



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**POSIBLES EFECTOS TERAPÉUTICOS DEL NADIAN PLUS (SUPLEMENTO
ALIMENTICIO) UTILIZANDO A RATAS MACHO WISTAR COMO MODELO
ANIMAL TRATADOS PREVIAMENTE CON UN AGENTE CARCINOGENICO
(AFLATOXINA B1)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:
LILIANA CRUZ COBIÁN**

**ASERORES: Dra. NORMA LAURA DELGADO BUENROSTRO
M en C. CAROLINA MORENO RAMOS**

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2006



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Liliana Cruz

Cobicia

FECHA: 22 MARZO 2005

FIRMA: 

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Posibles efectos terapeuticos del Nadian Plus (Suplemento alimenticio) utilizando a ratas macho Wistar como modelo animal tratados previamente con un agente carcinogenico (Aflatoxina B1).

que presenta la pasante: Liliana Cruz Cobián
con número de cuenta: 9660566-8 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 ESPIRITU"

Cuautitlán Izcafi, Méx. a 30 de Noviembre de 2005

PRESIDENTE QFI. Leticia Zúñiga Ramírez

VOCAL QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda

SECRETARIO Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro

PRIMER SUPLENTE QFB. Martha Patricia Zúñiga Cruz

SEGUNDO SUPLENTE MFC. Cecilia Hernández Barba

A MI PADRE DIOS

Porque a diario me demuestras tu amor incondicional a través de bendiciones que solo tu puedes regalarme. Gracias Padre por acompañarme por el sendero de la vida.

A LA MEMORIA DE MI MADRE

Sabes, quisiera estar sentada en este momento a tu lado para expresarte mis sentimientos y recordar tantas cosas que vivimos juntas. Pero te fuiste sin saber lo que sentía, no tuve tiempo de explicar mi gran amor, es por ello que a través de este trabajo quiero expresarte mi agradecimiento y mi amor eterno. Se que este pensamiento y mis sentimientos van a llegar hasta donde tu estas, y que este llanto que hoy derramo lo vas a escuchar como un canto lleno de amor y de felicidad. Te extraño pero sobre todo TE AMO Mami.

AGRADECIMIENTOS.

A MI AMADO PADRE

Sabes, me siento muy afortunada al tenerte como Papá; he aprendido de ti a salir adelante siempre ante cualquier obstáculo que se me presente, a valorar cada bendición que Dios me da, a ser mejor ser humano cada día. Gracias Papá porque este trabajo es nuestro, porque estoy segura que sin ti no hubiera llegado hasta donde estoy. **TE AMO PAPI.**

A LUCY

Por tu confianza y tu cariño, por tus palabras de aliento que me hicieron una gran Mujer. Lucy Te quiero, te respeto y te admiro mucho porque siempre has salido adelante, y créeme que ese sentimiento me lo transmites a diario de una o de otra forma. Gracias.

A MIS HERMANOS

René por tu apoyo, porque hemos estado tanto en las buenas como en las malas, por tus consejos, por tu tiempo, pero sobre por tu amor.

Ivonne porque me demuestras a diario tu ternura y amor, por toda la vida que hemos compartido, por escucharme y consolarme en momentos difíciles, por tu confianza. Gracias mi querida niña.

Claudia porque hemos compartido muchos momentos de alegría, por tu apoyo, por escucharme, por tus palabras de aliento, por tu nobleza e incondicionalidad.

July por tu forma tan especial de expresarme tus sentimientos, por tu confianza, por tu apoyo, pero sobre todo por ser mi hermana.

José Manuel por tu ternura, por ser una persona muy linda que me ha enseñado a sonreírle a la vida.

Gracias hermanitos por todo su apoyo y por transmitirme el animo para no desistir en este arduo camino Profesional. LOS AMO.

AGRADECIMIENTOS

A la **Familia Delgado Buenrostro**, por adoptarme como parte de su familia, muy en especial a ti Adriana por tu apoyo, consejos y cariño que me brindan tanto tu como Martín, Nanan y Diego.

A la **UNAM**, incluyendo a todos los profesores y trabajadores que buscan la excelencia en esta máxima casa de estudios.

A la **Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro**, por su paciencia, por su enseñanza, por su apoyo, por su tiempo, por sus comentarios; pero sobre todo agradezco a la amiga por ayudarme a lograr esta meta tan importante en mi vida.
Gracias por todo querida amiga.

A la **M en C. Carolina Moreno Ramos**, por su comprensión, por su tiempo, por su ayuda y por sus valiosos comentarios.

A la **M en C. Juan Carlos Del Río García**, por su valiosa ayuda incondicional, por su tiempo y por sus comentarios.

A la **Q.F.I. Leticia Zúñiga Ramírez**, por su tiempo y por sus valiosos comentarios.

A la **Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda**, por sus valiosos comentarios, pero sobre todo por ser una excelente maestra.

A la **Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz**, por sus valiosos comentarios y por su tiempo para la revisión de esta tesis.

A la **M.F.C. Cecilia Hernández Barba**, por sus comentarios y por su tiempo.

AGRADECIMIENTOS

A la **MVZ. Blanca R. Moreno Cardenti**, por su apoyo para la revisión de los cortes histológicos, por su tiempo y por sus valiosos comentarios.

A la **M en C. Jeannette Izquierdo Vega**, por tu apoyo y ayuda, pero sobre todo gracias por tu amistad.

Al **Sr. Fernando Rivera**, por su confianza y paciencia.

A mis **amigos de la UNAM**, Angélica, Cecilia, Felipa, Gaby, Israel, Jessica, Karina, Lucero, Lupe, Noelia, Paco, Ricardo, Saúl, Tais. Gracias por sus consejos, por su apoyo y por compartir este camino Profesional conmigo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
I. INTRODUCCIÓN	10
I.1 Características anatómicas e histológicas del hígado	10
I.2 Fisiología del hígado	16
I.2.1 Función exocrina	16
I.2.2 Función metabólica	16
I.3 Patologías relacionadas con cáncer de hígado	17
I.3.1 Cirrosis hepática	17
I.3.2 Hepatitis B	18
I.3.3 Hepatitis C	18
I.3.4 Hepatocarcinoma Celular	19
I.3.4.1 Etapas del Hepatocarcinoma Celular	19
I.4 Síntomas y Diagnóstico	19
I.5 Tratamiento	20
II. CÁNCER	23
II.1 Carcinógenos	23
II.1.1 Carcinógenos Físicos	23
II.1.2 Carcinógenos Químicos	24
II.1.3 Carcinógenos Virales	24
II.2 Oncogenes y Genes Supresores	24
II.2.1 Transducción de señales	25

II.3	Apoptosis	26
II.4	Ciclo Celular	27
	II.4.1 Transiciones del Ciclo Celular	28
	II.4.2 Puntos del control en el Ciclo Celular	28
II.5	Desarrollo del Cáncer	30
	II.5.1 Angiogénesis	31
	II.5.2 Invasión de las células tumorales	32
II.6	Oncogenes que inducen Hepatocarcinoma celular	33
III.	AFLATOXINAS	36
III.1	Clasificación, Epidemiología y Patogénesis	36
IV.	VITAMINA E	41
V.	NADIAN PLUS	42
VI.	JUSTIFICACIÓN	45
VII.	OBJETIVOS	46
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS	47
VIII.1	Animales de experimentación	47
VIII.2	Preparación del alimento con AFB1	47
VIII.3	Cuantificación de Aflatoxinas (Método Aflatest VICAM)	48
VIII.4	Características del sorgo	48
VIII.5	Punción Cardíaca	48
VIII.6	Parámetros evaluados	49
	VIII.6. Hematocrito	49
	VIII.6.2 Determinación de la enzima TGO	50
	VIII.6.3 Determinación de la enzima TGP	50
	VIII.6.4 Determinación de la enzima LDH	50
VIII.7	Estudio Histopatológico	51

VIII.8	Estadística	52
IX.	ESQUEMA DE TRABAJO	53
X.	RESULTADOS	54
X..1	Síndromes tóxicos (medición de peso, anorexia, caída de pelo y mortalidad)	54
X..2	Determinación de Hematocrito	60
X..3	Determinación del peso relativo de los órganos hígado, bazo y riñones.	65
X..4	Medición de la enzima TGP, TGO y LDH	70
X..5	Estudio Histopatológico	75
XI.	DISCUSIÓN	89
XII.	CONCLUSIONES	92
XIII.	GLOSARIO	93
XIV.	REFERENCIAS	96

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Página
Fig. 1	Localización del hígado.	11
Fig. 2	Estructura del hígado.	12
Fig. 3	Corte histológico hepático representando una tríada portal.	14
Fig. 4	Representación esquemática del lobulillo poligonal y del ácino elipsoidal hepático.	15
Fig. 5	Puntos de control del ciclo celular.	29
Fig. 6	Estructuras de las aflatoxinas.	38
Fig. 7	Biosíntesis de la aflatoxina B1.	39
Fig. 8	Unión de la Guanina con la molécula de AFB1	40
Fig. 9	Síndromes tóxicos de ratas tratadas con AFB1, AFB1 — NP y AFB1 — VE.	59
Fig. 10	Cortes histológicos de lesiones hepáticas de los lotes control y AFB1 durante 35 días.	78
Fig. 11	Cortes histológicos de lesiones hepáticas en los lotes control y AFB1 día 84	79

FIGURA		Página
Fig. 12	Cortes histológicos de lesiones en bazo y riñones de los lotes control y AFB1 durante 35 días.	80
Fig.13	Cortes histológicos de lesiones en bazo y riñones de los lotes control y AFB1 día 84	81
Fig. 14	Cortes histológicos de lesiones de hígado de los lotes AFB1 + NP y AFB1 + VE durante 35 días	82
Fig. 15	Cortes histológicos de lesiones de bazo y riñones de los lotes AFB1 + NP y AFB1 + VE día 35	83
Fig. 16	Cortes histológicos de lesiones en hígado, bazo y riñones de los lotes AFB1 + NP y AFB1 + VE día 85.	84
Fig. 17	Cortes histológicos de lesiones en hígado, bazo y riñones en los lotes AFB1 — NP y AFB1 — VE día 85	85
Fig. 18	Cortes histológicos de lesiones hepáticas de los lotes NP y VE durante 35 días	86
Fig. 19	Cortes histológicos de lesiones de bazo y riñones de los lotes NP y VE día 35	87
Fig. 20	Cortes histológicos en lesiones hepáticas, bazo y riñones de los lotes NP y VE día 85	88

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		Página
TABLA 1.	Pruebas Bioquímicas, Enzimáticas e Inmunológicas de Diagnóstico para las enfermedades relacionadas con Cáncer hepático.	21
TABLA 2.	Valores de referencia de pruebas Bioquímicas, Enzimáticas e Inmunológicas de Diagnostico para las enfermedades relacionadas con Cáncer hepático.	22
TABLA 3.	Genes de la línea celular HLE asociados al Hepatocarcinoma celular.	34
TABLA 4.	Elementos nutricionales del Nadian Plus	43

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ELISA	Inmunovaloración anti – HCV ligada a enzima
γ - GT	Gamma glutamil transferasa
HB	Hepatitis B
Hbe	Antígeno e de la hepatitis B
HC	Hepatitis C
HCC	Hepatocarcinoma Celular
H-E	Hematoxilina - Eosina
IVEHCV	Inmunovaloración con enzima del virus de Hepatitis C
LDH	Lactato deshidrogenasa
LCR	Líquido cefalorraquídeo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TGO	Transaminasa glutámico oxalacética
TGP	Transaminasa glutámico pirúvica
VHB	Virus de la Hepatitis B
VHC	Virus de la Hepatitis C
VHD	Virus de la Hepatitis D
VRIM	Valoración recombinante de inmunomancha

RESUMEN

La AFB1 es una toxina con actividad mutagénica y teratogénica; estas propiedades pueden variar dependiendo de la dosis ingerida, el tiempo de exposición, la especie, la raza, la edad y el sexo del individuo intoxicado (Pozzi y col., 2001; Wang, 1999). Afecta principalmente al hígado provocando lesiones como cirrosis (enfermedad crónica progresiva, caracterizada por la necrosis en células hepáticas de manera lenta por un periodo prolongado que puede inducir hepatocarcinoma celular u ocasionar la muerte) (Angel, 2001). Para valorar los posibles efectos terapéuticos del Nadian Plus (NP) (Suplemento alimenticio de origen natural que contiene vitaminas como la A, B, C, D, E y K; además contiene minerales como el calcio, magnesio, fósforo, hierro y potasio; y derivados de la colmena como la miel de abeja, el propóleo y el polen. Se le ha atribuido como auxiliar en el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas e infecciosas) nos dimos a la tarea de investigar su respuesta ante una enfermedad crónica hepática. Se realizó un estudio con 40 ratas macho Wistar tratadas previamente con aflatoxina B1 [1.5 ppb], durante 84 días; los días 0, 35 y 84 se les realizó una punción cardiaca y mediante pruebas bioquímicas (hematocrito, cuantificación de enzimas TGO, TGP y LDH), estudios histopatológicos (hígado, bazo y riñones) y la valoración de síndromes tóxicos, se valoró el daño ocasionado por la AFB1 así como los posibles efectos terapéuticos ocasionados por el NP. Los resultados mostraron que la AFB1 provocó algunos síndromes tóxicos como disminución de peso, caída de pelo, anorexia y mortalidad; a nivel bioquímico se observó disminución en el porcentaje del hematocrito, aumento en la concentración de las enzimas TGO, TGP y LDH; con relación a los estudios histopatológicos las ratas mostraron severo daño hepático, así como daño en bazo y riñones, sin embargo el NP pudo disminuir algunos síndromes tóxicos, contrarrestar las alteraciones bioquímicas manteniendo niveles normales en el porcentaje del hematocrito y en las concentraciones de las enzimas TGO, TGP y LDH provocados por la AFB1, y también podría estar disminuyendo el grado de lesiones presentes en los órganos de los animales tratados con AFB1. Estos resultados nos hacen sugerir que el NP podría estar minimizando los efectos provocados por la AFB1 debido a que las vitaminas que contiene tienen efecto antioxidante y además contribuyen en la regeneración celular; al igual que los minerales y los derivados de la colmena que podrían estar participando en reacciones bioquímicas del organismo que ayudan a contrarrestar los efectos provocados por la AFB1.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Características anatómicas e histológicas del hígado.

El hígado es el órgano más grande del cuerpo humano, mide aproximadamente 28 x 16 x 8 cm de espesor y pesa en el adulto normal 1400-1600 gr, representando el 2.5% del peso corporal; es considerado una glándula accesoria del sistema gastrointestinal de color rojo pardo. Está situado en el hipocondrio derecho, abarca del epigastrio a la parte más alta del hipocondrio izquierdo, está por debajo del diafragma y por encima del estómago y de las asas del intestino delgado; ubicado detrás de las tres últimas vértebras dorsales y a nivel de la línea axilar derecha a las siete últimas costillas (*Figura 1*) (Moore y Dalley, 2003). Tiene forma semiovoidea, posee una cara superior la cual está dividida en lóbulo derecho e izquierdo; una cara inferior que presenta dos surcos anteroposteriores de los cuales el derecho aloja a la vesícula biliar y a la vena cava inferior; el izquierdo aloja a la vena umbilical y al conducto venoso. En la parte media de ambos surcos, se encuentra el surco transversal que corresponde al hilio, el cual forma el límite posterior del lóbulo cuadrado y el límite anterior del lóbulo de Spiegel (Moore y Dalley, 2003); posee un borde anterior y uno posterior así como una extremidad derecha y una izquierda. El hígado en su mayor parte está revestido por la envoltura peritoneal, además forma algunos pliegues o ligamentos tales como el ligamento suspensorio, el coronario, el hepatocólico, el hepatorenal y el epiplón gastrohepático (*Figura 2*); la otra parte del hígado está cubierta por la cápsula de Glisson o envoltura fibrosa. Su principal irrigación sanguínea aferente se realiza a través de la vena porta, que transporta sangre escasamente oxigenada debido a que ha circulado a través de los intestinos, el páncreas y el bazo. La circulación hepática se lleva a cabo en los sinusoides y en consecuencia el hígado se interpone en el camino de los vasos sanguíneos que transportan las sustancias absorbidas por el tubo digestivo, esta posición le da al hígado la oportunidad de metabolizar, degradar o conjugar estas sustancias, pero también lo convierte en el primer órgano expuesto a los compuestos tóxicos ingeridos (Gartner y Hiatt, 2002).

