son un poco mas regulares.

Interpretación de las fotos con H.E.

Fotos 1 y 2. En la túnica muscular hay infiltración, en la submucosa hay edema y una importante congestión, en las vellosidades la congestión es mas leve.

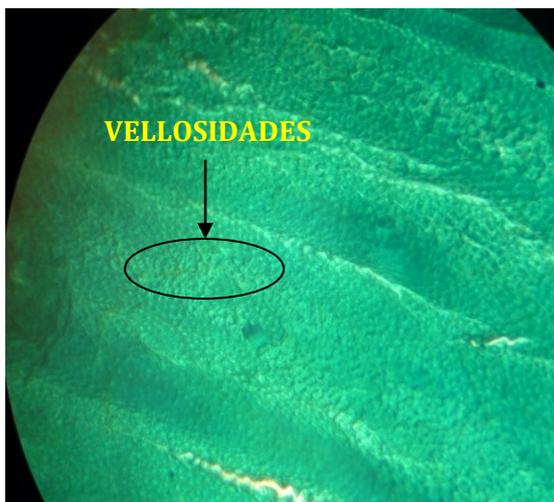
Foto 3. Lo más relevante de esta es la congestión severa presente en la túnica submucosa.

Fotos 4, 5 y 6. Estas son representativas de las vellosidades, en las que se muestran congestión severa.

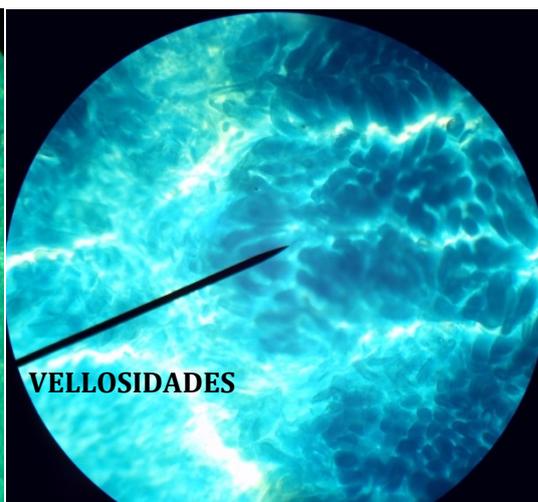


Lote 26.67mg/Kg V.f.

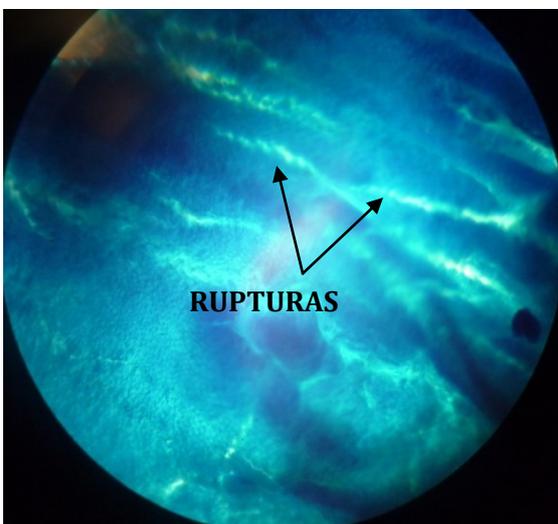
Tinción azul de metileno del intestino grueso y observado con 10x.



1.



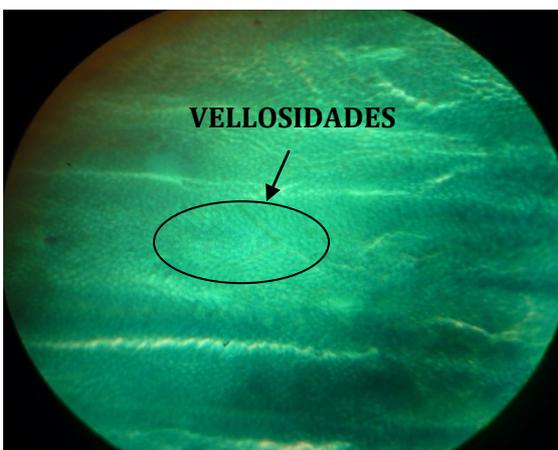
2.



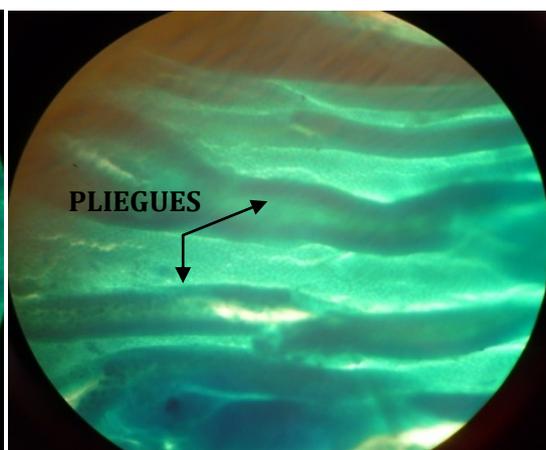
3.



4.



5.

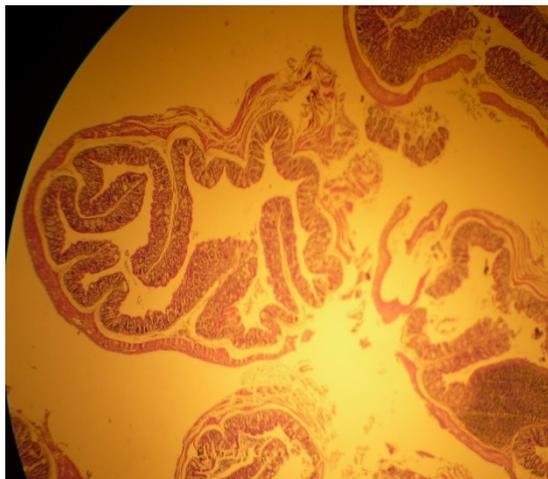


6.

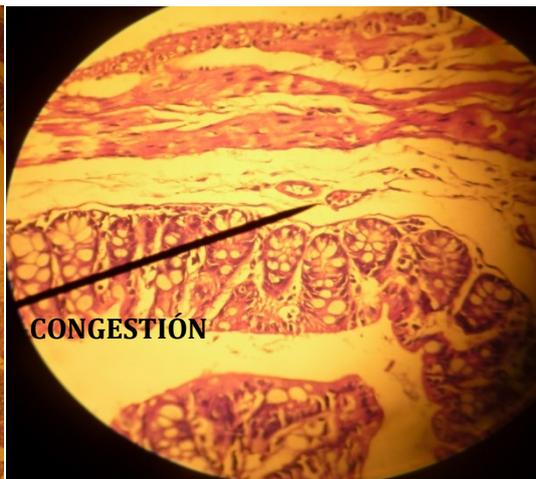


Lote 26.67mg/Kg V.f. corte histológico.

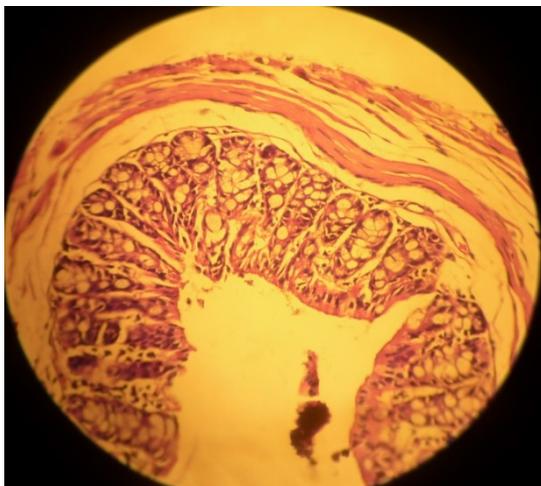
Tinción H.E. del intestino grueso, observado a 40x.



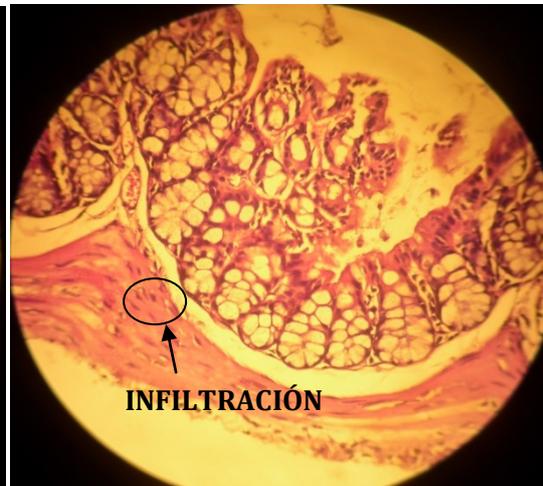
1.



2.



3.



4.



5.



6.



Interpretación de las fotos con azul de metileno.

Fotos 1, 4, 5. El tejido se presenta casi liso, las vellosidades no están licuadas sin embargo no están sanas, no se ven pólipos, ni rupturas, los pliegues no son muy apreciables.

Fotos 2 y 3. En estas imágenes, se ven varias rupturas, las células se ven licuadas, hay uno que otro pólipo y los pliegues no son normales.

Foto 6. Los pliegues comienzan a ser un poco más notorios.

Interpretación de las fotos con H.E.

Foto 1. Corresponde a la representante del lote en donde no muestra lesiones importantes.

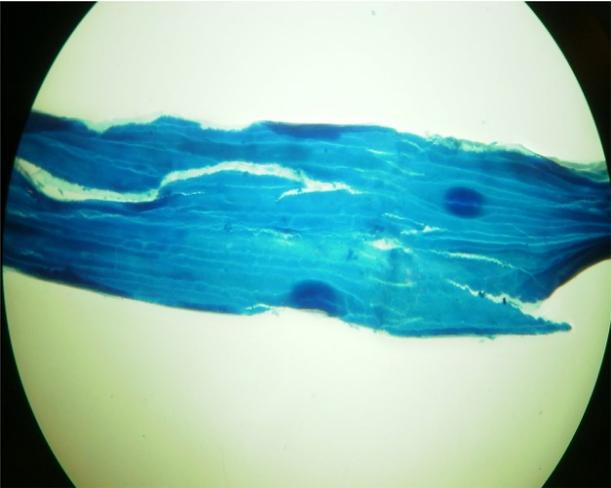
Fotos 2, 3, 4 y 6. Túnica muscular se nota con infiltraciones y edema, en la submucosa hay edema y congestión, las vellosidades son cortas pero uniformes, y se aprecia un poco de congestión entre ellas.