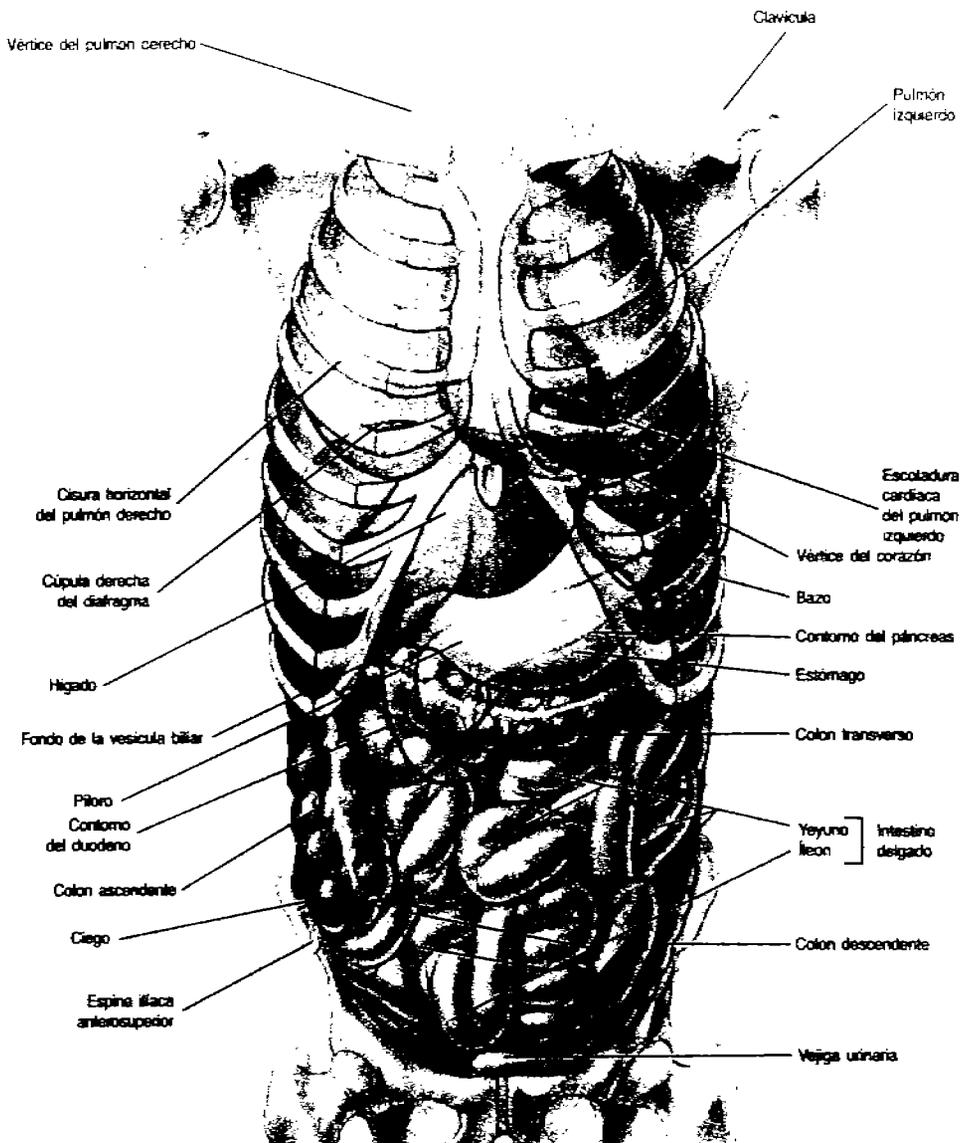


Figura 1. Localización del hígado. Se encuentra situado en el cuadrante superior derecho y parte del izquierdo, esta por debajo del diafragma y por encima del estómago y de los asas el intestino delgado, detrás de las tres últimas vértebras dorsales y a nivel de la línea axilar derecha (Moore y Dalley, 2003).

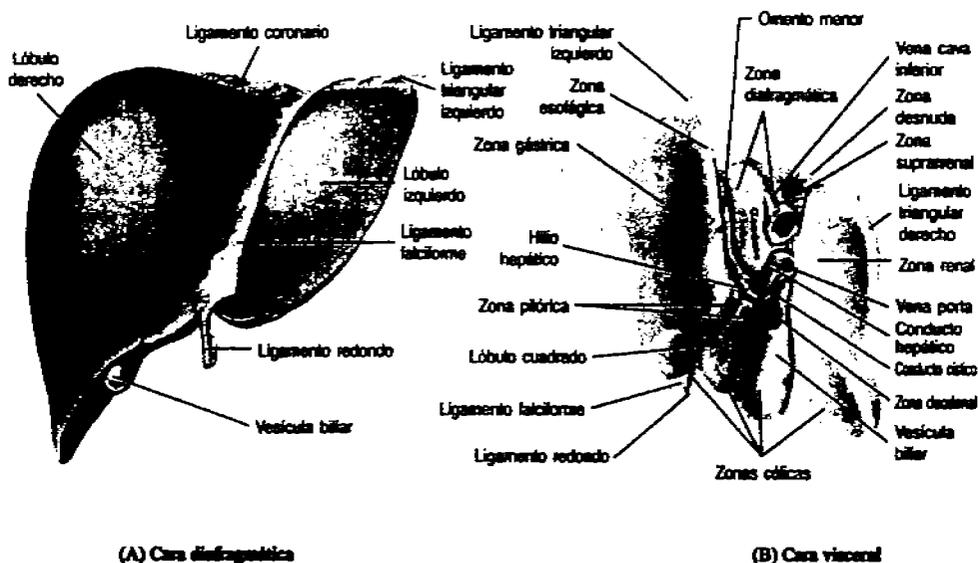


Figura 2.- Estructura del Hígado. Este órgano está constituido por (A) cara diafragmática y (B) cara visceral. La cara diafragmática tiene forma abovedada y se adapta a la cara inferior del diafragma, esta cara es muy convexa y se divide en porción superior, anterior, derecha y posterior. La cara visceral del hígado tiene una orientación inferior y posterior derecha (Ganong, 2002).

El hígado presenta un patrón de áreas hexagonales en las cuales las trabéculas perforadas compuestas por células parenquimatosas se disponen radialmente alrededor de una vena central. En tres de los ángulos de estas zonas esta presente una pequeña área triangular formada por tejido conjuntivo en cuyo seno se advierte la presencia de un conductillo biliar, una rama de la arteria hepática y una rama de la vena porta (triada portal) (Figura 3). Las ramas laterales de estos vasos que se observan a intervalos cortos en su trayecto, confluyen en los sinusoides hepáticos de pared delgada que ocupan los espacios que quedan entre las trabéculas dispuestas radialmente, y que drenan en la vena central. Por tanto, las trabéculas perforadas de células hepáticas están expuestas a un gran volumen de sangre que fluye en sentido centrípeto dentro de los sinusoides. La unidad poligonal antes aludida se ha denominado lobulillo hepático o clásico y es considerada la unidad estructural y funcional del hígado (Ross y col., 2001). Asimismo, en el endotelio de los sinusoides están anclados numerosos macrófagos (células de Kupffer) que se proyectan al lumen. El ácino hepático es una masa ovoidea de células parenquimatosas que rodea cada arteriola, vénula y conductillo biliar terminal, que a su vez se ramifica lateralmente desde el espacio porta; su centro consiste en un tallo vascular que contiene las ramas terminales de la vena porta, de las arterias hepáticas y de los conductos biliares, finalmente en cada extremo del ácino existe una vena central (Figura 4). La sangre fluye desde el tallo vascular hasta las vénulas hepáticas localizadas en el exterior de los ácinos. En esta vía las células más cercanas al tallo vascular reciben sangre mejor oxigenada, mientras que las células en la periferia del ácino son las menos oxigenadas, y de esta manera, más susceptibles a la lesión anóxica. Cada célula hepática se encuentra adyacente a varios canalículos biliares; los cuales drenan en los conductos biliares intralobulares y éstos se unen en la vía de los conductos interlobulares para formar los canales hepáticos derecho e izquierdo, estos se unen a su vez en el exterior del hígado para formar el conducto hepático común (Ganong, 2002).

En términos generales, los componentes estructurales hepáticos incluyen a los hepatocitos (células parenquimatosas), que constituyen el 80% de las células de este órgano, los cuales están organizados en trabéculas celulares; a el estroma de tejido conectivo (cápsula de Glisson), a los vasos sanguíneos y linfáticos, a los nervios autónomos eferentes que se distribuyen por el tejido conjuntivo, a los conductos biliares que transcurren por el estroma; a los sinusoides los cuales están recubiertos por células endoteliales típicas y a las células

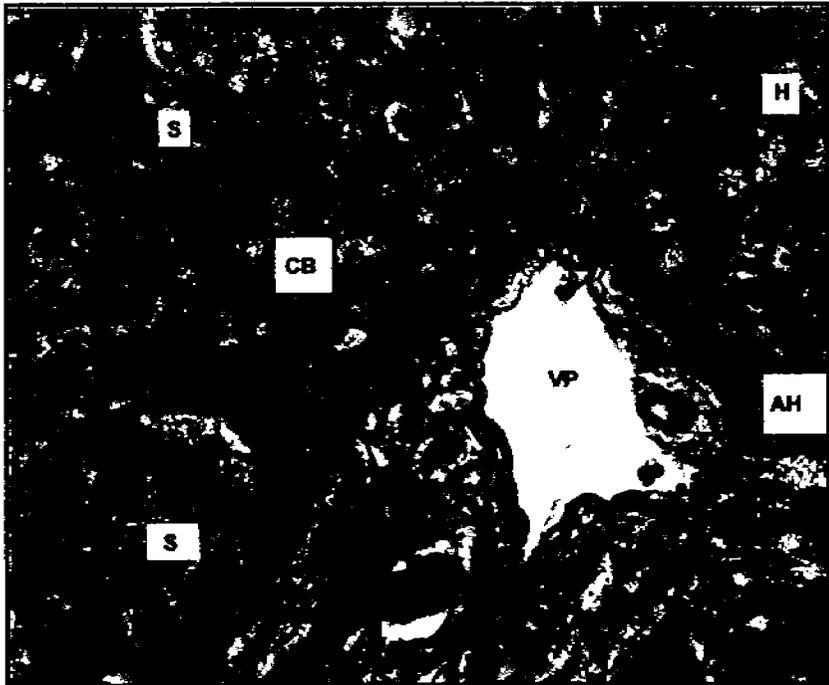


Figura 3. Corte histológico hepático representando a la tríada portal. Se observa una pequeña área formada por tejido conjuntivo, un conductillo biliar (CB), una rama de la arteria hepática (AH), una rama de la vena porta (VP), y a los sinusoides (S). (Ross y col., 2001).

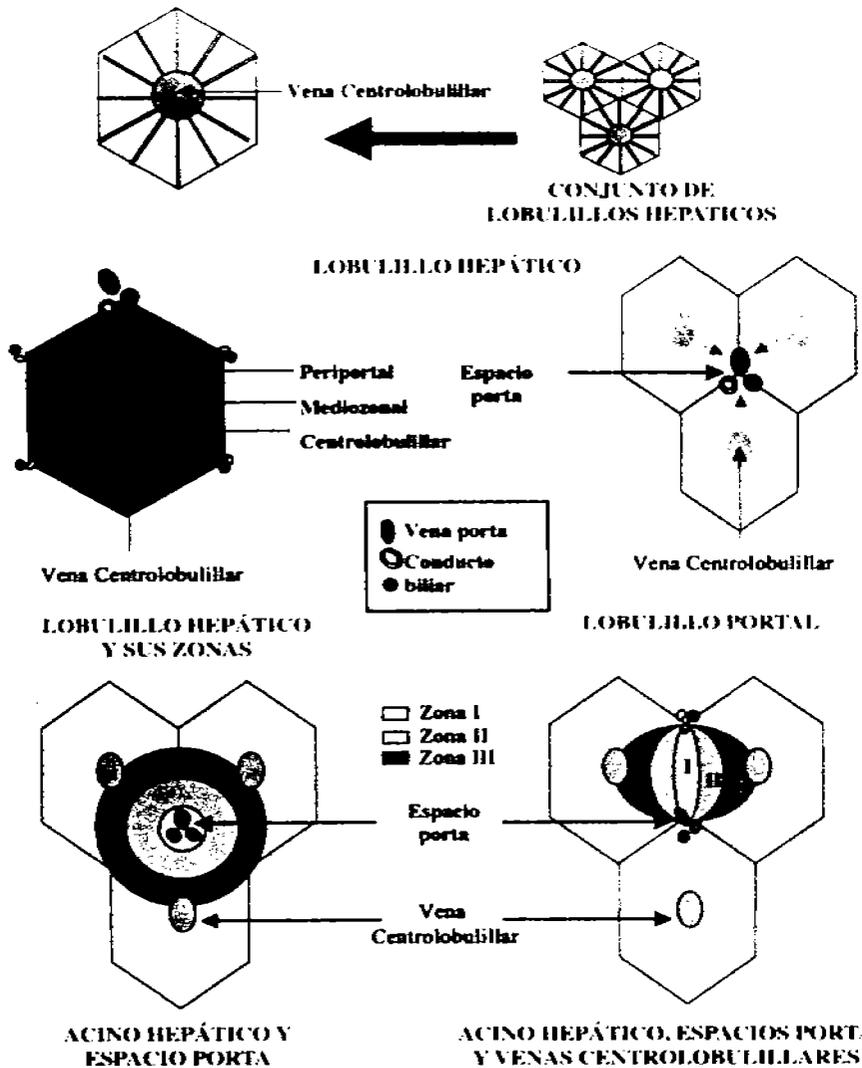


Figura 4. Representación esquemática del lobulillo poligonal y del ácino hepático espacial. El lobulillo muestra una típica tríada portal, constituida por ramas de la arteria hepática y de la vena porta, junto con un conducto biliar. En el ácino aparecen señaladas tres zonas que indican la posición relativa de las células en el ácino con respecto al gradiente de concentración de oxígeno en la sangre que fluye desde las ramas de la arteria hepática y de la vena porta (Cubillos y col., 2001).

de Kupffer; por debajo de los sinusoides se encuentra el espacio de Disse, el cual se conecta con los vasos linfáticos en los tabiques interlobulares (Ross, 2001).

L2 FISIOLÓGÍA DEL HIGADO.

El hígado es una glándula mixta exocrina y endocrina cuyas funciones son efectuadas por el hepatocito. Dicho órgano interviene en conversiones metabólicas de sustratos que provienen del tubo digestivo, el páncreas y el bazo. Algunos de los productos de estas conversiones metabólicas son transportados con la secreción exocrina denominada bilis. Las secreciones endocrinas son liberadas directamente al torrente sanguíneo que irriga el parénquima hepático, estas incluyen sustancias sintetizadas por los hepatocitos como la albúmina, la porción proteica de distintas variedades de lipoproteínas, las α y β globulinas, la protombina y las glucoproteínas (Ross, 2001).

1.2.1 Función exocrina.

La principal contribución del hígado al proceso digestivo es la secreción de bilis, que consiste en un fluido formado por colesterol, lecitina, ácidos grasos y sales biliares, los cuales reducen la tensión superficial; junto con los fosfolípidos y monoglicéridos producen emulsificación de las grasas para su digestión y absorción en el intestino delgado (Ganong 2002).

1.2.2 Función metabólica.

El hígado es el órgano encargado de realizar la mayoría de las funciones metabólicas, por ejemplo: mantiene la concentración de glucosa en la sangre, puede convertir compuestos como el ácido láctico, el glicerol y el ácido pirúvico en glucosa y más tarde en glucógeno (Gartner y Hiatt, 2002). Con relación al metabolismo de los lípidos genera un elevado índice de oxidación en los ácidos grasos para aportar energía en las funciones corporales, en la formación de las lipoproteínas, en la síntesis de colesterol y de los fosfolípidos, y en la conversión de los hidratos de carbono y de las proteínas en grasas. Desempeña también el metabolismo proteico donde se encarga de la desaminación de los aminoácidos, de la formación de la urea para eliminar el amoníaco de los líquidos orgánicos, y de las conversiones recíprocas entre los diferentes aminoácidos y compuestos para procesos

metabólicos del organismo. Además el hígado almacena vitaminas como la A, D y B₁₂, y el hierro en forma de ferritina. En el hígado también se lleva a cabo la formación de proteínas plasmáticas como la albúmina, las proteínas fijadoras de esteroides y las hormonas; se realiza la síntesis de fibrinógeno, protrombina, globulina aceleradora, factor VII y vitamina K. Este órgano, además es el responsable de la excreción de muchos fármacos (sulfamidas, penicilina, ampicilina, eritromicina), esteroides, hormonas, (tiroxina, estrógeno, aldosterona y cortisol), calcio y toxinas. Finalmente, la inmunidad que proporciona el hígado es a través de las células de Kupffer que funcionan como fagocitos, los cuales eliminan los restos celulares y las partículas extrañas, incluyendo microorganismos que pueden invadir la sangre desde la luz intestinal (Gartner y Hiatt, 2002; Ganong, 2002).

1.3 PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON CÁNCER DE HÍGADO.

1.3.1 Cirrosis Hepática.

Es una enfermedad progresiva crónica caracterizada por necrosis de células hepáticas de manera lenta por un periodo prolongado, hasta causar la muerte del individuo (Ángel, 2001). La cirrosis constituye la respuesta principal del hígado ante agresiones inflamatorias, tóxicas, metabólicas y congestivas que han actuado durante largo tiempo (Andreoli y col., 1999). Esta enfermedad es considerada una lesión premaligna, y el riesgo de un hepatocarcinoma celular (HCC) es muy alto cuando la cirrosis es causada por un trastorno metabólico, por un virus o por la ingesta del alcohol; que afecta tanto a venas centrales como a espacios portales y a nódulos regenerativos formados por células hepáticas sobrevivientes (Parakrama y Clive, 1999). Entre sus factores etiológicos interviene el alcoholismo, la obstrucción crónica del tracto biliar, desnutrición, necrosis hepática submasiva de la hepatitis viral, degeneración hepatolenticular o enfermedad de Wilson, sífilis, insuficiencia cardíaca congestiva y la hemocromatosis (Ángel, 2001). Macroscópicamente el hígado está crecido en etapas iniciales, pero al avanzar la enfermedad este se vuelve más pequeño debido a la pérdida de células y a la contracción fibrosa (Parakrama y Clive, 1999). Son diversos los factores que pueden causar lesión difusa del hígado y originar cuadros morfológicos distintos de cicatrización en su tamaño y distribución. La cirrosis es considerada una fase final de procesos patológicos diferentes, tomando en cuenta para su clasificación morfológica el tamaño de los nódulos, 1) el

miconodular (nódulos de igual tamaño o menores a 1cm), 2) macronodular (de distintos tamaños y mayores a 5 cm), 3) el mixto (macro y miconodular) y 4) la cirrosis septal incompleta (nódulos multilobular) (Kumar y col., 2004).

1.3.2 Hepatitis B.

Es una infección sistémica que afecta predominantemente al hígado; su agente causal es el virus de la hepatitis B (VHB) que puede producir una hepatitis de tipo: a) aguda, b) crónica progresiva, c) crónica progresiva que acaba en cirrosis, d) fulminante con necrosis hepática masiva, e) un estado de portador asintomático con o sin enfermedad subclínica progresiva, o f) un nicho para el virus D de la hepatitis (VHD). El VHB puede ser transmitido por vía percutánea, saliva, líquido seminal, LCR, ascitis, líquido sinovial, transmisión sexual y perinatal. Además, el VHB puede intervenir en el desarrollo del HCC (Kumar y col., 2004)).

1.3.3 Hepatitis C.

El agente causal de esta enfermedad hepática es el virus de la hepatitis C (VHC). Las vías de transmisión pueden ser por inoculaciones, por transfusiones sanguíneas, por hemodiálisis, por transplantes, por exposiciones percutáneas, por transmisión materno filial o por transmisión sexual. Esta lesión hepática activa al sistema inmune presentando folículos linfoides portales, elevación de linfocitos T citotóxicos, inducción de anticuerpos, actividad monocitaria elevada y producción de monocinas. Además presenta elevación de enzimas como: la transaminasa glutámico pirúvica (TGP), la transaminasa glutámico oxalacética y la lactato deshidrogenasa (tabla 1); por el lado citopático, se presenta una afectación lobulillar con escasa actividad periportal, también hay una correlación entre la respuesta bioquímica al interferón y la desaparición del RNA del VHC sérico y el curso progresivo de enfermos inmunosuprimidos (Kumar y col., 2004). Si después de 6 meses las transaminasas siguen elevadas, la hepatitis B y C pueden evolucionar a crónica elevando el número y localización de las células inflamatorias (Andreoli y col., 1999). Aproximadamente el 40% de los enfermos con hepatitis B crónica avanzan a necrosis y a la fase terminal con riesgo a padecer HCC (Moore y col., 2004), mientras que los enfermos con hepatitis C crónica muestran una evolución natural prolongada y de avance lento; al

parecer solo un 10% de estos enfermos desarrollan cirrosis y un porcentaje menor avanzan hacia la fase terminal y al HCC (Kumar y col., 2004).

1.3.4 Hepatocarcinoma Celular (HCC).

Son varios los factores que pueden inducir al HCC, por ejemplo, hay evidencias que la infección por el virus de hepatitis B y C pueden ser causantes de HCC, así como los azocompuestos (Altman y Sargi, 2000). Además, las aflatoxinas también son muy tóxicas para las células hepáticas (Stettler y Sengstag, 2001). Más del 80% de pacientes que desarrollan HCC presentan cirrosis hepática; así como un recambio celular creciente en los nódulos regenerativos que se interpretan como alteraciones displásicas premalignas. El HCC se presenta como una masa solitaria grande, con nódulos múltiples o como lesión difusa infiltrante, las células hepáticas son anormales con diferenciación variable dispuestas en cordones separados por sinusoides, tienen núcleos crecidos y muestran nucléolos prominentes, en algunos casos se presenta bilis en su citoplasma (Kumar y col., 2004).

1.3.4.1 Etapas del hepatocarcinoma celular.

Se presenta en tres fases o etapas: **La primera** es cuando el cáncer está confinado a una porción del hígado y el tumor puede ser extirpado. **La segunda** comprende cuando el cáncer aparece en gran parte del hígado y el tumor no puede ser extirpado, y **la tercera etapa** corresponde cuando el tumor se ha extendido por todo el hígado y por otros órganos, por vía linfática a ganglios, y por vía hematogena para producir metástasis pulmonar (Parakrama y Clive, 1999; Altman y Sargi, 2000).

1.4 SINTOMAS Y DIAGNÓSTICO.

Generalmente los síntomas del hepatocarcinoma no aparecen en etapas tempranas (Altman y Sargi, 2000) pero debe sospecharse HCC cuando un paciente presenta dolor y tumoración abdominal, pérdida de peso, deterioro de la función hepática, fiebre, hemorragia intraperitoneal, embolias pulmonares, ictericia y obstrucción de las venas hepáticas (Kumar y col., 2004). Macroscópicamente el hígado está crecido en etapas iniciales, pero al avanzar la enfermedad este se vuelve más pequeño debido a la pérdida de células y a la contracción fibrosa (Parakrama y Clive, 1999). La *tabla 1* muestra las pruebas bioquímicas, enzimáticas

e inmunológicas para el diagnóstico de las patologías relacionadas con cáncer hepático (Morrison, 1999). Las enzimas LDH, TGP y TGO están presentes en el citoplasma de los hepatocitos. Además la TGO se puede encontrar en mitocondrias. Cuando se presenta una lesión leve, la membrana plasmática (MP) del hepatocito es dañada liberando de su citoplasma LDH, TGO y TGP. En una agresión hepatocelular mas grave, la lesión mitocondrial provoca la liberación de la TGO de las mitocondrias y la TGP del citoplasma elevando los valores hasta 1500 U/L (Tabla 2) (Rodríguez A, 2001).

1.5 TRATAMIENTO.

El tratamiento del HCC depende de la etapa de la enfermedad, del estado general de salud del paciente y de otros factores. Se puede extirpar la parte dañada del hígado, además se puede utilizar radioterapia, quimioterapia, trasplante de hígado, hipotermia, terapia biológica (Altman y Sargi, 2000). En algunos modelos de animales, la vitamina E llega a inhibir la formación de nitrosaminas carcinógenas; además modifica la aparición de neoplasias y la conducta de las mismas. En general se ha sugerido que las dietas que contienen grandes cantidades de vitaminas antioxidantes participan a controlar un poco el riesgo de enfermedades malignas (Goodman y col., 2003).

Tabla 1. Pruebas de diagnóstico (bioquímicas, enzimáticas e inmunológicas) para enfermedades relacionadas con cáncer hepático (Morrison, 1999).

Pruebas Diagnósticas	Cirrosis Hepática	Hepatitis B	Hepatitis C	Carcinoma Hepatoceleular
Ácido úrico	↓	—	—	—
Alfa-proteína	—	—	—	(+)
Amoníaco	↑	—	—	—
Albúmina	↓	↓	↓	↓
Bilirrubina Total	↑	↑	↑	—
Bilirrubina Urinaria	—	(+)	(+)	—
Colesterol	↓	↓	↓	↓
Cuenta eritrocitaria	—	—	—	↓
Cuenta leucocitaria	—	↑ Linfocitos T citotóxicos y células NK	↑ Linfocitos T citotóxicos	↓
Fosfatasa Alcalina	↑	—	—	—
γ-GT	↑	↑	↑	—
Globulinas	↑	↑	↑	↑
Hematocrito	—	—	—	↓
LDH	—	↑	↑	↑
PCR	Si se realiza	Si se realiza	Si se realiza	Si se realiza
TGO	—	↑	↑	↑
TGP	↑	↑	—	↑
Pruebas Inmunológicas	—	- Ag. superficie HB. Ac. superficie HB. - Ag. - ac. HBe. Ac. Central HB.	(IVE HCV). (ELISA). (VRIM).	—
Biopsia	Si se realiza	Si se realiza	Si se realiza	Si se realiza

(↑ = aumentados; ↓ = disminuidos; (+) = prueba positiva).

Tabla 2. Valores de referencia de las pruebas de diagnóstico (bioquímicas, enzimáticas e inmunológicas) para enfermedades relacionadas con cáncer hepático (Rodríguez A, 2001).

Pruebas Diagnósticas	Valores de referencia
Ácido úrico	M: 2.3 - 7.3 mg/dl H: 3.0 - 8.6 mg/dl
Amoníaco	0 - 150 µg /dl
Albumina	3.4 - 5.4 g/dl
Bilirrubina Total	0.2 - 1.1 mg/dl
Colesterol	140 - 310 mg/dl
Cuenta eritrocitaria	M: 4.2 - 5.3 x 10 ⁶ cél/mm ³ H: 4.4 - 5.7 x 10 ⁶ cél/mm ³
Cuenta leucocitaria	4.0 - 10 x 10 ³ cel/mm ³
Fosfatasa alcalina	21 - 91 UI/L
γ-GT	9 - 60 UI/L
Globulinas	2.0 - 3.6 g/dl
Hematocrito	39 - 51 %
LDH	60 - 220 UI/L
TGO	0 - 41 UI/L
TGP	0 - 50 UI/L

(M: mujeres; H: hombres; mg/dl: miligramos por decilitro; µg /dl: microgramos por decilitro; g/dl: gramos por decilitro; cel/ mm³: células por milímetro cúbico; %: tanto por ciento; UI/L: unidades internacionales por litro).

II. CÁNCER

El término **cáncer** se refiere a un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento autónomo de células anormales (neoplásicas); es el resultado de una pérdida en la regulación de las funciones celulares como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis; sin la restricción apropiada de los procesos mencionados, las células neoplásicas se reproducen en gran número, invaden estructuras adyacentes y desarrollan colonias metastásicas de manera progresiva. El cáncer es un proceso que consta de múltiples etapas (iniciación, promoción, progresión y metástasis) en el que se tienen que producir numerosas alteraciones genéticas, generalmente a lo largo de años (Schwartz y col., 2000). La mayoría de las alteraciones son mutaciones somáticas, las cuales derivan translocaciones cromosómicas, deleciones, inversiones, amplificaciones o mutaciones puntuales; estas alteraciones pueden determinar la función de activar oncogenes, los cuales son efectores positivos de la transformación morfológica y la tumorigenicidad de las células primarias. Los genes de supresión tumoral son reguladores negativos del crecimiento y la pérdida de su función conlleva a promover la carcinogénesis (De Vita y col., 2000). La primer etapa del cáncer, "*iniciación*", es la exposición constante de agentes genotóxicos (unión de metabolito carcinógeno electrofilico al DNA) que inducen cambios en el material genético o mutaciones decisivas al DNA parental. La segunda etapa, "*Promoción*", es la exposición de las células iniciadas a moléculas que inducen su proliferación, la cual permite otras mutaciones espontáneas que culminan en la expresión de fenotipo maligno (transformación maligna). La etapa de "*Progresión*" describe el desarrollo sucesivo de un mayor crecimiento local e invasivo culminando con la etapa final, "*metástasis*", de las células transformadas (Schwartz y col., 2000).

II.1 CARCINÓGENOS

Se pueden clasificar en 3 tipos:

II.1.1 Carcinógenos Físicos (rayos ultravioletas y radiación ionizante).

Estos agentes pueden aumentar la proliferación celular durante cierto tiempo, lo cual podría ocasionar cambios en el material genético de tipo puntual.

II.1.2 Carcinógenos Químicos.

Estos agentes requieren ser metabolizados a partir de un procarcinógeno para producir intermediarios electrofílicos. El daño al DNA depende del equilibrio entre la tasa de oxidación de los intermediarios carcinógenos y la tasa de detoxificación de estos productos oxidativos a través de la conjugación con glutatión y ácido glucurónico. Entre estos carcinógenos químicos se encuentran hidrocarburos policíclicos (benzopireno), aminas aromáticas (β -naftilamina, bencidina, aminofluorenos) y metales pesados (níquel, cadmio, cromo, arsénico, plomo) entre otros.