Foto 5. En esta imagen el tejido en general se ve muy sano pues no se ve alteraciones histológicas.

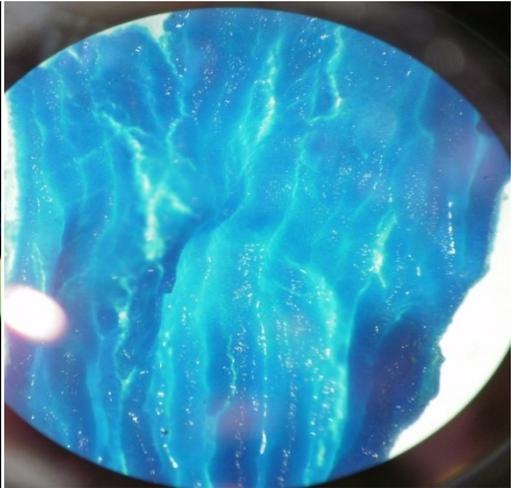


Lote 33.33mg/Kg V.f.

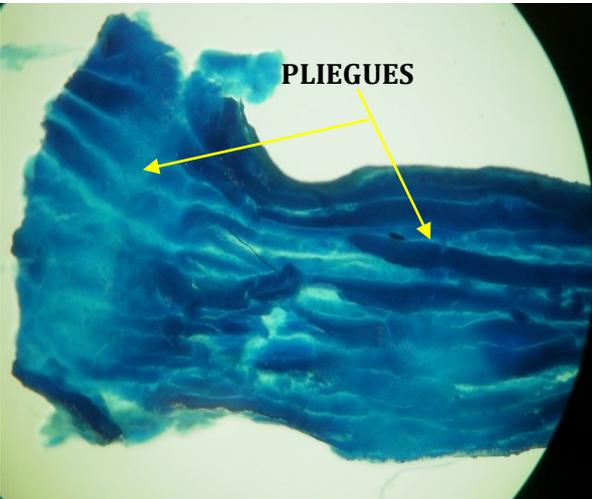
Tinción azul de metileno del intestino grueso y observado con 10x.



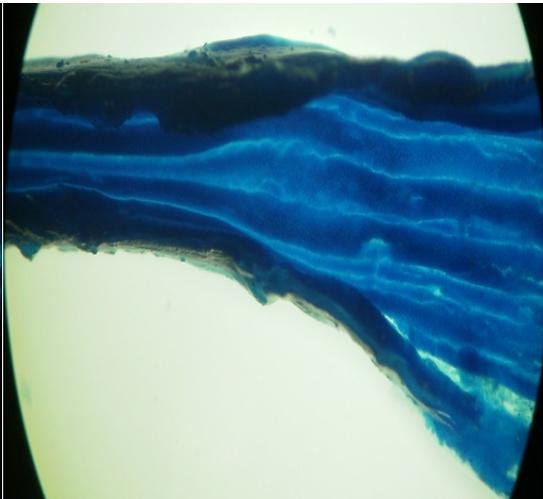
1.



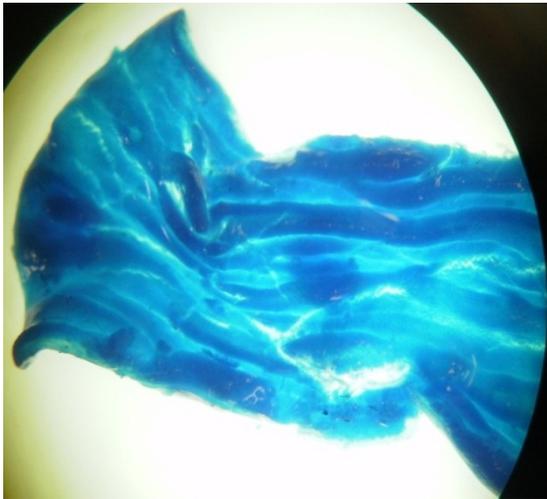
2.



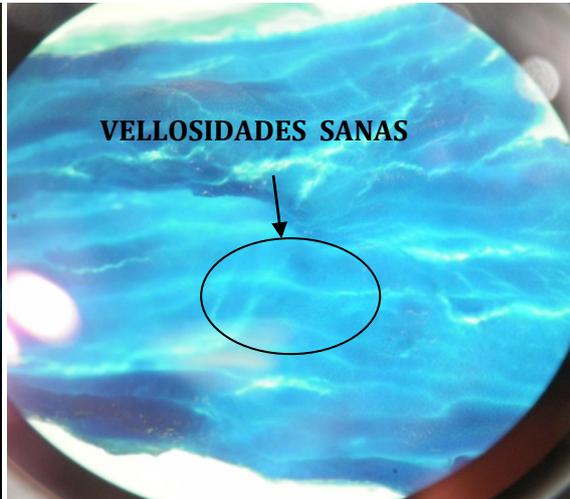
3.



4.



5.

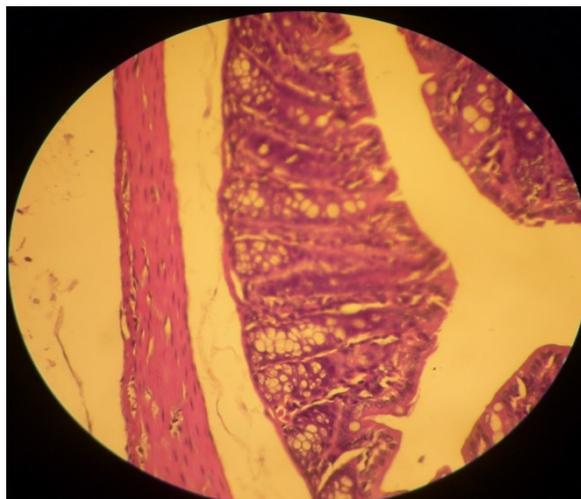


6.

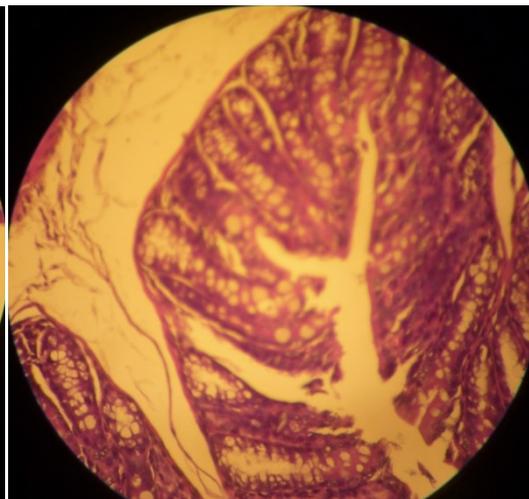


Lote 33.33mg/Kg V.f. corte histológico.

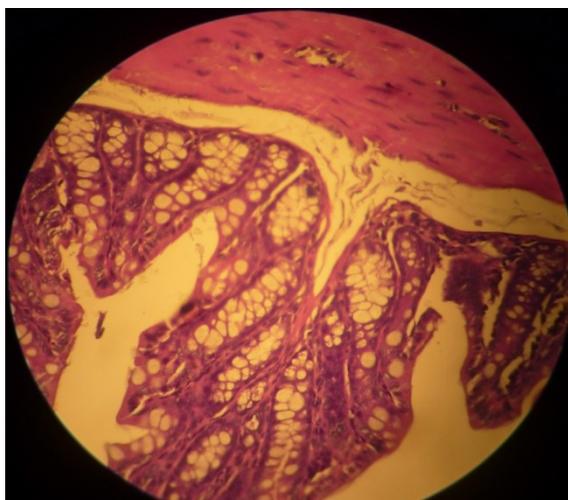
Tinción H.E. del intestino grueso, observado a 40x.



1.



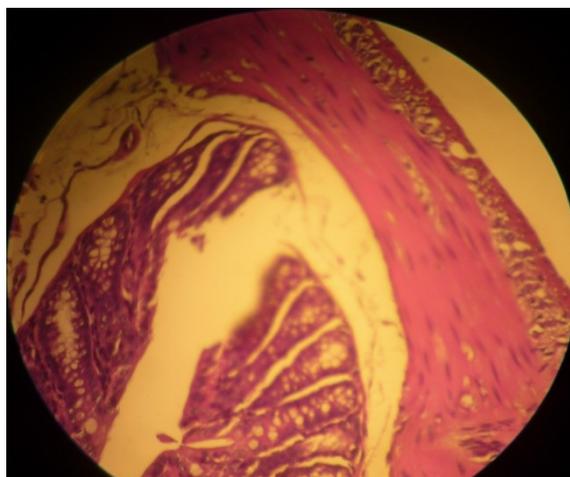
2.



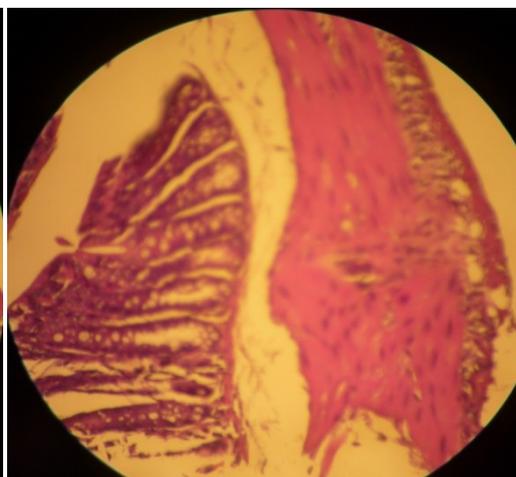
3.



4.



5.



6.



Interpretación de las fotos con azul de metileno.

En general el lote se muestra más homogéneo, las rupturas ya no son tan graves, los pliegues son más constantes y uniformes casi llegando a la normalidad, no se aprecian pólipos, las vellosidades se ven sanas y la tinción es mucho más uniforme.

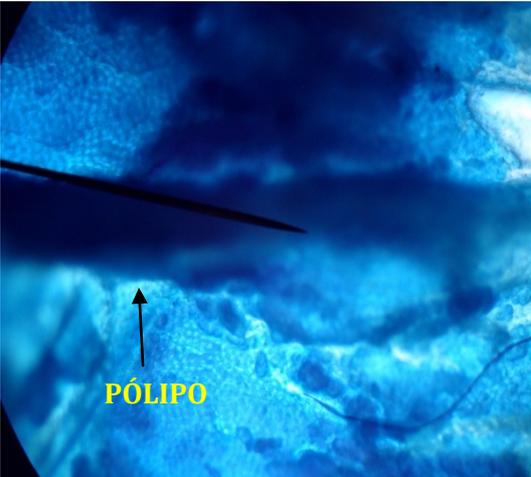
Interpretación de las fotos con H.E.

Las túnicas en general están muy sanas, no hay infiltraciones mas haya de los normal, el edema es poco apreciable, las vellosidades están todas uniformes y completas, no hay congestión.

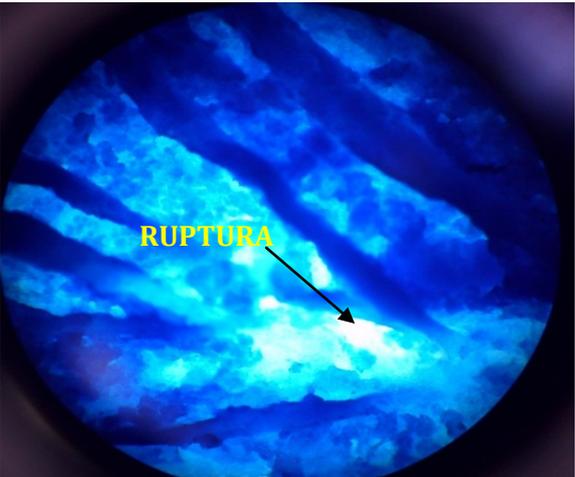


Lote sin V.f.

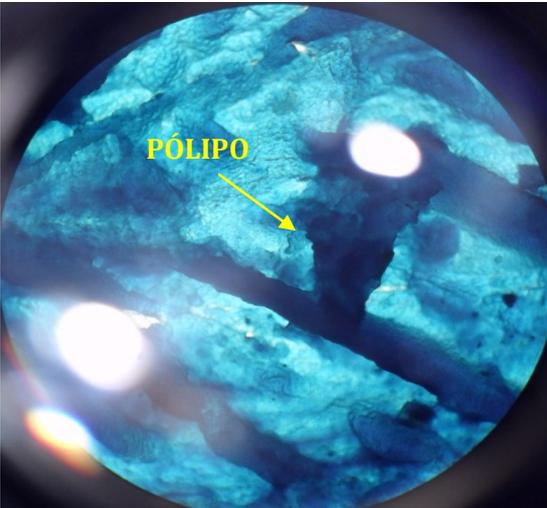
Tinción azul de metileno del intestino grueso y observado con 10x.



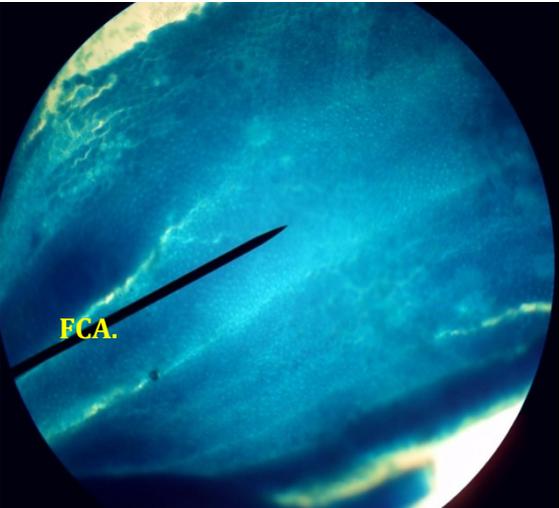
1.



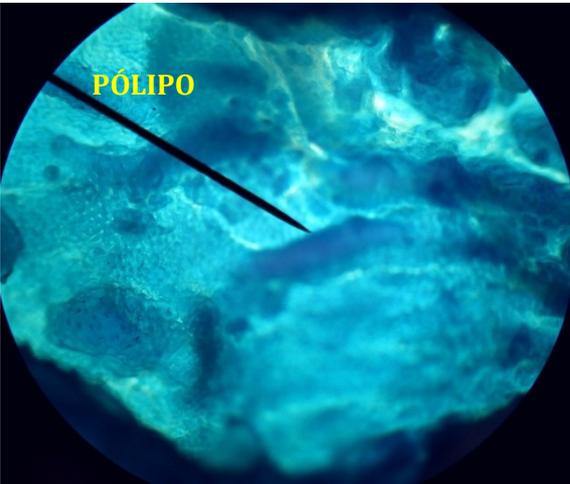
2.



3.



4.



5.

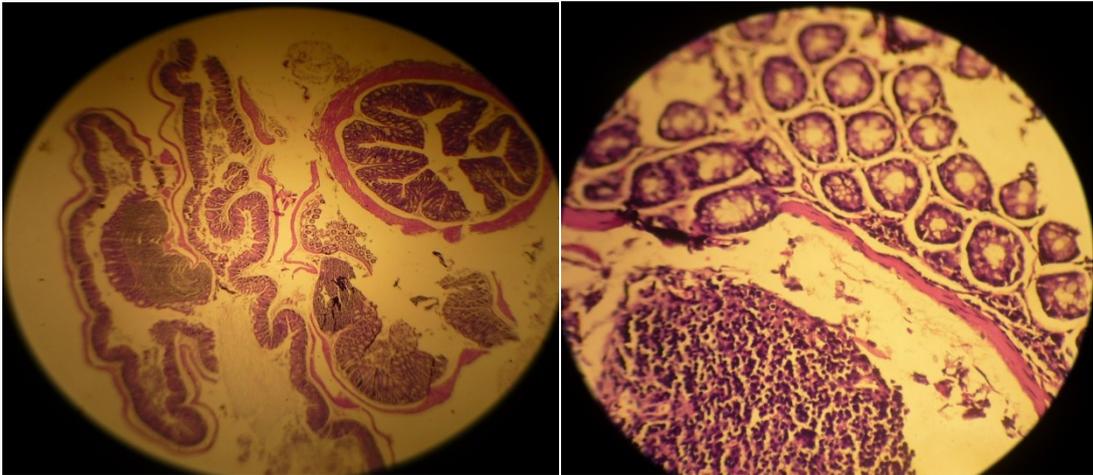


6.



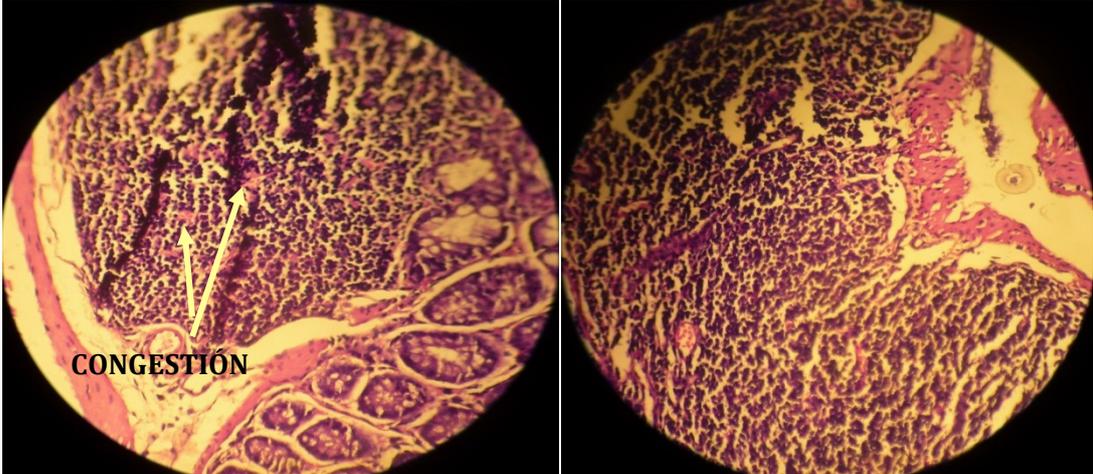
Lote sin V.f. corte histológico.

Tinción H.E. del intestino grueso, observado a 40x.



1.

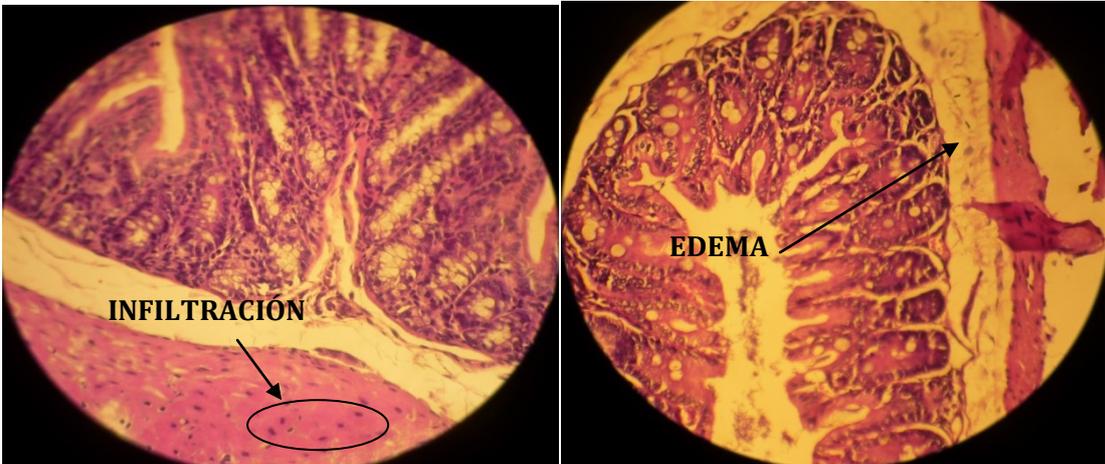
2.



CONGESTIÓN

3.

4.



INFILTRACIÓN

EDEMA

5.

6.



Interpretación de las fotos con azul de metileno.

En general el tejido del lote se encuentra en muy mal estado, pues hay demasiada presencia de pólipos, rupturas severas, la tinción es dispareja, los pliegues no son normales, hay presencia de FCA. y las células están licuadas.

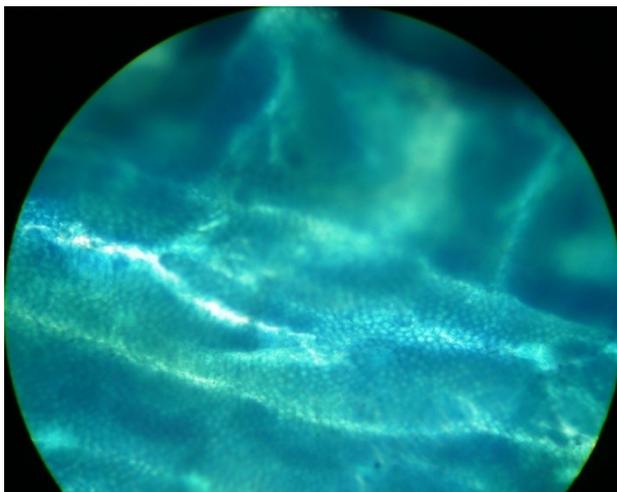
Interpretación de las fotos con H.E.