II.1.3 Carcinógenos Virales.

Algunos virus son capaces de introducir su material genético en las células huésped ocasionando cambios morfológicamente compatibles con la transformación neoplásica. Dentro de los virus capaces de ocasionar estos cambios se encuentra el virus de Epstein-Barr, el de la hepatitis B, el del papiloma humano subtipos 16 y 18, y el virus del Sarcoma de Kaposi (Schwartz y col., 2000).

II.2 Oncogenes y genes de supresión tumoral.

La definición de un oncogén exige la demostración experimental de que el producto de ese gen contribuye a la transformación maligna de la célula; pueden clasificarse en oncogenes nucleares como MYC, en citoplasmáticos como RAS, en factores de crecimiento anormalmente activados como Her2/neu y c-FMS, en moléculas transmisoras de señales intracelulares como c-SRC, RAS y c-RAF y en factores nucleares de la transcripción como c-MYC (Weinberg, 1985).

Los mecanismos de los oncogenes alteran simultáneamente diversos aspectos de control en el crecimiento (ciclo celular y apoptosis). Las células están en todo momento tomando decisiones relativas a su división, diferenciación o muerte celular programada (apoptosis); estos procesos afectan en gran medida el número neto de las células (Alberts y col., 2002). Las sustancias carcinogénicas afectan a genes que determinan la mutabilidad del DNA, codificando proteínas que participan en la respuesta celular a daños en el DNA. Las lesiones oncogénicas afectan con frecuencia a la maquinaria interna que regula el ciclo

celular y a las rutas de transmisión de señales que acoplan los factores de crecimiento a dicha maquinaria (Cooper, 1995).

Los protooncogenes son los reguladores de los procesos biológicos normales, desempeñan funciones en el control del crecimiento celular, en la proliferación, en la apoptosis, en la estabilidad del genoma y en la diferenciación (De Vita y col., 2000). La mayoría de los protooncogenes y genes de supresión tumoral intervienen directamente en la regulación del ciclo celular normal; las mutaciones que dan lugar a una nueva función y activan a los oncogenes, activan de forma permanente a los componentes de las cascadas de transducción, por ejemplo la activación de RAS, con menos frecuencia afecta a reguladores positivos del ciclo celular (ciclina). Los protooncogenes nucleares median el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, a la apoptosis, a la estabilidad del genoma y a la maduración celular. De igual manera, las mutaciones en algunos genes de supresión tumoral pueden bloquear la inhibición del ciclo celular (Cooper, 1995).

II.2.1 Transducción de señales.

Los productos de los oncogenes pueden evitar la dependencia del factor de crecimiento si actúan como ligandos o como receptores. Muchos factores que regulan el crecimiento celular actúan de forma coordinada para activar las múltiples rutas como la de RAS, la de la fosfolipasa C (PLC), la de SRC y la ruta de las cinasas Janus (JAKs) que actúan en concierto con las proteínas STAT. Las diferentes respuestas celulares se producen por el reclutamiento diferencial de proteínas transmisoras de señales y por la activación de las rutas. Cada punto de control de estas rutas puede constituir el objetivo de la desregulación producida por las oncoproteínas, éstas pueden no presentar ninguna alteración en su estructura normal pero se expresan en exceso; en el caso contrario serían proteínas mutadas o truncadas. En términos generales, las oncoproteínas pueden obligar a la célula a sufrir una división descontrolada o un crecimiento invasivo (De Vita y col., 2000).

La ruta RAS está relacionada con la recepción celular de señales a través de los receptores de tirosina cinasa; una vez activadas las proteínas RAS intervienen en la activación de la transcripción, transformación celular y otras funciones efectoras (Bos, 1987). La principal función bioquímica de estas proteínas es la capacidad de unirse a nucleótidos de guanina; esta característica sugiere que estas proteínas funcionan igual que otras proteínas G que

pasan del estado inactivo por unión al difosfato de guanina (GDP) al estado activo por unión al trifosfato de guanina (GTP). En los cánceres humanos, los receptores oncogénicos son activados por amplificación génica (exceso de expresión), y/o por mutaciones puntuales (Mulligan, 1993).

El gen c-MYC es un componente esencial de las rutas de señalización que median la transformación celular por acción de una serie de oncoproteínas, como BCR-ABL (Sawyers y col., 1992). Además, c-MYC interviene en la progresión del ciclo celular provocando la activación de las ciclinas E y A en las células quiescentes (Jansen y col, 1993), también participa en la apoptosis y regula directamente a la proteína p53. El gen retinoblastoma (RB) se identificó como un gen de supresión tumoral; las mutaciones en este gen no se restringen solo a los retinoblastomas hereditarios, sino que también produce proteínas que regulan directamente a las ciclinas (A, D y E) y a las cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) (Baldin y col., 1993). De todos los genes de supresión tumoral identificados, los únicos que están relacionados con la maquinaria del ciclo celular son pRB y p53; la expresión de pRB provoca a que se inhiba la progresión del ciclo celular de la fase G₁ a la S por unión a E2F-1 y c-abl. Por otro lado, p53 inhibe la progresión del ciclo celular por la activación del complejo ciclina/cdk, p21, de manera que está no puede fosforilar sustratos como pRb. Además, p53 actúa controlando el crecimiento de tumores, hacia las rutas apoptóticas y a los puntos de control del ciclo celular (Yin y col., 1992).

IL3 APOPTOSIS.

Es un proceso dependiente de ATP en el que la célula se autodestruye siguiendo un programa ordenado de proteólisis, de degradación de ácidos nucleicos e involución celular. A nivel bioquímico, se activan endonucleasas y proteasas, y el DNA celular es digerido y escindido en fragmentos. También, se presenta una alteración del ciclo celular que puede ocurrir por infección vírica, por activación de oncogenes o pérdida de los supresores tumorales que regulan el ciclo celular. La expresión elevada de la proteína BCL-2 es capaz de bloquear la apoptosis incluso en presencia de altos niveles de p53 en el interior de la célula (Chiou y col., 1994). Además evita la muerte celular inducida por daños oxidativos, por ello, actúa como antioxidante o secuestrador de radicales libres. BCL-x está estrechamente relacionada con BCL-2, la cual ayuda a controlar la muerte celular, mediante

un proceso alternativo de corte y empalme, BCL-x produce dos variedades, BCL-xS (isoforma corta) y BCL-xL (isoforma larga), BCL-2 y BCL-xL inhiben el proceso de apoptosis y contribuyen a la sobrevivencia de la célula y resistencia de daños contra esta. Además interactúan con Bax que es otro miembro de la familia BCL-2, el cual es activado por p53 y es considerado un regulador central de la apoptosis, es decir promueve la muerte celular programada (Xiao y col., 2002). Además, la unión de BCL-2 y BCL-Xl con Bax puede bloquear la capacidad para inhibir la apoptosis; por lo tanto, la modulación de las cantidades de Bax/ BCL-2 en el interior de la célula son fundamentales para que las células tomen la decisión de programarse para la muerte celular (Miyashita y Reed, 1995).

II.4 CICLO CELULAR.

Las fases funcionales del ciclo celular son la copia exacta del DNA, conocida como la fase S o de replicación del material genético, y la segregación exacta de conjuntos duplicados de cromosomas entre las células hijas, llamada fase M o mitosis (Alberts y col., 2002). Las células que no se dividen de forma activa pueden abandonar para siempre este ciclo por diferenciación terminal o pueden permanecer durante un cierto tiempo en un estado de latencia o de reposo conocido como G₀. El mecanismo de control intracelular puede verse influenciado por varios factores extracelulares como los factores de crecimiento, los mitógenos, los antimitógenos, los inductores de la diferenciación, el contacto entre células (uniones GAP) y la disponibilidad de los nutrientes (Hartwell y Kastan, 1994). Las Cdks controlan las transiciones del ciclo celular a través de las ciclinas; las Cdks pueden verse inhibidas por cambios en los niveles de las ciclinas D y E que se sintetizan y se degradan en etapas específicas del ciclo celular, o ser inactivadas por fosforilación en residuos de treonina 14 y tirosina 15; también pueden reactivarse por fosfatasa que actúan en los mismos sitios. Las proteínas inhibitoras de Cdks pueden evitar tanto la formación de los complejos ciclina/cdk como la activación de la Cdk en estos complejos. El complejo ciclina/cdk activado fosforila los sustratos necesarios para la transición a la siguiente fase del ciclo celular (De Vita y col., 2002).

II.4.1 Transiciones del ciclo celular.

Cuando las señales mitógenicas estimulan a una célula para que abandone su estado de reposo e inicie el ciclo celular, la expresión de la ciclina D aumenta durante toda la fase G₁ mientras esta presente algún factor de crecimiento. El complejo ciclina D/cdk4 o 6 activado fosforila a la proteína del retinoblastoma (RB), la cual tiene unidos factores de transcripción. El complejo E2F puede activar la transcripción de genes cuyos productos son necesarios para iniciar la fase S del ciclo celular (Nevins, 1994). Entre los productos génicos que son activados por los complejos E2F al final de la fase G₁ se encuentran una serie de proteínas, como la dihidrofolato reductasa, la DNA polimerasa α y la timidina cinasa (Nevins, 1994). La familia de proteínas inhibidoras de las Cdk (p21, p27, y p57) bloquean la actividad de la cinasa de los complejos ciclina D/Cdk4, ciclina D/Cdk6, ciclina E/Cdk2 y ciclina A/Cdk2 (Lee y col., 1995). Otras proteínas inhibidoras de las Cdk (p15, p16, p18 y p19) también pueden inhibir específicamente a los complejos ciclina D/cdk4 y cdk6 (Hirai y col., 1995).

Una vez que la célula ha copiado con éxito todo su genoma (fase S), en la mayoría de las células se produce una pausa en el ciclo celular conocida como fase G₂. La transición de la fase G₂ a la mitosis está estrictamente regulada por Cdk y ciclinas análogas a las que regulan la transición de G₁ a S. El factor promotor de maduración (MPF) es un complejo de ciclina B y cdk2, el cual es un regulador importante en la transición de la fase G₂ a la mitosis. Durante la mitosis los cromosomas se condensan y se segregan, finalmente la membrana nuclear se reconstruye, el huso mitótico desaparece, los cromosomas se descondensan y la membrana celular se invagina para completar la citocinesis (Alberts y col., 2002).

II.4.2 Puntos de control en el ciclo celular

Una serie de acontecimientos extracelulares (como la privación de nutrientes, cambios en la temperatura) o intracelulares (agotamiento de nucleótidos o daños en el DNA) pueden determinar el bloqueo del ciclo celular en alguna fase. Estas dependencias ordenadas, llamados puntos de control, están controladas por la regulación de ciertos productos génicos implicados en la progresión del ciclo celular (*Figura 5*).

PUNTO DE CONTROL G_2

PUNTO DE CONTROL DE LA METAFASE

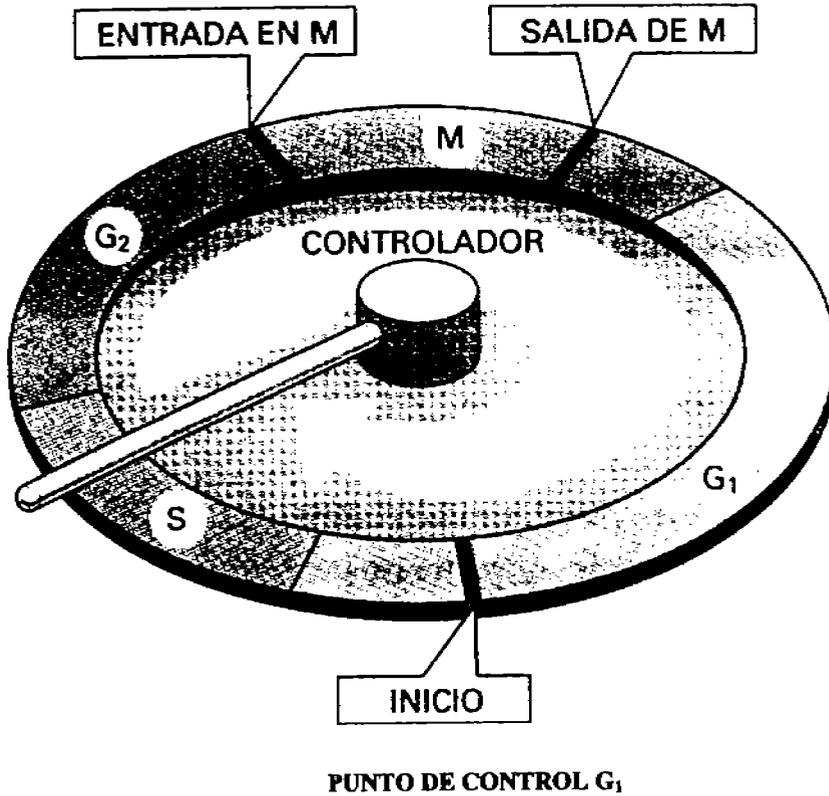


Figura 5. Puntos de control del Ciclo Celular. Durante el ciclo celular, el sistema de control está regulado por factores de retraso que pueden parar el ciclo en unos puntos de control determinados. En ellos, las señales de retroalimentación que contienen información sobre los procesos subordinados pueden retrasar el avance del propio sistema de control, evitando que éste desencadene el proceso siguiente sin que el anterior haya terminado (Alberts y col., 2002)

La presencia de daños en el DNA provoca un aumento de los niveles de proteína de p53 que activa la transcripción del gen p21. El aumento de expresión de este gen inhibe la El gen de supresión tumoral p53 es un componente crítico de la ruta de transmisión de señales que permite la parada del ciclo celular en G₁ cuando el DNA ha sufrido daños actividad de los complejos ciclina E/Cdk2, impidiendo así la fosforilación de Rb y bloqueando de esta manera la transición de la fase G₁ a la S del ciclo celular (Slebos y col., 1994). Además, p53 parece estar mutado en un gran porcentaje de cánceres humanos. La pérdida de la función normal de p53 puede originar la replicación inadecuada del DNA o la supervivencia de células que están programadas a la muerte celular (Hollstein y col., 1991).

II.5 Desarrollo del cáncer.