El tejido en general se ve con severas alteraciones en sus cuatro tunicas, así que la infiltración, edema, congestión y la forma de cepillo de vellosidades se pierde.

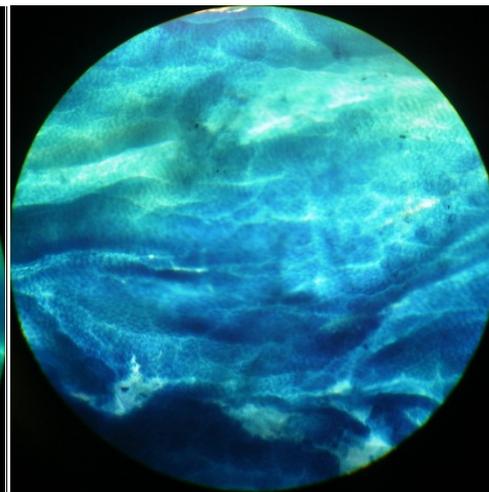


Lote V.f.

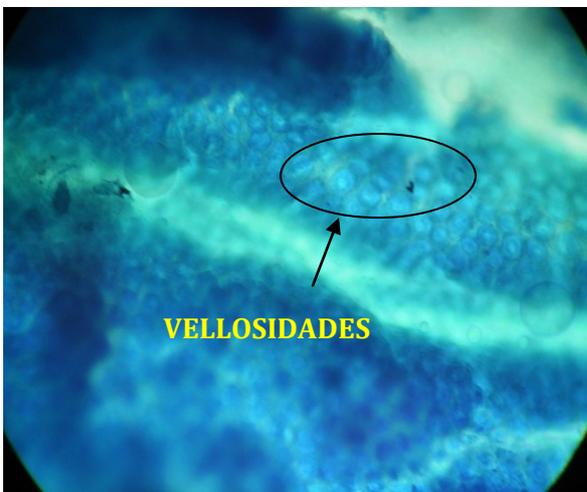
Tinción azul de metileno del intestino grueso y observado con 10x.



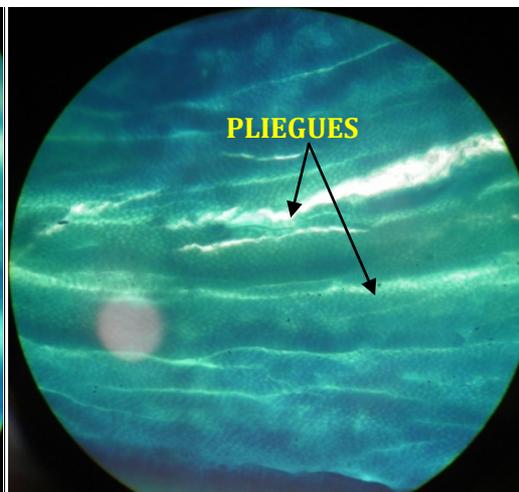
1.



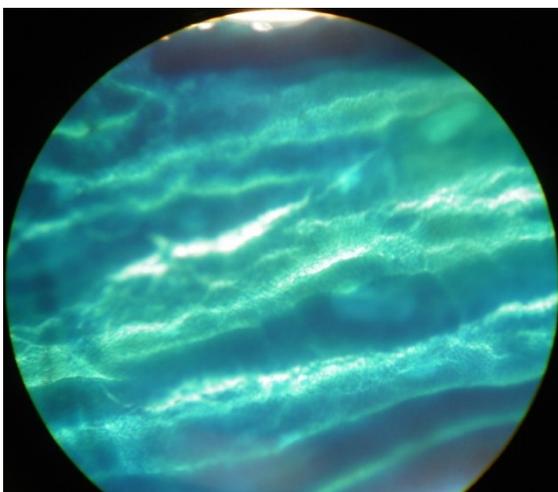
2.



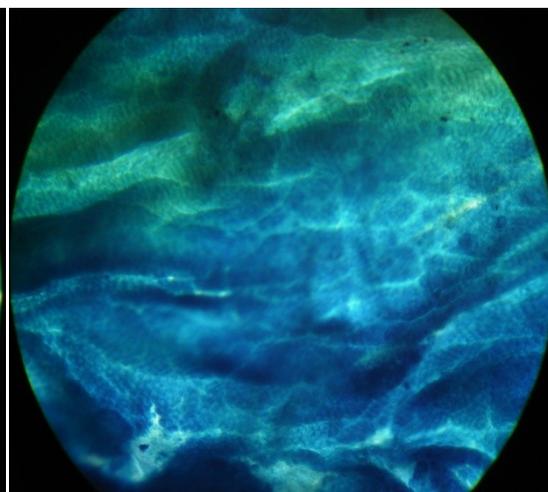
3.



4.



5.

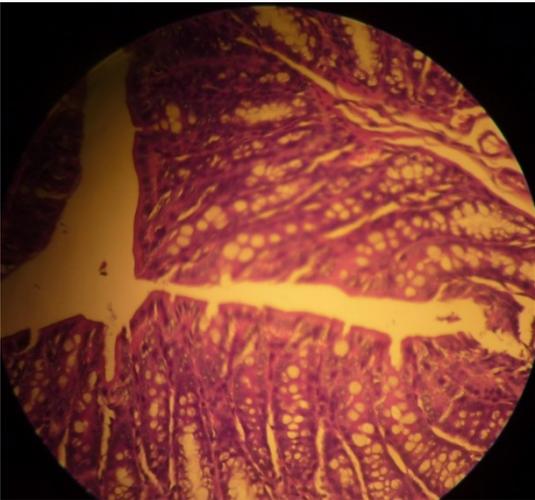


6.



Lote V.f. corte histológico.

Tinción H.E. del intestino grueso, observado a 40x.



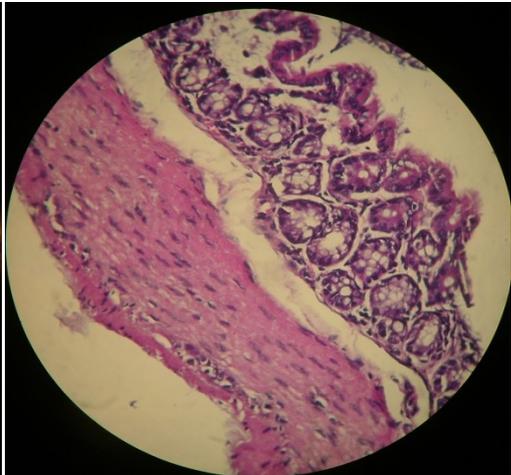
1.



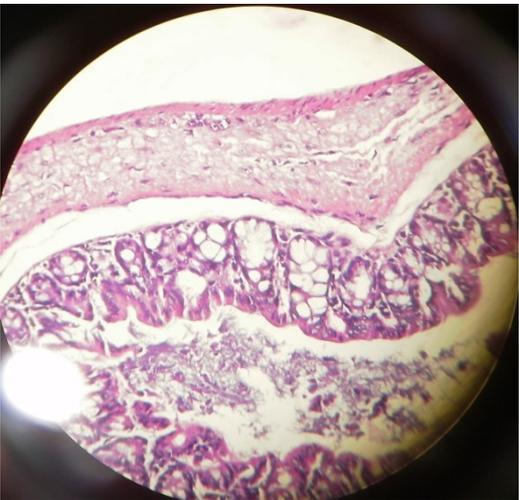
2.



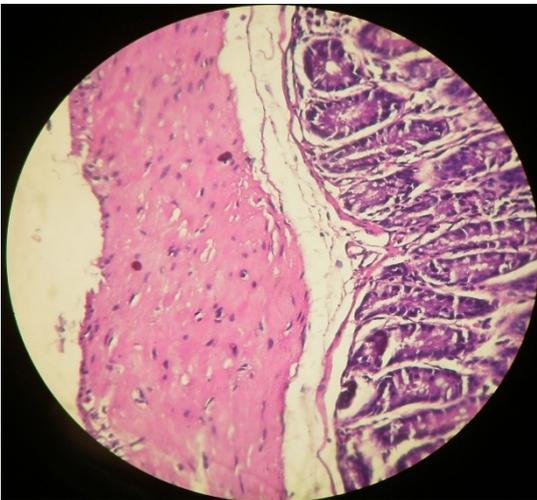
3.



4.



5.



6.



Interpretación de las fotos con azul de metileno.

Todo el lote muestra un tejido grueso y sano, sin alteraciones en las vellosidades, con pliegues normales, la tinción fue normal, sin pólipos ni presencia de FCA.

Interpretación de las fotos con H.E.

El lote completamente sano en cuanto al tejido, no presenta ninguna anormalidad, ni rasgo alguna de lesión.



Tabla 4: Comparación de los resultados obtenidos de la observación macroscópica y microscópica del intestino grueso, después de la experimentación, teñidos con azul de metileno.

Lote	Tinción	Rupturas	Pólipo	FCA.
Prueba	3	5	Si	Si
Negativo	2	0	No	No
Positivo	3	10	Si	Si
6.67mg/Kg <i>V.f.</i>	1	10	Si	Si
13.33mg/Kg <i>V.f.</i>	2	10	Si	Si
20 mg/Kg <i>V.f.</i>	2	5	No	Si
26.67mg/Kg <i>V.f.</i>	2	5	Si	No
33.33mg/Kg <i>V.f.</i>	2	5	No	No
Sin <i>V.f.</i>	3	10	Si	Si
Vicia faba	2	0	No	No

Acotaciones

Tinción: Excesiva 3, Normal 2, Baja 1

Rupturas: Muchas 10, Pocas 5, Nulas 0

Pólipo: Si, No

FCA: Si, No

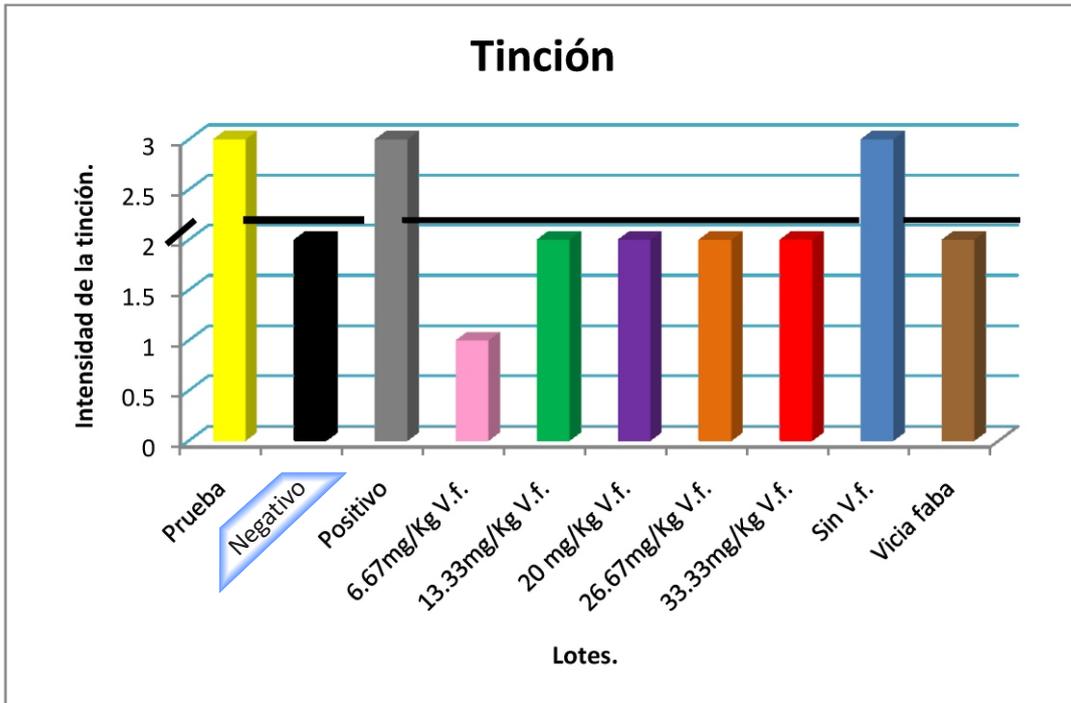


Figura 17: Representación del grado de tinción.

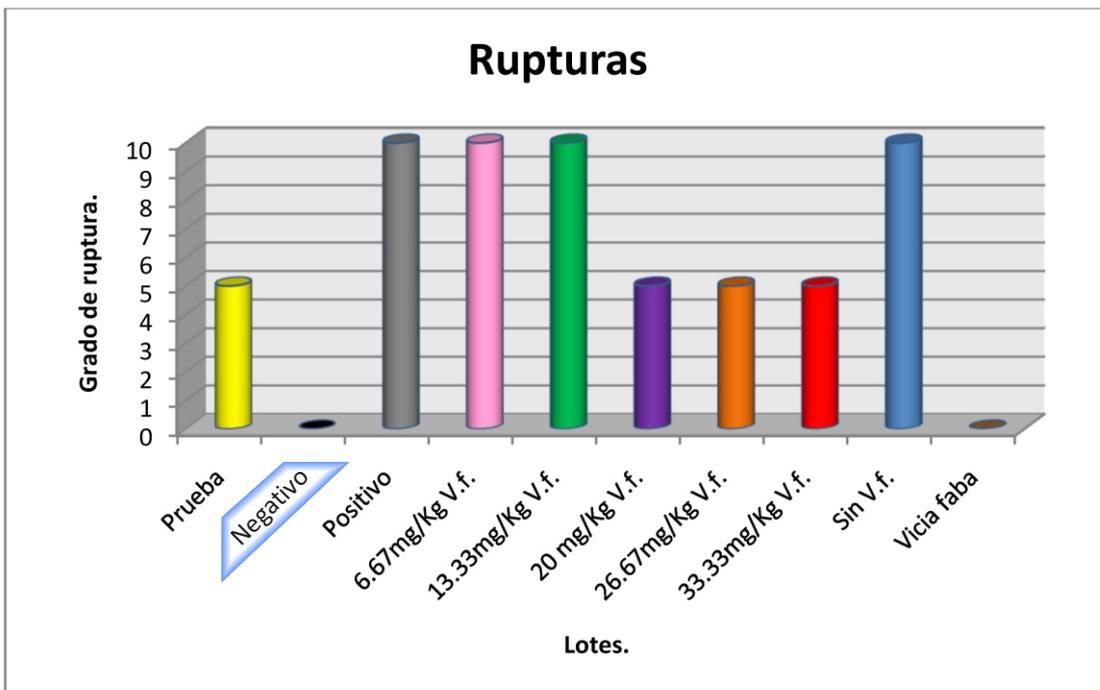


Figura 18: Representación del grado de ruptura, de cada uno de los lotes.



Tabla 5: Comparación de los resultados obtenidos de la observación microscópica del intestino grueso, con H.E.

Lote	Congestión				Edema				Infiltraciones			
	Musc.	SM	Muc.	V.	Musc.	SM	Muc.	V.	Musc.	SM	Muc.	V.
Prueba	0	0	3	2	0	3	0	0	3	0	0	2
Negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Positivo	0	2	1	3	1	3	0	1	3	2	2	2
6.67mg/Kg <i>V.f.</i>	0	1	3	2	0	3	1	0	3	0	0	1
13.33mg/Kg <i>V.f.</i>	0	2	2	3	0	3	0	1	3	0	0	2
20 mg/Kg <i>V.f.</i>	0	3	1	2	0	3	0	0	2	0	0	0
26.67mg/Kg <i>V.f.</i>	0	3	0	1	0	3	0	0	2	0	0	1
33.33mg/Kg <i>V.f.</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Sin <i>V.f.</i>	1	3	1	2	1	3	1	2	1	1	2	2
Vicia faba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Acotación Microscópicas (Histología) Nulo 0, Leve 1, Moderado 2, Severo 3.

Musc.= túnica muscular.

SM.= túnica submucosa.

Muc.= túnica mucosa.

V.= vellosidades.

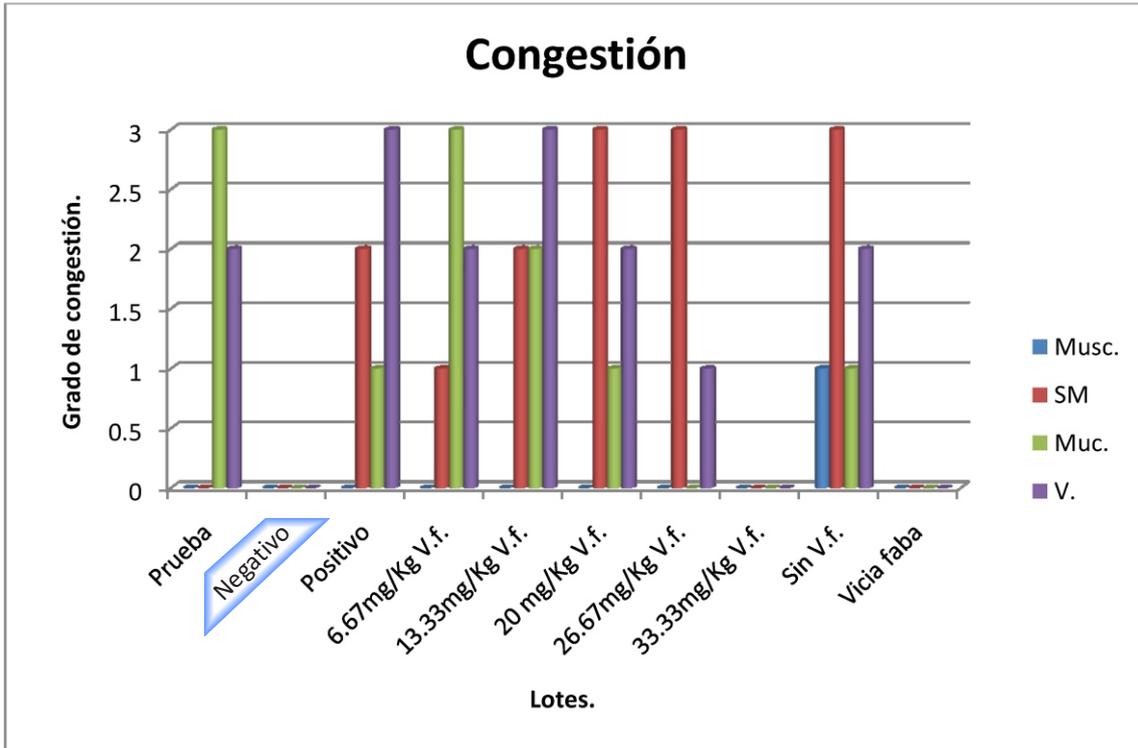


Figura 19. Representación del grado de congestión, de cada uno de los lotes, en las cuatro tunicas.

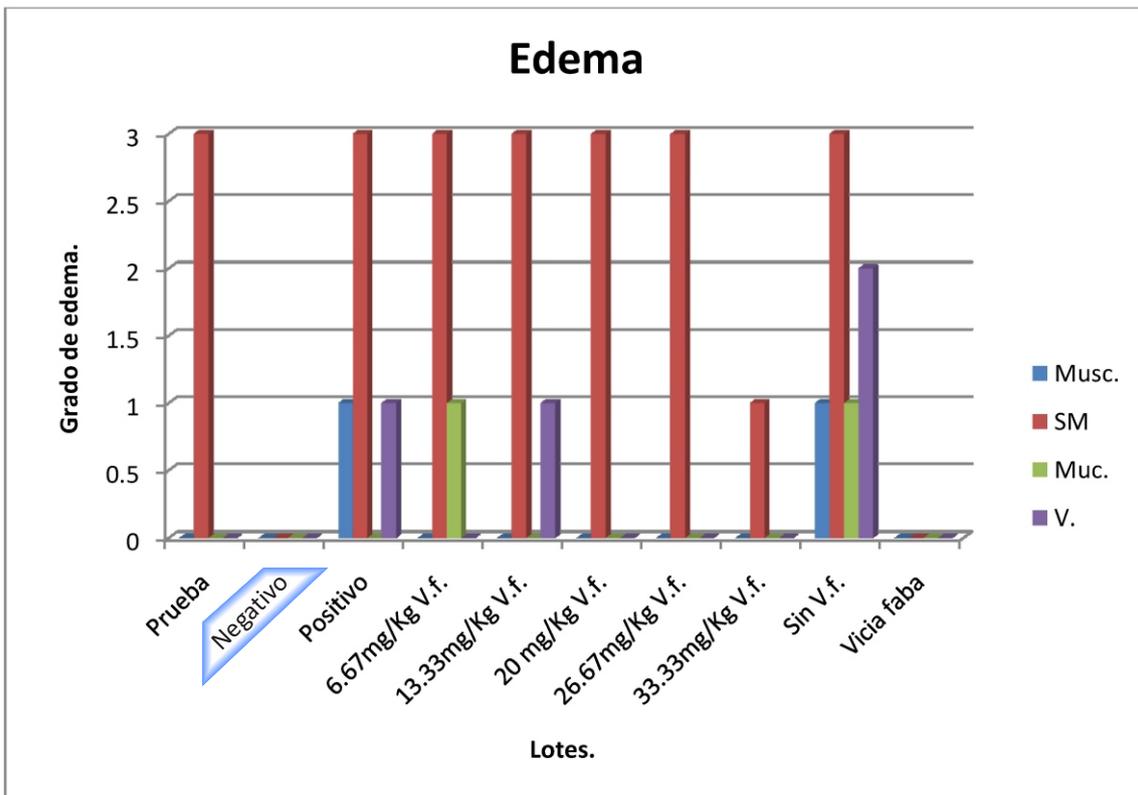


Figura 20. Representación del grado de edema, de cada uno de los lotes, en las cuatro tunicas.