El término cáncer engloba un conjunto de enfermedades malignas, lo forman múltiples subpoblaciones de células con diferentes características genéticas, bioquímicas e inmunológicas (Fidler, 1995). Las células cancerosas presentan diversas anomalías fenotípicas como: 1) la desregulación del control del ciclo celular y la alteración de su crecimiento, 2) la pérdida de la diferenciación, 3) invasividad, y 4) la resistencia a los fármacos. La transformación de una célula normal en una célula tumoral parece deberse a mutaciones en genes que controlan el ciclo celular. La activación de los oncogenes y el aumento de su expresión o actividad en las células tumorales llevó a sugerir que la anomalía en las células tumorales consistía en la presencia de una señal excesiva que obligaba a las células a avanzar en el ciclo celular. El descubrimiento de los genes de supresión tumoral contribuyó a proponer que la alteración del crecimiento en las células tumorales se debía a un defecto de inhibidores del ciclo celular (supresores tumorales) y a un exceso de aceleradores del mismo (oncogenes). Este modelo ha reconocido la importancia de los controles de la muerte celular para el mantenimiento de un número adecuado de células en un tejido. Los cambios en el número de células de un tejido vienen dictados por las nuevas células generadas y por el número de células que ese tejido pierde por muerte celular, el cual depende de la actividad relativa de los productos génicos que bloquean la apoptosis (genes antiapoptóticos) y los que la promueven (genes apoptóticos). La formación de tumores y el crecimiento en número de las células malignas adquiridas por mutaciones en los genes que originan un estímulo para la progresión o inhibición del ciclo

celular, así como un aumento en las señales antiapoptóticas y una disminución de las señales proapoptóticas, nos llevan a un desarrollo células cancerosas en el ciclo celular, además en estas células se han identificado algunos productos génicos anormales que activan la proliferación y que inhiben la diferenciación celular. En la etapa de metástasis se generan una serie de acontecimientos interactivos e interdependientes en las células tumorales, que con el tiempo tienen que sobrevivir a una serie de interacciones con los mecanismos homeostáticos del huésped los cuales dan origen a las diferentes neoplasias (Liotta y col., 1991). Dentro de los acontecimientos interactivos se encuentran: a) la proliferación progresiva de las células neoplásicas se ve favorecida por los nutrientes que aporta el microentorno del órgano, b) la neovascularización o angiogénesis que es necesaria para que la masa tumoral pueda crecer más allá de 1-2 mm de diámetro, c) los capilares y las vénulas de la pared delgada (canales linfáticos) constituyen las rutas más frecuentes para la entrada de las células tumorales al torrente circulatorio, d) los receptores celulares que presentan las células tumorales pueden responder a factores de crecimiento paracrinos y de esa forma, proliferar en el parénquima del órgano, e) las células metastásicas tienen que evitar ser destruidas por las defensas del huésped, a través de respuestas inmunes específicas e inespecíficas. La metástasis pueden dar lugar a otra nueva metástasis, lo que se conoce como el fenómeno de la metástasis de metástasis (Hart y col., 1989).

II.5.1 Angiogénesis.

La angiogénesis consiste en una serie de procesos secuenciales que se inician en las células endoteliales microvasculares, para formar brotes capilares, estas células tienen que proliferar, migrar y penetrar en el estroma del huésped. Posteriormente, los brotes capilares se expanden y sufren morfogénesis para dar origen a un capilar. Aunque la mayoría de los tumores sólidos están altamente vascularizados, sus vasos no son iguales a los de los tejidos normales; existen diferencias en su composición celular, en su permeabilidad, en su estabilidad y en la regulación de su crecimiento (Folkman, 1995).

La inducción de la angiogénesis está mediada por una serie de moléculas liberadas tanto por las células tumorales como por las células del huésped (endoteliales, epiteliales, mesoteliales y leucocitos). Entre las moléculas liberadas se encuentran miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento de células

endoteliales vasculares (VEGF), el factor de permeabilidad vascular (VPF), la interleucina 8, la angiogenina, la angiotropina, el factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF), el factor de crecimiento transformante α (TGF- α), el TGF β y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Nagy y col., 1995). Por el contrario, numerosas células neoplásicas pasan de un fenotipo inhibidor de la angiogénesis a otro que la estimula. Mientras que las neoplasias benignas están poco vascularizadas y tienden a crecer despacio, los tumores malignos están muy vascularizados y crecen de prisa. Cuando hay una vascularización mayor también aumenta la probabilidad de que las células tumorales penetren en el torrente circulatorio y estimulen la metástasis (Folkman, 1995).

11.5.2 Invasión de las células tumorales

La invasión del tumor al tejido y la penetración de células anormales en los vasos sanguíneos y linfáticos es vital para el fenómeno de la metástasis. Tres mecanismos pueden explicar la invasión de las células tumorales a los tejidos: 1) la rápida multiplicación de las células malignas que ocasiona el crecimiento y la infiltración por presión mecánica, 2) la cohesión disminuida entre las células tumorales, acompañada de un aumento en su movilidad, y 3) la destrucción de los tejidos del huésped por enzimas liberadas de células tumorales. Una vez que las células tumorales se separan del tumor primario, tienen que invadir el estroma del huésped para luego penetrar en los vasos sanguíneos y linfáticos; además de atravesar la membrana basal que rodea a los vasos sanguíneos. Las membranas basales y la matriz extracelular del tejido conectivo (MEC) están formadas por colágeno, elastina, glicoproteínas y proteoglucanos (Kohn y Liotta, 1995). Las células tumorales metastásicas se adhieren al colágeno de tipo IV de las membranas basales y provocan la degradación de los componentes de la MEC y de las membranas basales, el cual es un requisito previo esencial para la invasión y la metástasis (Nakajima y Chop, 1991).

Las células tumorales pueden invadir directamente el sistema linfático o acceder a él a través de los vasos sanguíneos, lo que indica que existen comunicaciones venolinfáticas a través de los espacios intersticiales de los ganglios linfáticos y otros tejidos. La formación de metástasis hematógenas se caracteriza por una serie de etapas: a) penetración de los vasos sanguíneos y/o linfáticos, b) liberación y supervivencia de agregados de células tumorales en el torrente circulatorio, c) detención y adhesión de los agregados en los

canales vasculares de los órganos distantes, d) invasión de la pared de los vasos sanguíneos por las células tumorales, y e) extravasación al tejido adyacente, multiplicación, crecimiento del estroma y del tumor (Glaves, 1983).

La última etapa en el proceso metastásico es la proliferación de las células tumorales. La presencia de factores de crecimiento estimuladores o inhibidores en un cierto tipo de tejidos, se correlacionan con la formación de metástasis en sitios específicos. Cuando un órgano como el hígado sufre daños, se liberan factores como el TGF- α para estimular la reparación normal de los tejidos; por desgracia, este factor también puede estimular la proliferación de las células tumorales malignas receptivas.

Una neoplasia es una masa anormal de tejido que ataca al huésped en la medida en que crece y compite con los tejidos y células normales por el suministro de energía y los sustratos nutritivos (Kumar y col., 2004). Las neoplasias son biológicamente heterogéneas y el proceso metastásico es altamente selectivo. Las células obtenidas de diferentes tipos de tumores muestran diferencias en cuanto su morfología, a su tasa de crecimiento, a los cariotipos, a las características metabólicas, al potencial antigénico e inmunogénico, a la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, a los receptores hormonales y a la sensibilidad a los fármacos (Fidler, 1995).

Algunos tumores pueden originarse de células que han sufrido transformaciones múltiples; no obstante, la mayoría de los cánceres humanos proceden de una única célula transformada. En conjunto la metástasis favorece la supervivencia y el crecimiento de un reducido número de subpoblaciones celulares que ya existen en la neoplasia primaria. Los tumores forman metástasis en órganos específicos con independencia del nivel de flujo sanguíneo, la vascularización y el número de células tumorales que alcanzan el órgano (Alberts y col., 2002).

II.6 Oncogenes que inducen hepatocarcinoma celular (HCC).

El mecanismo molecular del HCC actualmente se desconoce; sin embargo el desarrollo y la progresión del tumor envuelve una cascada de alteraciones genéticas entre las cuales se encuentra la expresión de 30 genes de la línea celular HLE (epithelial like cells) presentes en el HCC (Tabla 3) (Liu y col., 2003). Cuando el gen Ras se expresa en exceso o se activa por una transformación celular se presenta una mutación puntual, dichas mutaciones actúan

Tabla 3. Genes de la línea celular HLE asociados al Hepatocarcinoma celular. Se muestran 30 genes, los cuales se dividen en 22 genes reguladores positivos y 8 genes reguladores negativos del ciclo celular; entre los cuales encontramos factores de transcripción, factores de crecimiento, factores antiapoptóticos factores apoptóticos y genes supresores (Liu y col., 2003).

Gen	Proteína / gene
F6k	TDGF1 + TDGF2 +TDGF3.
B7G	SKY (DTK) (TYRO 3) (RSE).
A5b	ERK cinasa activadora 1; MAPK/ERK Cinasa 1 (MEK 1).
C5f	Receptor del sustrato del factor de crecimiento epidrmaal.
E5b	Inhibidor 1 de disociación de Rho GD.
D6c	Semaforina E.
B7j	Proteína tirosina cinasa ABL2, tirosina cinasa ARG.
F5l	Leucocito interferón inducible de péptido.
B2g	Proteína de interacción TRAF (TRIP).
B3h	Precursor de Caspasa 8.
D5f	CD9.
C7l	Receptor gamma del ácido retinoico.
A3i	Inhibidor CDK.
C7m	Receptor beta retinoide.
C6n	Gen del sexo.
D3e	Precursor de Vitronectina.
D4b	Integrina α - 8.
D2n	Tenascina R.
C1a	DNA dependiente de la proteína cinasa (DNA-PK).
A4j	Señal extracelular reguladora de cinasa 6 (ERK6 y 5).
D1b	Biglicano.
A7d	Queratina 11 tipo II del citoesqueleto; citoqueratina.
A2k	Ciclina C G1/ S- específica.
D4j	β - Integrina 7.
D4k	β - Integrina 8.
A7g	Queratina 4 tipo II del citoesqueleto; citoqueratina 4.
D1a	Proteoglicano específico de cartilago .
A5i	E2F-3.
B4d	α proteína cinasa rac, proteína cinasa B.
A5l	DP2 dimerización asociada a E2F.

interfiriendo con la hidrólisis del trifosfato de guanina (GTP) en el ciclo RAS-GTP, en lugar de promover permanentemente el intercambio RAS-GDP. H-ras puede inducir el fenotipo metastático en células hepáticas, ya que transfiere clones de células para la adhesión de la lamina o de la fibronectina, en la migración se incrementa marcadamente la secreción de colagenasa y la expresión de EGFR (Qing y col., 2001). El oncogen MET (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos o factor de dispersión) contribuye a la génesis del HCC junto con su ligando activan el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), provocando múltiples respuestas biológicas, incluyendo proliferación, migración, invasión y morfogénesis (Wang y col., 2001).

p28 juega un papel significativo en la promoción de la metástasis en el HCC (Xiao y col., 2002). Otros oncogenes como c-fms que al unirse con el factor 1 estimulador de colonias (CSF1) y al p53 pueden alterar el ciclo celular e influir en el desarrollo del HCC (Lee y col., 2000; Jun y col., 2001).

III. AFLATOXINAS.

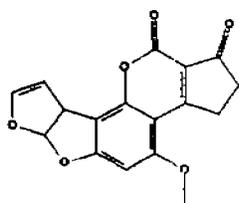
Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por cepas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*; son compuestos heterocíclicos altamente oxigenados, (bisfuranoisocumarinas) con elevada actividad farmacológica. Crecen en productos que contienen carbohidratos o grasas como granos (maíz, trigo, avena, centeno, sorgo, cacahuete, cebada, mijo, arveja, frijol, nuez, copra y semilla de soya), en forrajes (ensilado de maíz, heno de grama común y pasto bermuda) y alimentos derivados (concentrados, pasta y harina de soya, harina de pescado, harinolina, polvo de chile indio, harina y semilla de algodón y mantequilla de cacahuete) (Sandrine y Oswald, 2005). Algunas aflatoxinas se producen por hongos, mientras que otras son formadas en el organismo animal después de la ingestión del alimento contaminado (Wang, 1999). Se encuentran en la fracción insaponificable del sustrato y lipídica de los alimentos; se caracterizan por ser resistentes a altas temperaturas (arriba de 300°C), y a los procesos de peleteado y enlatado; son insolubles en agua y en disolventes no polares; son solubles en disolventes polares como metanol, éter y cloroformo; presentan sensibilidad al contacto con el aire y se degradan al exponerse a luz visible y a la ultravioleta; pueden ser destruidas o inactivadas por soluciones alcalis, ácidos fuertes, agentes oxidantes o soluciones de hipoclorito de sodio.

III.1 CLASIFICACIÓN.

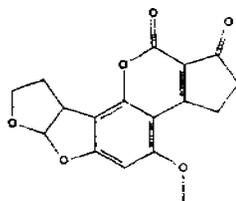
La familia de aflatoxinas comprende 18 tipos diferentes, con tres variaciones estructurales: La serie B (blue), emite un color azul fluorescente al observarse bajo luz ultravioleta, tiene en su estructura un anillo pentano que es sustituido por una lactona en la serie G (green); la serie 1 presenta un doble enlace en el anillo furano terminal que esta ausente en la serie 2; la serie M (milk toxic) tiene un grupo hidroxilo en el carbono terciario por la fusión de dos anillos furano (Figura 6). Con base en estas características, las aflatoxinas pueden clasificarse de la siguiente manera: aflatoxina B1 (AFB1), la B2 (AFB2), la G1 (AFG1), la G2 (AFG2), la M1 (AFM1), la M2 (AFM2), la GM1, la GM2, la B2a (AFB2a), la G2a (AFG2a), el aflatoxicol y el parasitico (Bueno y Oliver, 2004).

La AFB1 es la más abundante, tóxica y altamente insaturada, presenta un punto de fusión de 269° C, su formula condensada es C₁₇H₁₂O₆ con un PM de 362g/mol (Sánchez, 2002).

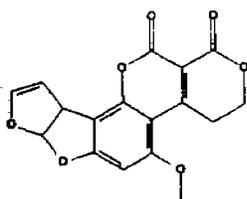
La AFB1 es sintetizada a partir del polihidroxi-naftaleno endoperóxido derivado de una cadena de policetona. El endoperóxido da lugar a una antraquinona intermedia con una cadena lateral de bisfurano (versicolorino A); la pérdida oxidativa posterior de los derivados del acetato da lugar a la O-metil esteregnatocistina, y finalmente a la AFB1 (*Figura 7*); la molécula al ser fragmentada provoca una ozonólisis y los productos de esta reacción incluyen los ácidos leucínico, succínico y glutámico (Emi y col., 2005). La aflatoxina es una toxina con actividad mutagénica, teratogénica y carcinogénica; estas propiedades varían dependiendo de la dosis ingerida, el tiempo de exposición, la especie, la raza, la edad y el sexo del individuo afectado (Wang, 1999; Pozzi y col., 2001). Entran al organismo por vía oral a través de alimentos contaminados, se difunden por todos los tejidos corporales, especialmente en órganos reproductores, en hígado y en riñones por una rápida absorción pero lenta eliminación. La AFB1 se bioactiva a través del citocromo p450 IA2 (CYP1A2) induciendo la unión de una guanina con la molécula de la AFB1 dando como resultado la formación de un epóxido genotóxico y aductos DNA-N⁷ guanina, provocando así la mutagénesis de la célula (*Figura 8*) (Guo y col., 2005). La interacción de las aflatoxinas con el ácido desoxirribonucleico (DNA) provoca como resultado final la inhibición de la síntesis de proteínas. Además, se ha sugerido que la AFB1 inhibe drásticamente la incorporación de nucleótidos precursores de los RNAs nucleares inhibiendo así la transcripción (Wang, 1999).



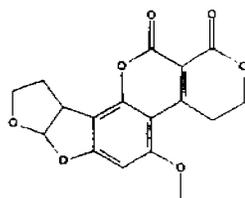
AFB 1



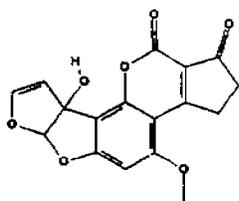
AFB 2



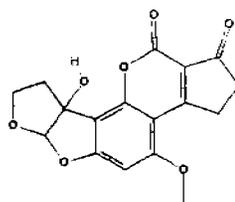
AFG 1



AFG 2



AFM 1



AFM 2

Figura 6. Estructura de las aflatoxinas. 1) la serie B tiene en su estructura un anillo ciclopentano, sustituido en la serie G por una lactona, 2) la serie I tiene un doble enlace en el anillo furano terminal de una porción bisfurano, ausente en la serie 2; y 3) la serie M tiene un grupo hidroxilo en el carbono terciario por la fusión de dos anillos furano ().