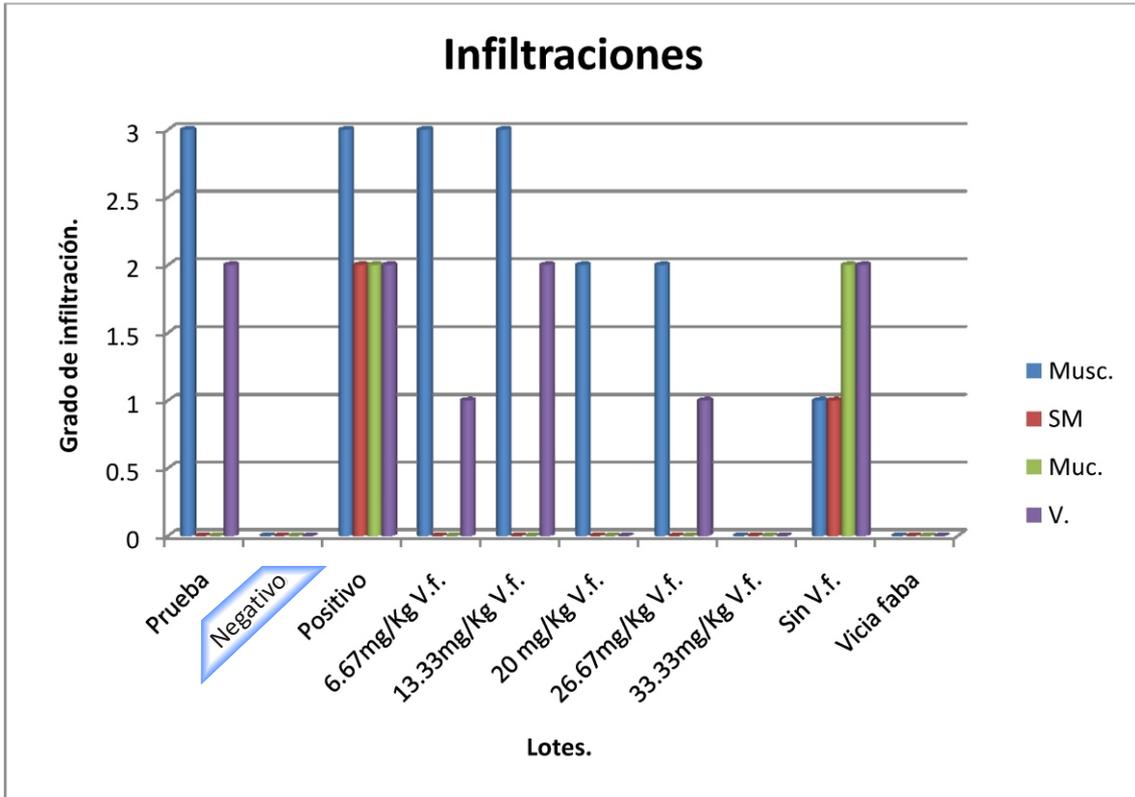


Figura 21. Representación del grado de infiltración, a través de una estadística cualitativa, de cada uno de los lotes, en las cuatro tunicas.



7. Discusión.

En este trabajo se planteó la creación de un modelo experimental de inducción de CCR en ratón. Escogiendo la cepa Balb-C debido a sus características bioquímicas similares a las del ser humano, y a su alta especificidad en la formación de tumores.

La importancia de los modelos radica en encontrar la elaboración de tratamientos preventivos y terapéuticos que permiten detener el desarrollo o ayudar a los procesos de recuperación en el cáncer, para poder ofrecer una mejor calidad de vida a los pacientes. (Zamorano, et. al. 2008)

Una vez planteado el modelo de inducción y tomando en cuenta la importancia de la dieta para el desarrollo de este tipo de cáncer, se buscó un producto natural con propiedades quimiopreventivas común en la alimentación diaria de los mexicanos. La *Vicia faba* a sido previamente estudiada por su alto valor nutricional, adjudicándosele diversas propiedades curativas (Font, 1992).

Las proteínas de V.f. utilizadas en esta investigación fueron extraídas con el método “salting in” y posteriormente liofilizadas en una tesis previa para evaluar su citotoxicidad y genotoxicidad “*in vitro*”; lo que dio pie a la posibilidad de probar su efecto antitumoral en modelos “*in vivo*”. (Macías, 2009)

En el experimento se comenzó por la inducción de las lesiones pre y neoplásicas a través de la administración de la 2,4-Dinitrofenilhidrazina vía intraperitoneal y del metocarbamol vía oral. Para comprobar que se formaron las lesiones, se tomó un ratón de cada lote después de un periodo de 15 días de administración, encontrándose evidencia positiva. A partir de aquí se llevó a cabo la distribución correspondiente de los lotes a evaluar con el tratamiento de V.f. obteniendo lo siguiente:



Lotes control.

La diferencia entre éstos es muy evidente, ya que el lote negativo no presenta ninguna alteración morfológica e histológica en el tejido, no así el lote positivo que muestra severos daños en toda la estructura. Empezando con la tinción que es más intensa, esto se debe al que el colorante utilizado (azul de metileno) es una sal básica, que tiene afinidad por las sustancias ácidas, tomando en cuenta que el pH normal del intestino grueso es de 8 siendo éste un índice básico, quiere decir que las estructuras están modificadas de tal forma que crean un medio ácido lo que permite que el colorante sea más afín y penetre con mayor facilidad en el tejido. Este parámetro no es reportado en ningún experimento anterior sin embargo se considera en éste trabajo debido a que es importante tomar en cuenta la modificación del medio del tejido por los agentes inductores. (Costa y Lutz, 2011). Estos órganos presentan una mayor susceptibilidad a romperse a la hora de la manipulación, debido a la pérdida de la morfología normal y a los daños que están sufriendo las células en su estructura. En la formación de las lesiones preneoplásicas tiene como origen la aparición excesiva de FCA debido a las mutaciones en los genes K-ras, APC y p53 que son importantes alteraciones genéticas en el desarrollo de CCR, las cuales han sido demostradas en su aparición que posteriormente evolucionan en adenomas y pólipos que son una tumoración o protuberancia circunscrita visible macroscópicamente, estas lesiones se proyectan en la superficie de la mucosa del lote positivo. La mutación del gen K-ras es predominante en el momento en que los FCA llegan a ser adenomas, la mutación en el gen APC es frecuente en pólipos y respecto a las mutaciones en el gen p-53 se piensa que es un evento tardío en el proceso de carcinogénesis. Las alteraciones en estos genes nos llevan al aumento de la beta-catenina en su expresión citoplasmática, es un evento precoz en la génesis tumoral y que su posterior



aumento en el ámbito nuclear marca la conversión de adenoma a carcinoma (Carreto, et. al. 2001), (Zamorano, et. al. 2008) y (Colina e Ibarrola, 2004).

Zamorano y Piñols realizaron estudios *in vivo* de inducción de CCR en roedores con AOM y 1,2-DMH respectivamente, para medir el daño ocasionado por estas sustancias, el parámetro utilizado fueron los FCAs, ya que son considerados como lesiones preneoplásicas en ratones y en seres humanos, corresponden con lo que patólogos han diagnosticado preferentemente como hiperplasia focal. Zamorano las cuantifica mediante la tinción con azul de metileno. En contraste con nuestro trabajo también los consideramos importantes, sin embargo hay que tomar en cuenta parámetros tales los pólipos; esto es porque la secuencia pólipo-cáncer es una displasia epitelial o un marcador morfológico de que una lesión colorrectal es de tipo neoplásico premaligno según el compendio realizado por Colina e Ibarrola, 2004.

Lote 6.67mg/Kg.

Este lote tiene la menor dosis de V.f. administrado, no hay diferencias relevantes entre éste y el control positivo, salvo por la tinción que se manifestó en el grado más bajo, en cuanto a las rupturas, presencia de pólipos y FCA no hubo recuperación alguna, lo cual pone de manifiesto que a esta dosis de V.f. la proteína no ejerce un efecto que permita las posibles acciones antitumorales de éstas, como son modular procesos biológicos en las células tales como el crecimiento, la adhesión, transformación maligna, metástasis y apoptosis; esto se puede explicar de la siguiente manera a través de estudios que sugieren que las proteínas disparan cambios moleculares que dan como resultado la inhibición del crecimiento celular y la inducción de la muerte celular apoptótica de células cancerígenas. Cabe mencionar que también se ha reportado que las proteínas aumentan la sensibilidad de las células tumorales a drogas (Castillo y Abdullaet, 2005).

**Lote 13.33mg/Kg.**

En este se observó que la tinción ya es normal, sin embargo en cuanto a los demás índices de alteraciones que son rupturas, pólipos y FCAs siguen apareciendo de manera considerable respecto a los lotes control; esto puede deberse a que la dosis administrado de V.f. apenas alcanza a manifestar cambios celulares que se reflejan en el medio, aunque estos no alcanzan a ser significativos para evidenciar el principio de la recuperación.

Lote 20mg/Kg.

Como se muestra en la tabla 4 los daños sólo se comparan en la formación de FCA y un poco de descenso en el grado de ruptura. Posiblemente a esta dosis de V.f. ya permite que la acción de las proteínas que induzca a dos posibles mecanismos de recuperación celular que pueden ser la apoptosis y la adhesión normal de las células reflejando así una disminución en la aparición de los pólipos y le brinda la resistencia al tejido a la manipulación.

Lote 26.67mg/Kg.

En comparación con el lote positivo este tejido se aprecia más sano llegando casi a la normalidad, sin embargo la presencia de pólipos sigue manifestando que existió un daño celular importante. En ésta dosis de V.f. la interacción de las proteínas con las células es mucho más evidente ya que la recuperación a nivel tisular es importante pudiéndose ver reflejado en una mayor acción de mecanismos restauradores como pueden ser: crecimiento, adhesión, transformación maligna, metástasis y apoptosis, dando así la tinción normal, la resistencia a la ruptura y la disminución en los FCA. No regenerando así los pólipos debido a que el daño era tan grave que no se restauraron estas células.

Lote 33.33mg/Kg.

A ésta dosis queda de manifiesto que la unión de las proteínas con las células permitió en su totalidad en efecto de todos los mecanismos



antitumorales ya mencionados, debido a que el tejido se tiñe normal, es resistente a la ruptura y no presenta ni pólipos, ni FCA.; éste se muestra más similar al control negativo pues su morfología es casi normal.

Lote sin V.f.

Éste siguió la exposición normal a la inducción y se decidió no administrar la V.f. para comprobar si el tejido era capaz de mostrar regeneración por si mismo; los resultado mostraron que no hay signos de que el daño se haya resarcido, pues el tejido es muy semejante al control positivo.

Lote sólo con V.f. (33.33mg/Kg)

El propósito de este lote era comprobar que la V.f. no tuviera un efecto negativo en el tejido, lo cual obtuvo resultados satisfactorios ya que no se observaron ninguna lesión que sugiera un daño pre o neoplásico. En cambio notamos que tal vez tenga un efecto protector ya que los órganos en comparación con el control negativo muestran un mejor estado morfológico.

Justil y colaboradores demuestran que el efecto quimioprotector sobre el CCR es dosis dependiente del extracto del producto natural utilizado que en su caso fue la *Baccharis genistelloides* (carqueja), donde al igual que en el presente trabajo se remitió el daño neoplásico, aunque sus parámetros fueron distintos pues se enfocaron a los adenomas, las conclusiones a la que se llegaron fueron similares.

Comparación histológica.

Otros investigadores describen hallazgos histopatológicos distintos, observando los adenocarcinomas frecuentes en el colon. Los tumores inducidos no son clasificados de un manera uniforme en la literatura, sin embargo, todos coinciden en una división entre adenocarcinomas mucinosos y no mucinosos como en los estudios de Piñols, Justil y colaboradores, cabe mencionar que estos estudios han sido realizados en ratas pero estos hallazgos difieren cuando se trata de otra especie, de ahí la



importancia de buscar otros marcadores que evidencien las lesiones neoplásicas, en distintos modelos de inducción.

En cuanto a los parámetros utilizados para el estudio histopatológico son: el edema que se refiere a la acumulación anormal del líquido intersticial, la congestión que es la acumulación excesiva de glóbulos rojos en los vasos sanguíneos, y las infiltraciones que se deben a la presencia de células de defensa, que de manera natural se encuentran en todas las tunicas, sin embargo cuando están presentes de manera abundante estas reflejan una patología (Grau y Pique, 1990) (Tortora y Reynolds, 2002). El control negativo no presenta nada anormal. En contraste el control positivo en la túnica muscular se presenta un grado moderado en cuanto a edema y severo en infiltraciones; en la túnica submucosa se presenta grado severo en edema y en congestión e infiltraciones se encuentra en moderado; en la túnica mucosa presenta un grado leve en congestión y edema mientras que en infiltraciones es moderada; y en las vellosidades el grado más severo se encuentra por congestión, siendo moderado en infiltraciones y leve en edema.

Congestión.

El cuerpo de manera natural siempre está en equilibrio, cuando éste es alterado existen diversos mecanismos que buscan la forma de mantenerlo o regresarlo a él; en este sentido la irrigación excesiva de los vasos sanguíneos (congestión) tiene el propósito de llevar todos los componentes que ayudan a la estabilización del tejido dañado siendo así uno de los mecanismos importantes. En las cuatro tunicas existe vascularización, sin embargo la túnica submucosa es la más vascular debido a eso el daño es más pronunciado en ésta. (Gartner y Hiatt, 2000)

En la figura 19 se muestra lo siguiente: en la túnica muscular sólo existe congestión leve en el lote que no se administró V.f.; en la túnica submucosa la congestión está presente en los lotes sin V.f., en las dosis de



20mg/Kg. y 26.67mg/Kg. de V.f. el grado es severo, moderado en control positivo y a 13.33mg/Kg. y muy leve en 6.67mg/Kg; en la mucosa la congestión severa esta en el lote simple y de 6.67mg/Kg, mientras que es moderado en 13.33mg/Kg y leve en el control positivo, el de sin V.f. y a 20mg/Kg; en cuanto a las vellosidades es severo en el control positivo y a 13.33mg/Kg, moderado en los lotes simple, sin V.f., 6.67mg/Kg y 20mg/Kg, leve para 26.67mg/Kg. En este análisis se observó que existe congestión en las cuatro túnicas de casis todos los lotes, sin embargo los más afectados son: el control positivo, el lote simple, al que no se les administró V.f. y el de 6.67mg/Kg; aunque en las dosis de 13.33mg/Kg, 20mg/Kg y 26.67mg/Kg. si presentaron congestión, es menos severa y se encuentra localizada en las zonas más vascularizadas; mientras que en los lotes control negativo, 33.33mg/Kg y el que sólo tiene V.f. no presentan congestión, lo cual representa que el efecto de las lectinas es protector por lo cual el cuerpo no tiene necesidad de la irrigación excesiva.

Edema.

El líquido intersticial es extracelular y llena espacios microscópicos entre las células de los tejidos. Encontrarlo no es común, por lo que cuando existe, refleja una alteración celular debido a que llena espacios que normalmente deberían estar ocupados por células en buen estado. Debido a que la composición celular es distinta en cada túnica este líquido esta en mayor presencia en una que en otra, siendo la submucosa la más propensa a evidenciar este. (Tortora y Reynolds, 2002)

Demostrado en la figura 20 el edema en la túnica muscular sólo se ve y de manera leve en el control positivo y en el lote sin V.f.; en la túnica submucosa el edema es severo en los siguientes lotes: simple, positivo, 6.67mg/Kg, 13.33mg/Kg, 20mg/Kg, 26.67mg/Kg y sin V.f. y leve en el de 33.33mg/Kg; para la túnica mucosa sólo es leve en 6.67mg/Kg y el lote sin V.f.; en cuanto a vellosidades es leve en positivo y 13.33mg/Kg y moderado



en el lote sin V.f.. Donde se manifiesta mayor edema es en la túnica submucosa para la mayoría de los lotes exceptuando el lote de 13.33mg/Kg, control negativo, y sólo V.f., lo que sugiere que el efecto de la V.f. contribuye a que la túnica se mantenga con su composición normal y en contraste los lotes con mayor daño se vean más expuestos a este líquido, tal vez la V.f. no logra un efecto que contrarreste esta acumulación de líquido.

Infiltraciones.

De manera natural en todos los tejidos circulan células de defensa primarias las cuales tienen la función de identificar y atacar cualquier agente nocivo para el organismo. La luz del tracto digestivo es rica en sustancias antigénicas, bacterias y toxinas como tan sólo un delgado epitelio cilíndrico simple, separa el tejido conectivo ricamente vascularizado de este medio amenazante la lamina propia de los intestinos esta bien provista de elementos linfáticos como células dispersas (células B, T y plasmáticas, macrófagos etc.), nódulos linfáticos aislados. Las regiones en las que los nódulos linfáticos establecen contacto con el revestimiento epitelial de los intestinos muestran células aplanadas que conforman la interface entre la luz y el nódulo linfático; son células microplegadas que fagocitan antígenos y los transportan por vesículas con cubierta de clatrina hasta la cara basal de la célula. Los antígenos son liberados en la lamina propia para ser captados por las células presentadoras y dendríticas. (Gartner y Hiatt, 2000)

Por lo anterior se muestra que la túnica muscular presenta infiltraciones severas en los lotes simple, positivo y a 6.67mg/Kg y 13.33mg/Kg, mostradas en la figura 21, lo indica que al presentar un daño neoplásico mayor el cuerpo libera una gran cantidad de células de defensa para contrarrestar estas alteraciones, en esta misma túnica se ven infiltraciones moderadas en los volúmenes de 20mg/Kg y 26.67mg/Kg, lo que podría poner de manifiesto de la participación de las lectinas, en tratamiento sin V.f. existen infiltraciones leves, esto puede deberse a que en



esta zona no haya un daño mayor. En la túnica submucosa y mucosa sólo dos lotes presenta daño, el positivo que presenta infiltraciones moderadas para ambas y el de sin V.f. que es leve y moderado respectivamente, en esta zonas normalmente no hay infiltraciones y hay debido a que son los tratamientos que no tuvieron contacto con las lectinas. En las vellosidades hay infiltraciones moderadas en los lotes simple, positivo, sin V.f. y 13.33mg/Kg; y es leve en 6.67mg/Kg y 26.67mg/Kg, al igual que en la capa muscular normalmente en estas hay infiltraciones, sin embargo estas exceden en cantidad en los lotes de más daño neoplásico como mecanismo del cuerpo para tratar de contrarrestarlas.

Al haberse demostrado que el extracto protéico de V.f. tiene efecto quimioprotector en el intestino grueso de ratón, se recomienda ampliar estudios de toxicidad y seguridad a dosis repetidas con tiempos prolongados, a fin de evidenciar un producto natural con potencial quimioprotector del CCR, ya que se estaría contribuyendo en mostrar una alternativa terapéutica a base de productos naturales para contribuir con el mejoramiento de los signos y síntomas del CCR.



8. Conclusiones.

- ❖ Se logró provocar lesiones pre y neoplásicas a nivel intestinal gracias a la inducción de 2,4-Dinitrofenilhidrazina y metocarbamol ya que se comporta de manera similar a la 1,2-Dimetilhidrazina, de la cual se tiene reporte en modelos anteriores.
- ❖ La cepa Balb-C fue la adecuada para este trabajo ya que evidenció la progresión de las lesiones, así como su reversión con la administración de V.f.
- ❖ A través de las lesiones generadas se pudo estudiar el efecto anticancerígeno de la V.f. a distintas dosis para hallar la más eficaz, siendo la de 33.33mg/Kg la que demostró tener mayor remisión tanto a nivel organográfico como a nivel histológico pues el lote es similar al control negativo que no mostró ningún daño; sin embargo todas las dosis de V.f. exceptuando la de 6.67mg/Kg, presentaron un efecto regenerador y quimioprotector en el tejido. La remisión de las lesiones es dosis dependiente de la administración de V.f. puesto que es proporcional a la concentración.
- ❖ Se comprobó en este trabajo que el extracto protéico de *Vicia faba* tiene propiedades anticancerígenas por que disminuyó el daño causado a las células intestinales producido por la 2,4-Dinitrofenilhidrazina y metocarbamol; por su efecto adjudicado a las proteínas de dicha leguminosa.