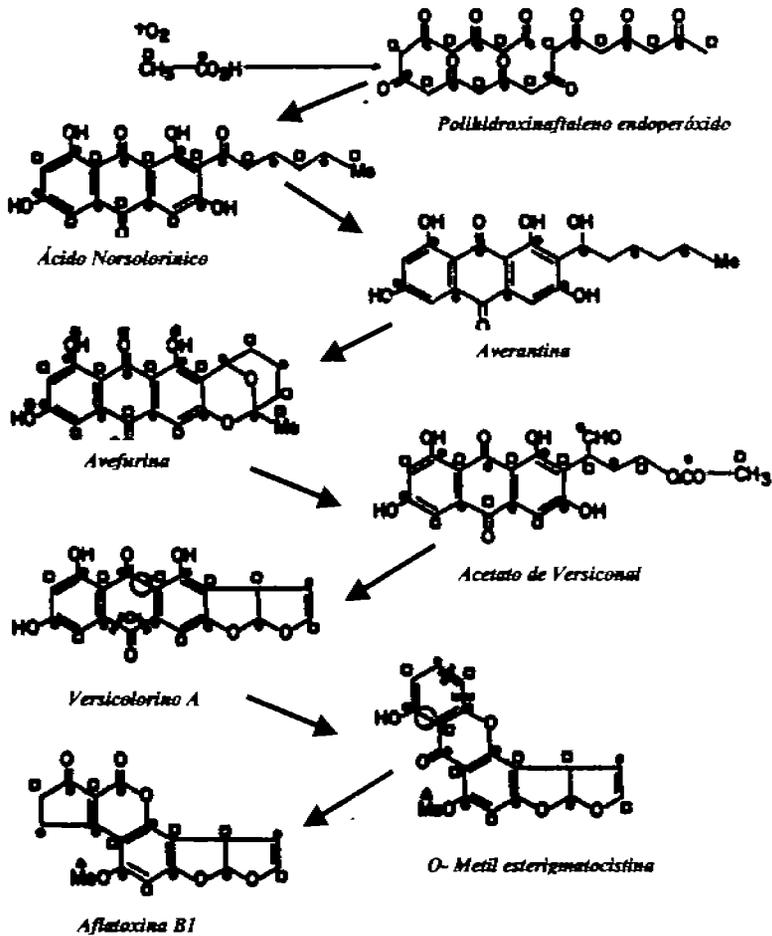


Figura 7. Biosíntesis de AFB1. La AFB1 proviene del polihidroxinaftaleno endoperóxido, el cual da lugar al versicolorino A; la pérdida oxidativa de los compuestos derivados del acetato lleva a la síntesis de la O-esterigmatocistina y finalmente a la AFB1 (Emi y col., 2005).

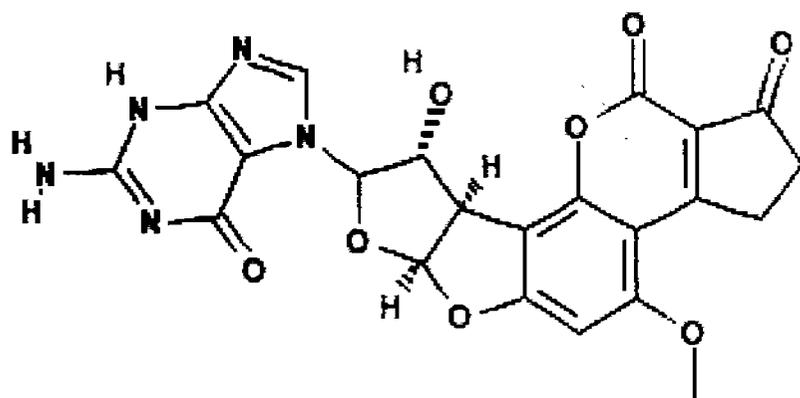
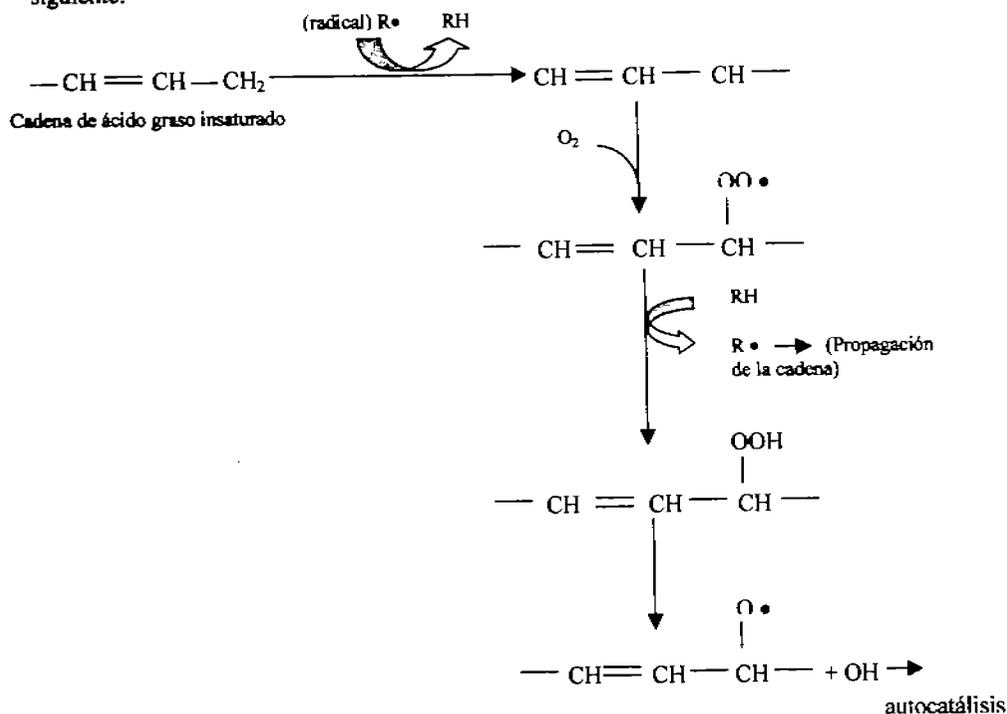


Figura 8. Unión del nucleótido de guanina con la molécula de Aflatoxina B1. Esta unión induce la formación de un epóxido genotóxico y aductos de DNA-N⁷ guanina provocando así la mutagénesis de la célula. (Guo y col., 2005).

IV. VITAMINA E.

La vitamina E es el nombre corriente de diversos tocoferoles (alfa, beta y γ - tocoferol) que se caracterizan por funcionar en el organismo como el mayor antioxidante liposoluble que protege a las células del daño provocado por los radicales libres y los peróxidos. Dichos radicales, que pueden producirse por reacciones enzimáticas, catalizadas por trazas de metales de transición, pueden iniciar una reacción en cadena autocatalítica del tipo siguiente:



La secuencia de reacción se ha esbozado de modo que se regenera el radical $R\bullet$ en una secuencia de propagación de cadena y al mismo tiempo se produce un peróxido orgánico que puede escindirse en dos radicales que pueden reaccionar ulteriormente. Por tanto, tiene lugar un proceso autocatalítico que conduce al ranciado rápido de las grasas. Se pone de manifiesto así una variante de reacciones de dimerización y de ruptura de cadenas. La presencia de una pequeña cantidad de tocoferol inhibe esta peroxidación de las grasas,

probablemente por captura de los radicales con objeto de formar radicales tocoferol más estables que puedan dimerizarse por sí mismos o reaccionar con otros radicales para terminar la cadena (Metzler, 1981). Es decir, la vitamina captura los radicales libres y los destruye antes de que puedan provocar daños; esta propiedad se ve reforzada por la glutatión-peroxidasa, que protege los lípidos contra los daños peroxidativos, y de este modo contra numerosas enfermedades degenerativas y trastornos, incluidos el cáncer, enfermedades cardiovasculares (arteriopatía coronaria), la catarata, mejora la actividad del sistema inmunitario, ejerce efecto detoxificante contra metales pesados retrasa la progresión del mal de Parkinson y retrasa el envejecimiento (Tolonen M, 1995). Las mejores fuentes de Vitamina E son los aceites vegetales, margarina, germen de trigo, semillas, huevos, harina integral, la brocolera, la lombarda y las nueces (Riba y col., 1993).

V. NADIAN PLUS.

Suplemento alimenticio vigorizante de origen natural, auxiliar en el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas e infecciosas, se ha utilizado como energético, vitamínico, antiséptico, cicatrizante, bactericida y anticriptogámico. Los elementos que contiene Nadian Plus son derivados de la colmena (miel de abeja, propóleo y polen), vitaminas (A, B, C, D, E, K), minerales (calcio, magnesio, fósforo, hierro y potasio), azúcares (fructuosa, glucosa, sacarosa y maltosa). Otros elementos que contiene este suplemento son hierbas medicinales como el Ginseng y el Gincobiloba (Tabla 4). Los efectos primarios que se han reportado son: a) incremento en las funciones del sistema inmunológico, b) aumento general de la calidad de vida. Además, en los últimos 10 años Nadian Plus ha sido utilizado en enfermos de diferentes tipos de cáncer como complemento de su tratamiento oncológico mejorando su calidad de vida. Este es el primer trabajo teórico experimental que podría aportar información, por lo tanto no hay antecedentes bibliográficos referentes a este producto naturista.

Tabla 4. Elementos nutricionales del Nadian Plus. El Nadian Plus esta compuesto por Vitaminas, minerales, azúcares, derivados de la colmena e hierbas medicinales; las cuales ejercen reacciones bioquímicas en el organismo.

NUTRIMIENTOS	FUNCIONES
A (retinol y carotenoides)	Capta radicales libres, actúa como antioxidante, participa en el ciclo visual, en el mantenimiento de los epitelios, en la espermatogénesis, en el desarrollo fetal, en la respuesta inmunológica, en el gusto, en la audición. en el crecimiento, en la diferenciación celular y aumenta el apetito.
B ₁ (Tiamina)	Interviene en reacciones de descarboxilación. Responsable de la producción de energía, mejora la actividad de los linfocitos, es esencial para el desarrollo y funcionamiento normal del cerebro, de los músculos y de los nervios. Es antioxidante
B ₂ (Riboflavina)	Interviene en reacciones de oxido-reducción. Presente en células en donde se produce energía e incrementa la formación de anticuerpos.
B ₆ (Piridoxina)	Interviene en reacciones de transaminación y descarboxilación. Hace frente a las enfermedades y al envejecimiento, ayuda en la producción de glóbulos rojos y en el aprovechamiento del selenio. Mantenimiento de la integridad de la piel y de los nervios, favorece la inhibición de la agregación plaquetaria disminuyendo el riesgo de trombosis. Mejora la actividad de los linfocitos T y B contribuyendo a la prevención del asma, de las alergias, de los trastornos artríticos, del cáncer, de la cardiopatía coronaria y de los trastornos circulatorios. Efecto en el herpes, en la depresión y en el dolor menstrual.
B ₁₂ (Cianocobalamina)	Interviene en las reacciones de metilación. Necesaria para la producción de glóbulos rojos. Mejora la resistencia a las enfermedades gracias a su influencia en la actividad de los linfocitos T y B.
C (Ácido ascórbico)	Interviene en las reacciones de carboxilación, transcarboxilación y descarboxilación. Antioxidante del radical superóxido, del peróxido de hidrógeno, del hipoclorito y del radical hidróxilo. Aumenta la absorción del hierro, contribuye a la formación de los huesos, de los dientes y de los tejidos; acelera la cicatrización de las heridas. ayuda a mantener la elasticidad de la piel; se necesita para producir las hormonas del estrés, mejora la resistencia a las infecciones, a la hipertensión, a la arteriosclerosis y al cáncer. Es un antioxidante hidrosoluble intracelular
D	Participa en la absorción, en el metabolismo del calcio y fosfatos, en la mineralización, en la contracción muscular y respuesta inmune.
E (Tocoferoles)	Antioxidante eficaz, protege a los ácidos grasos insaturados de la oxidación.

K (Quinonas)	Interviene en la síntesis de protombina y en factores relacionados con la coagulación y calcificación ósea.
Calcio	Estructura de huesos y dientes, coagulación de la sangre, permeabilidad de las membranas, neurotransmisión, contracción muscular.
Fósforo	Constituyente de fosfolípidos, estructura de huesos y dientes, constituyente de enlaces de alta energía.
Hierro	Componente de la hemoglobina y mioglobina, enzimas oxidativas: citocromos, catalasas y peroxidasas, transporte de electrones y oxígeno.
Magnesio	Irritabilidad nerviosa y muscular, cofactor en reacciones donde interviene el ATP.
Potasio	Contracción del músculo esquelético y cardíaco, irritabilidad nerviosa, equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base, presión osmótica.
Fructuosa y glucosa	Son monosacáridos que cumplen en el organismo funciones tanto energéticas como catalíticas y estructurales. Son edulcorantes nutritivos.
Maltosa	Es un disacárido y edulcorante energético.
Sacarosa	Es un disacárido, fuente económica y agradable de glucosa que permite elevar la densidad de la energía.
Miel de abeja	Antiséptica y cicatrizante.
Propóleo	Actividad antibiótica.
Polen	Fuente de proteínas y Vitaminas (A, C, D, E, B ₁ , B ₂ , B ₃)
Ginseng	Tónico, afrodisíaco y estimulante. Se utiliza para estimular las funciones sexuales y para mejorar el estado físico, psíquico y aumentar la resistencia.
Gincobiloba	Ayuda a mejorar la memoria, aumenta la circulación sanguínea y alivia el dolor.

(Casanueva y col., 2001).

VI. JUSTIFICACIÓN

El Hepatocarcinoma celular es uno de los tumores malignos más comunes en Asia, África, sur de Europa, Estados Unidos y otros países, provocando 1 millón de muertes anualmente. Existen diferentes causas que pueden ocasionar el desarrollo del hepatocarcinoma, entre ellas se encuentra el virus de la hepatitis, la exposición a materiales sintéticos y medicinas (hormonas sexuales, fenobarbital, etc.), contaminantes del medioambiente (cloroformo, DDT, nitratos, etc.) y productos naturales universales como la Aflatoxina B1, ya que se encuentra en gran variedad de cereales almacenados, particularmente en zonas calientes y húmedas, la mayoría de la gente desconoce esto y así lo consumen.

Por otro lado, la ciencia avanza día tras día y se investigan nuevas formas de prevenir o curar o contrarrestar los síntomas de los diferentes tipos de cáncer que existen, creando una gran variedad de medicamentos (homeopáticos o sintéticos) y antioxidantes como la vitamina E. En los últimos años se han estudiado plantas que pueden prevenir, contrarrestar o curar algún tipo de cáncer. Con base en los antecedentes señalados, el objetivo de este trabajo fue determinar si un producto naturista puede prevenir, contrarrestar e incluso curar el inicio de un hepatocarcinoma celular por un carcinógeno potente como es la Aflatoxina B1. En este trabajo mostramos: 1) el daño provocado por la AFB1, 2) el efecto que provoca el Nadian Plus en ratas tratadas previamente con la AFB1 durante 35 y 84 días, y 3) el efecto que tiene el Nadian Plus en ratas sanas. El daño provocado por la AFB1 y el efecto del Nadian Plus se valoro con estudios histopatológicos, pruebas enzimáticas específicas del hígado como la TGP, la TGO y la LDH; pruebas bioquímicas como el hematocrito y parámetros físicos tales como peso, apariencia física y comportamiento.