9. Bibliografías:

- Abdullaev, F.I.; González, E. (1997) Antitumor effect of plant lectins. *Natural toxins*; 5: 157-63.
- Anatomía y fisiología del aparato digestivo. <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/5392/Capitulo2.pdf> año de consulta 2011.
- Aub, J.C.; Tieslau, C.; Lankester, A. (1963) Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides. *Proc Natl Acad Sci USA*; 50: 613-9.
- Barrón, R. L. P.; Chanona, V. J. G. (2001). Focos de criptas aberrantes. *Revis. Gastroenterol. Vol.3*: 3 116-119.
- Calderillo, G. (2009) Cáncer colorrectal. Primera edición. Instituto Mexicano de Cancerología México. pp.3-14, 39-58.
- Carretero, J. E.; Herreria, E. J.M.; Delgado, E. P. (2001). Oncogenes y cáncer colorectal. *Revis. Gastroenterol. 3*:181-198.
- Castillo, V. A.; Abdullaet, F. (2005) Lectinas vegetales y su efecto en el cáncer. *Revista de investigación clínica. 57 (1)*: 55-64.
- Charlín, P. G.; Fernández, C. O.; García, C. M. R.; Lamelo, A. F. (2006). Cáncer de colon. *Guía Clínica. Vol. 6 (37)*1-4.
- Colina, F.; Ibarrola, C. (2004). Protocolo e información sistematizada para los estudios histopatológicos relacionados con el carcinoma colorrectal. *Revista Española de Patología. Vol. 37, 1*: 73-90.
- Costa, E. y Lutz, M. (2011). Factores fisiológicos que influyen en la biodisponibilidad de medicamentos. http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/arancibiaa02/03a.html



- ¿Cuáles son las lesiones digestivas precancerosas?
<http://www.tusabuelos.com.ar/precancerosa2.asp>. año de consulta 2011
- Curtis, H.; Barnes, S. N. (1989). Biología. Quinta edición. Ed. Médica panamericana. Buenos Aires Argentina. pp.742.
- Davies, R.J.; Sandle, G.I.; Thompson, S.M. (1991) Inhibition of the Na⁺ K(+)-ATPase pump during induction of experimental colon cancer. *Cancer Biochem Biophys*. 12:81-94
- Departamento de salud servicios humanos de EE. UU. Institutos nacionales de la salud. (2008) Lo que usted debe saber del cáncer de colon. Folleto de la National Cancer Institute.
- Díaz, R. E. (1998). Cáncer Colorectal. Primera edición. Nova Sidonia. Oncología. España. pp. 55-75.
- Ferrufino, J; Taxa, L.; Ángeles, G. (1996) Histología normal del intestino delgado. *Rev. Med. Hered*. Vol. 7: 46-57.
- Ficha de seguridad
http://www.carloerbareagenti.com/Repository/DIR199/CH0782_E.pdf. año de consulta 2011.
- Font, Q. P. (1992). Plantas Medicinales. Primera edición. Ed. Labor. Barcelona España. pp. 383-384.
- Gartner, P. L.; Hiatt, L. J. (2000). Atlas color de Histología. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. Montevideo Uruguay. Pp. 270-293.
- Grau, de C. J.; Pique, B. J.. (1990). Cáncer Colorectal. Primero edición. Ediciones Doyma. Monografías Clínicas en Oncología. México.



- Hernández, C. P.; Pérez, C. E.; Martínez, M. L.; Ortiz, B.; Martínez, G. (2005) Las Lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones -proteína-carbohidrato. REB 24 (1): 21-27
- Instituto Nacional del Cáncer (2011) Estadios del Cáncer de Colon.<http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/colon/Patient/page2>.
- Jensen, B. C. (2001). Cáncer de colon y recto. Revista de colegio chileno de proctología. Vol.18: 8; pp. 426-428.
- Junqueira, L.C.(1998) Histología básica. 3ª Edición. Ed. Salvat. México. pp. 3-6.
- Justil, H.; Arroyo, J.; Valencia, J. (2010). Extracto etanólico de *Baccharis genistelloides* (carqueja) sobre el cáncer de colon inducido con 1,2 Dimetilhidrazina en ratas. An fac Med Vol. 71(2): 88-96.
- León, M. V.; Saenz, F. R. (2007). Focos de criptas aberrantes el comienzo de la historia. Gastr. Latinoam. Vol. 18, N°4: 383-389.
- Llor, X.; Jacoby, R.F.; Teng, B.B.; Davidson, N.O.; Sitrin, M.D; Brasitus, T.A. (1991) K-ras mutations 1,2- dimethylhydrazine induced colonic tumors effects of supplemental dietary calcium and vitamin D deficiency. Cancer Res305-4309.
- Macías, C.A. (2009). Estudio del efecto antígenotóxico, de proteínas extraídas de semillas de *Vicia faba* (Haba) mediante el ensayo de intercambio de cromátidas hermanas *in vitro* así como su separación e identificación electroforética mediante SDS-PAGE. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
- Márquez, V. J. R. (2002). Cáncer de colon. Revista Nacional de cirugía. Vol. 123. 125-133.



- McLellan, E.; Bird F. (1991) Effect of disulfuram on 1,2-dimethylhydrazine and azoximethan-induced aberrant crypt foci. *Carcinogenesis* Vol. 12: 969-972.
- Mittal, N.; Singh, S. K., Nath, S. S. (2008). Efecto de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos y del procarcinógeno 1,2-dimetilhidracina sobre la estructura y función de la membrana intestinal de la rata. *Nutr. Hosp.* v.23 n.5 Madrid, España.
- Molist, G. P.; Pombal, M. Á.; Mejías, P. D. (2011) Atlas de histología vegetal y animal. Pagina: <http://webs.uvigo.es/mmegias/presentacion.php>
- Murillo, G. ; Kosmeder, J.; Pezzuto, J; Mehta, R. (2003) Deguelin supresses the formation of carcinogen- induced aberrant crypt foci in the colon of CF-1 mice. *Int. J. Cancer*: Vol 104:7-11.
- Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwel, V. W. (2001). Bioquímica de Harper. Quinceava edición. Ed. Manual moderno. México. Pp. 9117-9118.
- Oliva, R.; Ballesta, F.; Oreola, J.; Claria, J. (2008). Genética medica. Primera edición. Díaz de Santos Ediciones. España. pp.273-275
- Orellana, Narváez Ivonne (2003). Inhibidores de Cox2 en Gastroenterología. *Medwave* Vol.2 pp.181-189
- Oshima, H.; Oshima, M. (2010). Mouse models of gastric tumors: Wnt activation and PGE₂ induction. *Pathology international* Vol.60: 599-607.
- Piñols, F. C. (2010). Estudio de los cambios en la mucosa colonica de rata y cinética celular durante la carcinogénesis experimental inducida con 1,2-Dimetilhidracina. *Servei de publicació*n Universitat de Lleida. Salamanca España. pp. 38-45.



- Pryme, IF.; Bardocz, S.; Pusztai, A.; Ewen S.W.; Pfuller, U. (2004) A mistletoe lectin (ML-1)-containing diet reduces the viability of a murine non-Hodgkin lymphoma tumor. *Cancer Detect Prevent*; 28: 52-6.
- Sobrino, C. S.; Dra. Trejo, V. F.; Hernández, G. A.; Herrera, G. R.; Sánchez, M. J.; Alonso, L. J. O. (2001) Endoscopia de Magnificación para la detección de foco de cripta aberrante displásica en pacientes mexicanos con alto riesgo de cáncer de colon. *Endoscopia Vol. 19: 2* 119-126.
- Stralka, D.; Strobel H.G. (1991). Characterization of cytochrome P450-dependent dimethylhydrazine metabolism in human colonmicrosomes. *Cancer* 68: 2363-2369.
- Sustitución nucleofílica aromática obtención de 2,4 Dinitrofenilhidrazina <http://organica1.org/1405/practica2.pdf>. Año de consulta 2011
- Taketo, M. M.; Edelman, W. (2009). Reviews in basic and clinical gastroenterology, mouse models of colon cancer. *Gastroenterology* 136:780-798.
- Tortora, G. J; Reynolds, G. S. (2002). Principios de anatomía y fisiología. Novena edición. Ed. Oxford. Reino Unido. pp. 864-870.
- Young, B.; Heath W. J. (2005). Histología funcional. Cuarta edición. Ed. El Sevier. Madrid España. pp. 270-293.
- Zamorano, P. E.; Lagos, M. P.; Rivera, C. P.; Fernández, R. J. (2008). Un modelo experimental inducible en ratón para conducir estudios en quimio prevención y anti carcinogénesis. *Theoria*, Vol.17(1):71-86.



10. Apéndice:

Preparación de la 2,4-Dinitrofenilhidrazina:

La 2,4-dinitrofenilhidrazina fue preparada como una solución que contenía 400mg de 2,4-dinitrofenilhidrazina disuelta en 100ml de agua destilada estéril, conteniendo 37 mg de EDTA como agente estabilizador, y mantenida dicha solución a pH de 6.5 con hidróxido de sodio.

Preparación del metocarbamol:

El metocarbamol es un de los principios activos del medicamento Robaxisal, contenida en la parte rosa de la tableta, por lo cual la separamos, pesamos y disolviéndola en 250ml de agua. La parte blanca de la tableta corresponde al ácido acetilsalisílico.

La dosis que administramos fue de 25mg/Kg de peso.

Preparación de la tinción con azul de metileno:

Para llevar a cabo la tinción de los órganos previamente conservados en una solución de formol 10% y PBS, se realizó un preparación de azul de metileno y alcohol etílico al 70% 2:1 respectivamente y se coloca el órgano directamente durante 5 min, para su posterior observación al microscopio.

Preparación de PBS:

Para preparar un 1Lt. se disuelve un sobre de la preparación ya estandarizada de PBS. Y se colocan 10ml de formaldehído concentrado.

Preparación de NaCl 0.9%:

Se pesaron 0.9g de sal de NaCl y se disolvió en 1000ml de agua destilada.