VII. OBJETIVO GENERAL

Determinar los posibles efectos terapéuticos de Nadian Plus (Suplemento Alimenticio) en ratas macho Wistar tratadas previamente con Aflatoxinas B1 durante 84 días a través de la valoración de la función hepática y morfología del órgano con la finalidad de establecer los efectos provocados por el NP.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Provocar una alteración hepática con la administración oral de sorgo contaminado con AFB1 en ratas macho adultas Wistar.
- 2.- Valorar el daño hepático de ratas tratadas con AFB1 a través de pruebas bioquímicas (hematocrito), enzimáticas (TGO, TGP y LDH) e histopatológicas (hígado, bazo y riñones).
- 3.- Valorar el efecto del Nadian Plus y de la vitamina E en ratas tratadas simultáneamente con AFB1.
- 4.- Correlacionar el efecto de la Vitamina E y el Nadian Plus en ratas previamente tratadas con AFB1.

VIII. MATERIALES Y METODOS.

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico. Se utilizó formaldehído, etanol absoluto y xileno de Química Meyer. Éter etílico de Fermoni. Metanol HPLC. Cloruro de sodio de Laboratorios Monterrey. El medio Malta Bioxan, la Hematoxilina y eosina ácida de Harris fueron de Sigma. Columnas de inmunoafinidad Aflatest. El revelador Aflatest fue de VICAM. Para las determinaciones enzimáticas de TGO, TGP y LDH se emplearon kits de Wiener. Las cápsulas de vitamina E fueron de laboratorios getcaps. También se utilizó una cepa de *Aspergillus flavus* productora de AFB1 donada por la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS). El Nadian Plus fue donado por el Sr. Fernando Rivera.

VIII.1. Animales de experimentación.

Se utilizaron 40 ratas macho Wistar adultos que pesaron de 358 g a 523.5 g los cuales fueron distribuidos en 8 lotes de 5 individuos cada uno (Delgado-Buenrostro y Revuelta M, 1993). Cada lote fue alojado en cajas de acrílico en el Bioterio de Posgrado de FES-Cuautitlán campo I, manteniéndose a una temperatura de 22° C durante 12 semanas a base de agua a libre acceso, así como a una dieta de 18 g diarios de semilla de sorgo por rata en comederos de acero inoxidable.

VIII.2. Preparación del alimento con AFB1.

La cepa de *Aspergillus flavus* fue sembrada en medio Malta sal Agar e incubada a 25° C durante 7 días. Posteriormente se realizó una suspensión de 3×10^6 esporas/ml en agua estéril con tween 80 al 1%. En seguida se realizó el inóculo a la semilla de sorgo con 93.1 ml de suspensión en 8 ml de agua estéril para tener una humedad de 18% en el sorgo. Una vez inoculado el sorgo se incubó a 27° C durante 15 días. Posteriormente se realizó la cuantificación de aflatoxinas por el método de Aflatest VICAM (ver adelante). Finalmente se ajustó el sorgo a la concentración de 1.5 ppb de aflatoxinas y se realizó el conteo de esporas en una cámara de Newbauer para su posterior administración por vía oral a las ratas en estudio.

VIII.3. Cuantificación de Aflatoxinas (Método Aflatest VICAM)

Se molieron y homogenizaron 50 g de semilla de sorgo inoculada, 5 g de NaCl y 100 ml de metanol al 80% en una licuadora para laboratorio de uso rudo. Se filtró la mezcla a través de papel filtro Whatman No. 1. Enseguida se tomaron 10 ml del filtrado y se llevó a un volumen de 50 ml con agua destilada, filtrándose nuevamente a través de un filtro microfibrá (1.0 μ m). Posteriormente 10 ml del filtrado final se pasó a través de una columna de inmunofinidad Aflatest con flujo de 1-2 gotas/s. Enseguida se lavó la columna dos veces con 10 ml de agua destilada con un flujo de 1-2 gotas/s. Inmediatamente después, se agregó 1 ml de metanol grado HPLC para que fluyeran las Aflatoxinas por la columna, la elusión se colectó en un tubo y se le añadió 1 ml de revelador Aflatest y se realizó la lectura en un fluorómetro VICAM para obtener la concentración de Aflatoxinas en ppb.

VIII.4. Características del sorgo.

El sorgo es un cereal color pardo que está compuesto por el pericarpio que encierra el germen; su embrión se desarrolla hasta formar una nueva planta y el endospermo que contiene almidón le da la energía necesaria para iniciar su crecimiento. Su composición nutricional por 100 g de porción comestible y 12% de humedad es de 10.4 g de proteína, 3.1 g de grasa, 1.6 g de ceniza, 2 g de fibra cruda, 70.7 g de carbohidratos, 25 mg de calcio, 5.4 mg de hierro, 0.38 mg de timina, 0.15 mg de riboflavina, y 4.3 mg de niacina; lo que equivale a 329 kcal/100 g de ración.

VIII.5. Punción Cardíaca.

Se colocó a la rata dentro de una campana de vidrio previamente saturada con éter etílico; lo cual llevó al animal de investigación a una etapa de semi inconciencia (anestesia quirúrgica). Enseguida se sacó a la rata de la campana y se sujetó de las extremidades antero superior y postero inferior extendida boca arriba sobre la mesa sin provocar tensión. Sobre la caja del tórax se localizó el cuarto y quinto espacio intercostal izquierdo con la intención de percibir la región de máximo latido cardíaco. Se limpió la zona con una torunda impregnada de alcohol al 70% y se introdujo una aguja calibre 25 G x 16 mm embonada a una jeringa de 5 ml. En la zona seleccionada se realizó la punción introduciendo la aguja a manera tal que formó un ángulo de 90° en relación con el tórax.

Lentamente se desplazó el émbolo extrayendo 5 ml de sangre. Una vez tomada la muestra se retiró la jeringa en un movimiento rápido ejerciendo un poco de presión sobre el lugar de la punción (Delgado- Buenrostro y Revuelta M; 1993).

VIII.6. Parámetros Físicos.

Se evaluó el consumo de alimento, la ganancia o pérdida de peso, el aspecto físico y el comportamiento de los animales.

Los animales fueron pesados individualmente una vez por semana en las mañanas en una balanza granataria con cesto OHAUS los días 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 74 y 84 del experimento. El consumo de alimento fue medido diariamente con base en el lote, por la diferencia de la cantidad de alimento consumido de un día menos la cantidad de alimento restante al inicio del siguiente día.

El aspecto físico del animal se evaluó por la caída del pelo; el color de la piel, el tipo de pelaje que iba presentando y el comportamiento que este tuvo durante todo el tratamiento.

VIII.6.1. Hematocrito.

Se tomaron al azar tres animales de cada uno de los 8 lotes los días 1, 35 y 84, a los cuales se les realizó punción cardíaca (ver arriba), se colectaron 5 ml de sangre por rata.

Por otro lado, a un tubo se le adiciono EDTA al 5% y se le añadió 1 ml de sangre para realizar la prueba de Hematocrito; técnica que se fundamenta en la relación del volumen de eritrocitos con el de sangre total con base a una fuerza centrífuga. Enseguida tubos capilares Corning de 7.5 cm de longitud por 1.4 – 1.6 mm de diámetro, fueron llenados aproximadamente 5 cm por atracción capilar a partir de la muestra. El extremo vacío se selló con la flama de un mechero y fueron centrifugados por 3 min a 12500 rpm en una centrífuga para microhematocrito Solbat M-600. Enseguida la longitud del capilar se midió con una regla milimetrada y se realizó la relación en porcentaje de eritrocitos (Henry y col., 1996).

Los 4 ml de sangre restantes, se mantuvieron a temperatura ambiente por 30 min hasta la formación de un coágulo. Enseguida las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min en una centrífuga Damon para la obtención de los sueros los cuales fueron congelados a 4°C para su posterior utilización en determinaciones enzimáticas.

VIII.6.2. Determinación de la enzima TGO.

Se fundamenta en la velocidad de formación de ácido Oxalacético mediante el sistema MDH-NADH a partir de la incubación de la muestra con ácido α -Cetoglutarico y ácido L-Aspartico (Henry y col., 1996). En dos tubos de ensaye, marcados como blanco y muestra se añadieron 0.25 ml de sustrato de TGO (100 mM de L-aspartato, 2 mM de α -Cetoglutarato en buffer de fosfatos 100 mM pH 7.4), y fueron incubados $37^{\circ} \text{C} \pm 0.5^{\circ} \text{C}$ por 2 min. Enseguida al tubo problema se le añadió 50 μl de suero y al tubo blanco 50 μl de agua destilada, se mezclaron en un vortex Fisher y fueron incubados por 30 min. Posteriormente se les agregó 0.25 ml de 2,4-DNFH (1mmol de 2,4-Dinitrofenilhidricina en ácido clorhídrico 1M) y se incubaron por 10 min a 37°C . Enseguida, a los tubos blanco y problema se les añadió 2.5 ml de diluyente para enzimas (Hidróxido de Sodio 4 M) se mezclaron y después de 2 min se leyó la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro Beckman DU, este procedimiento se realizó a cada uno de los sueros.

VIII.6.3. Determinación de la enzima TGP.

Se basa en medir la velocidad de formación del piruvato mediante el sistema LDH-NADH a partir de la incubación de la muestra con L-alanina y α -Cetoglutarato (Henry y col., 1996). En dos tubos de ensaye, marcados como blanco y muestra, se añadieron 0.25 ml de sustrato de TGP (100mM de dl-alanina, 2mM de α -Cetoglutarato en buffer de fosfatos 100mM pH 7.4) y fueron incubados a $37^{\circ} \text{C} \pm 0.5^{\circ} \text{C}$ durante 2 min. Enseguida al tubo problema se le añadió 50 μl de suero y al tubo blanco 50 μl de agua destilada. Las muestras fueron mezcladas en un vortex Fisher e incubadas por 30 min. Posteriormente se les agregó 0.25 ml de 2,4-DNFH (1mmol de 2,4-Dinitrofenilhidricina en ácido clorhídrico 1M), se mezcló cada tubo y se incubó por 10 min a 37°C . Enseguida a cada tubo se le agregó 2.5 ml de diluyente para enzimas (Hidróxido de Sodio 4 M) y después de 2 min se leyó la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro Beckman DU, este procedimiento se realizó a cada uno de los sueros obtenidos.

VIII.6.4 Determinación de la enzima LDH.

Se fundamenta en la velocidad de formación de lactato + NAD^{+} al catalizar la reducción de piruvato por el NADH_2 liofilizados, marcados como blanco y muestra, se añadieron 1.5 ml

de sustrato de amortiguador de LDH (piruvato sódico 0.6 mM y amortiguador fosfatos 50 mM a pH 7.5). Enseguida al frasco problema se le añadió 50 µl de agua destilada. Las muestras fueron mezcladas en un vortex Fisher. Enseguida cada frasco se pasó a una celda de espectrofotómetro Beckman DU para leer la absorbancia a 340nm a temperatura constante al cabo de 30 seg, 1, 2 y 3 min. Posteriormente se realizaron los cálculos con la fórmula $\Delta E/\text{min} \times 4921$, este procedimiento se realizó a cada uno de los sueros obtenidos.

VIII.7 Estudio Histopatológico.

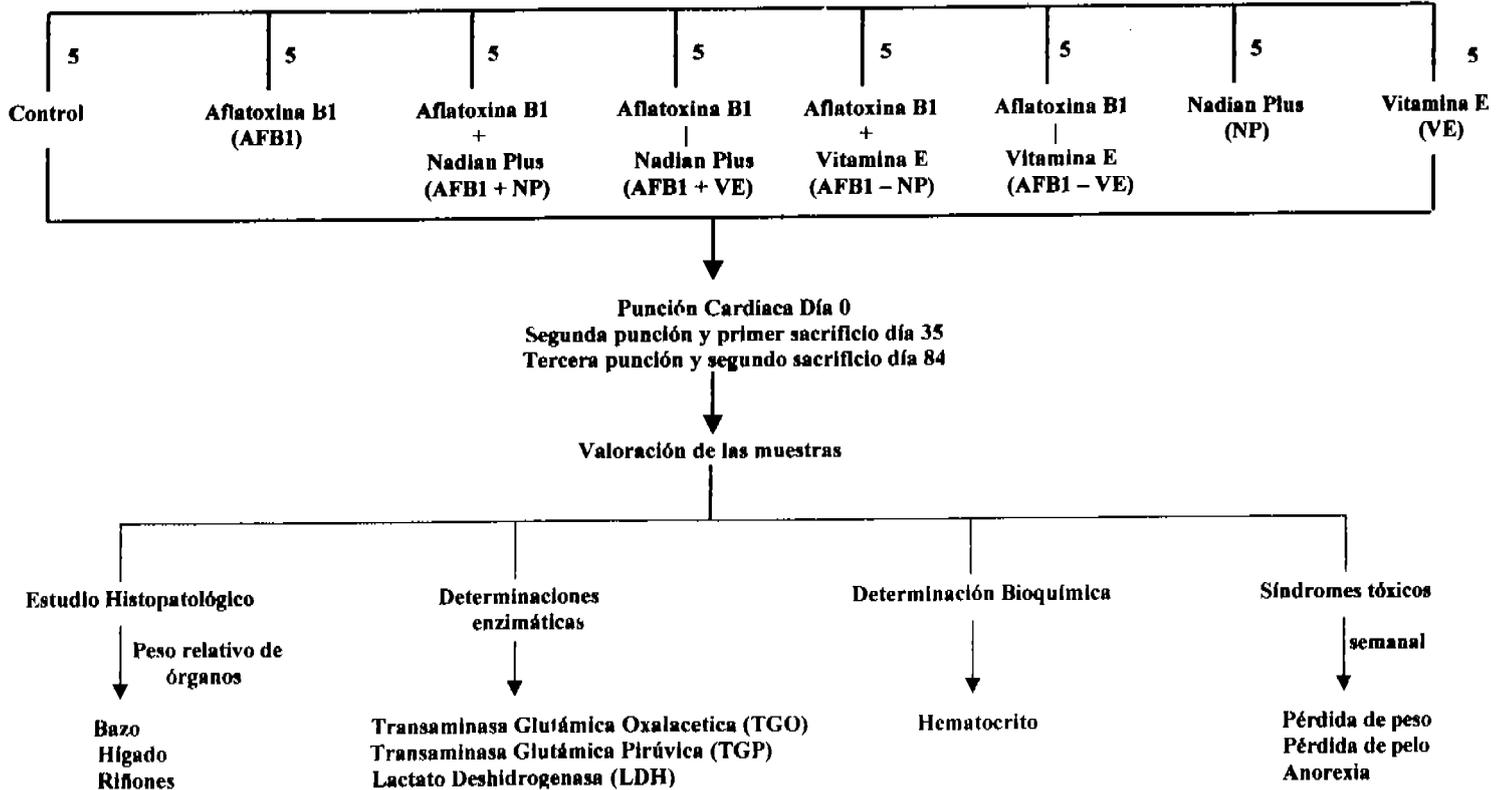
El día 35 y 84 de la experimentación se sacrificaron por sobredosis de anestésico (éter etílico) de cada lote 2 y 3 animales respectivamente. Enseguida se procedió a realizar la necropsia para el estudio macroscópico del hígado, del bazo y de riñones. Se observó la tonalidad, apariencia, textura de los órganos y se pesó cada uno de ellos. Inmediatamente se realizó el procesamiento de la muestra: a) fijación de la muestra (formol bufferado al 10%); b) deshidratación (alcoholes a diferentes concentraciones) y c) inclusión en parafina, corte y tinción histológica (H-E) para su estudio microscópico. Extraído el órgano, se corto una porción de 3-4 mm de largo por 2 mm de ancho, enseguida la muestra fue lavada con NaCl al 0.154 Mm, posteriormente las muestras fueron colocadas en un recipiente de formol buferado cada (10 ml de formol al 40% con 90 ml de PBS) PBS (NaCl 0.14 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, Na_2PO_4 8.1 mM, pH 7.4) durante 48 h. Inmediatamente se pasaron los tejidos a recipientes con etanol al 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 96% y 100% en pasos sucesivos por periodos de 1h en cada concentración, así como en una mezcla aclarante (xilol-etanol absoluto 1:1) y en xileno al 100%. Al término de la deshidratación, las muestras se colocaron en recipientes de acero inoxidable donde se adicionó parafina a 56°C con cambios de 1h dos veces dejándolos solidificar. Los bloques incluidos se les dio forma de trapecio a 5 mm alrededor de la pieza y la muestra se seccionó con un microtomo a 4 µ . El corte obtenido se anexó a un baño de flotación (agua a 45° C, grenetina 1g/litro) para ser adherido a un portaobjetos, dejándola secar a temperatura ambiente; se tiñeron las laminillas con Hematoxilina y Eosina de Harris (Lynch y col., 1988). Finalmente se realizó una lectura sistematizada de los órganos buscando alteraciones en el espacio porta y en el lobulillo; la presencia, tipo y localización del infiltrado inflamatorio y de la fibrosis; la presencia de células y materiales extraños, y alteraciones en la arquitectura.

VIII.8. Estadística.

Los resultados son representativos de por lo menos 3 experimentos independientes. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar. Los resultados de las determinaciones enzimáticas (TGP y TGO) y de la prueba bioquímica (hematocrito) fueron evaluadas con el programa prisma y sigma. Para el estudio Histopatológico se utilizó el programa Stargraphics 5 comparando las medias con la prueba de Tukey. Los niveles de significancia se establecieron a $p < 0.05$.

IX. ESQUEMA DE TRABAJO

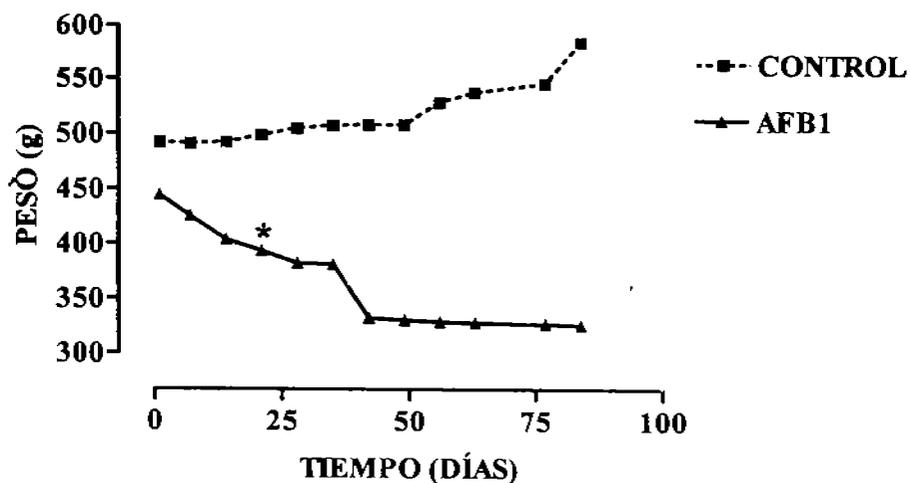
40 Ratas Macho adulto Wistar (distribución Japonesa en 8 lotes)



X. RESULTADOS

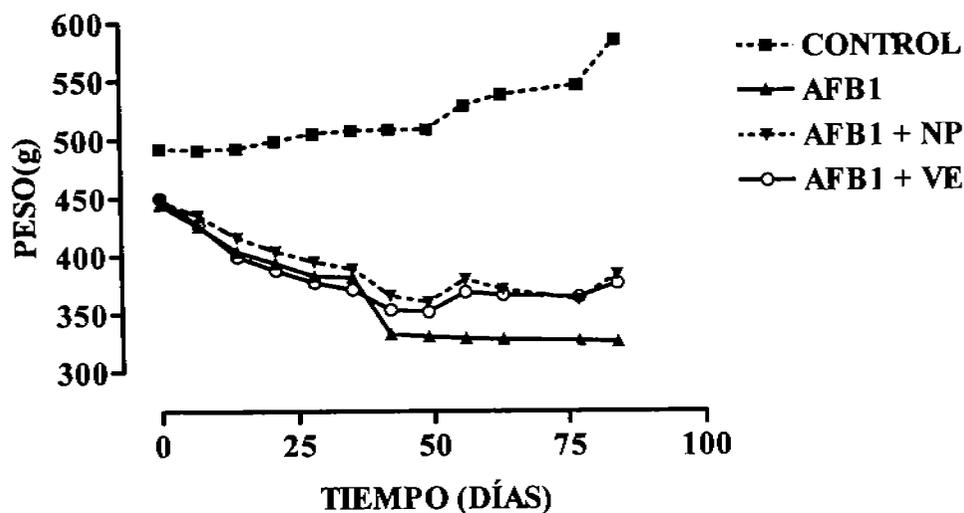
X.1. SÍNDROMES TÓXICOS (Medición de peso, anorexia, caída de pelo y mortalidad).

Varios investigadores han sugerido que desde la presencia de lesiones preneoplásicas hasta la fase terminal de un HCC se observa en un individuo la pérdida gradual del apetito, la pérdida de peso, la caída de pelo e incluso la muerte del individuo (Kumar y col., 2004). El peso de cada lote fue evaluado en una balanza granataria con cesto OHAUS cada semana durante los 84 días. Las ratas que recibieron durante 84 días una dosis de 1.5 ppb de aflatoxina B1 (AFB1) mostraron una tendencia a disminuir de peso de manera significativa ($p < 0.05$) con respecto a su control (*Gráfico y tabla 1*); así mismo, mostraron caída de pelo, anorexia y mortalidad del 13% (*Fig. 9A*). El lote de ratas que recibió una dosis diaria de 1.5 ppb de AFB1 y 0.2 ml de Nadian Plus (AFB1 + NP), así como el lote que recibió una dosis diaria de 1.5 ppb y 3 U de vitamina E (AFB1 + VE) también tuvieron una tendencia a disminuir de peso pero a partir del día 56 se observa en ambos lotes un aumento de peso. Sin embargo no existe una diferencia significativa entre estos lotes y el lote administrado con AFB1 (*Gráfico y tabla 2*), estos lotes no presentaron caída de pelo, anorexia y mortalidad. Las ratas que recibieron una dosis de 1.5 ppb diaria de AFB1 durante 35 días y a partir del día 36 se le administró una dosis de 0.2 ml de Nadian Plus (AFB1 -- NP), así como el lote de ratas que recibió una dosis de 1.5 ppb de AFB1 durante 35 días y a partir del día 36 se le administró una dosis de 3 U de vitamina E (AFB1 -- VE) mostraron una tendencia a disminuir de peso hasta el día 49 sin embargo mostraron un aumento de peso a partir del día 56 hasta el término del tratamiento; pero al compáralos con el lote administrado con AFB1 no hubo diferencia significativa (*Gráfico y tabla 3*); en ambos lotes se observó inicialmente la caída de pelo y anorexia (*Fig. 9A*) posteriormente a partir del día 56 en el lote AFB1 -- NP se observó la disminución gradual de estos signos (*Fig. 9B*). Finalmente tanto el lote que recibió una dosis diaria de Nadian Plus (NP) y el lote que se le administró Vitamina E (VE), tuvieron una tendencia a subir de peso durante todo el tratamiento presentando una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al lote de AFB1 (*Gráfico y tabla 4*), sin presentar caída de pelo, anorexia y mortalidad.



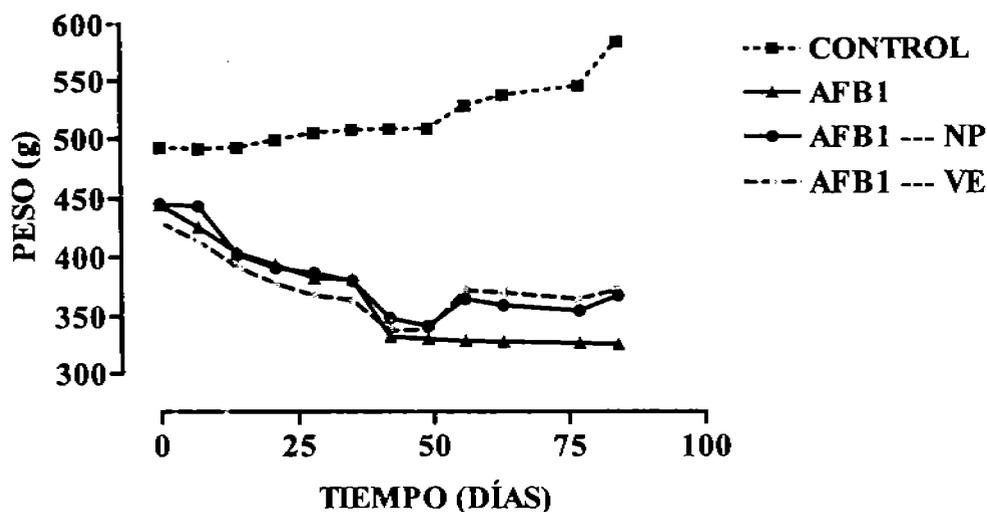
Días	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	77	84
Lote control (g)	492.2	491.1	492	498.5	504.5	507	508	508	528	537	545	584
Lote AFB1 (g)	444.4	425.2	403.5	393.1	382.1	381.1	332	330	328.5	327.5	326.5	325.5

Gráfico y Tabla 1. Peso de ratas macho Wistar tratados con Aflatoxina B1 (AFB1) durante 84 días y su respectivo control. Cada lote de ratas fue pesado en una balanza granataria cada semana. Se observa en el gráfico que el lote al que se le administro una dosis de 1.5 ppb de AFB1 presenta una tendencia a disminuir significativamente con respecto a su control. En la tabla se muestra el promedio del peso por lote tratado. Los datos mostrados son la media \pm d.s de 5 experimentos individuales. Cada rata se peso durante 12 semanas. * $p < 0$.



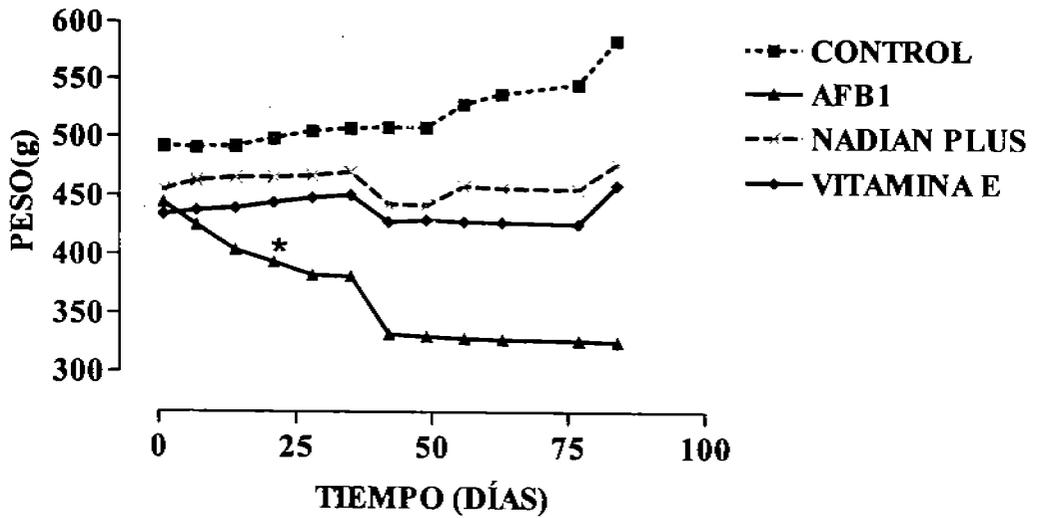
Días	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	77	84
Lote AFB1+ NP (g)	447.2	434.7	415.4	403.5	394.6	388.2	365.2	359.7	379	370.3	361.5	383.3
Lote AFB1+ VE (g)	449.5	426.4	398.9	387.1	376.6	370.5	352.8	351.3	368.3	365.7	364	375.7

Gráfico y tabla 2. Peso de ratas macho Wistar tratados con Aflatoxina B1 + Nadian plus (AFB1 + NP) y Aflatoxina B1 + Vitamina E (AFB1 + VE) durante 12 semanas. Se observa en el gráfico que al lote al que se le administro AFB1 + NP durante todo el tratamiento presento una tendencia a disminuir de peso al igual que el lote administrado con AFB1, pero a partir del día 56 hasta el 84 se observa un aumento de peso. Sin embargo no existe una diferencia significativa entre este lote y el lote administrado con AFB1. Los lotes administrados con AFB1 + VE y con AFB1 + NP presentaron el mismo comportamiento sin presentar diferencia significativa. En la tabla se muestra el promedio del peso por lote tratado. Los datos mostrados son la media \pm d.s de 5 experimentos individuales. Cada individuo se peso durante 12 semanas. ($p > 0.05$)



Días	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	77	84
Lote AFB1 - NP (g)	445.2	443.3	401.7	390.7	386.4	379.8	348	341.3	363.3	358.7	354.3	367
Lote AFB1 - VE (g)	429.4	413.3	391.4	377.7	367.1	363.4	337	338	371.5	369.5	364	372

Gráfico y tabla 3. Peso de ratas macho Wistar tratados con Aflatoxina B1 durante 35 días y a partir del día 36 al 85 de manera paralela recibieron la administración de AFB1 + NP (AFB1 - NP) o AFB1 + VE (AFB1 - VE). Se observa en el gráfico que al lote al que se le administró AFB1 - NP muestra una tendencia a disminuir de peso hasta el día 49 y posteriormente un aumento de peso; sin embargo comparándolo con el lote administrado con AFB1 no hay diferencia significativa. El lote administrado con AFB1 - VE tuvo el mismo comportamiento que el lote administrado con AFB1 - NP por lo tanto no hay diferencia significativa entre estos lotes. En la tabla se muestra el promedio de peso por lote tratado. Los datos mostrados son la media \pm d.s. de 5 experimentos individuales. Cada animal se pesó durante 12 semanas. ($p > 0.05$).



Días	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	77	84
Lote NP (g)	455.2	462.8	466	465.6	467.1	470.2	442.5	441.5	458	456	455	477
Lote VE (g)	434.2	437.6	439.7	444	448.2	450.2	427.5	429.3	427.8	427.3	425.8	458.7

Gráfico y tabla 4. Peso de ratas macho Wistar tratados con Nadian Plus (NP) y Vitamina E (VE). Cada lote de ratas fue pesado en una balanza granataria cada semana durante 84 días. Se observó en el gráfico que el lote control, el lote al que se le administró NP y al que se le administró VE, presentaron una tendencia a subir de peso durante todo el tratamiento teniendo una diferencia significativa con respecto al lote tratado con AFB1. En la tabla se muestra el promedio del peso por lote tratado. Los datos mostrados son la media \pm d.s. de 5 experimentos individuales. Cada lote de ratas se peso durante 12 semanas. * $p < 0.05$.



(A)

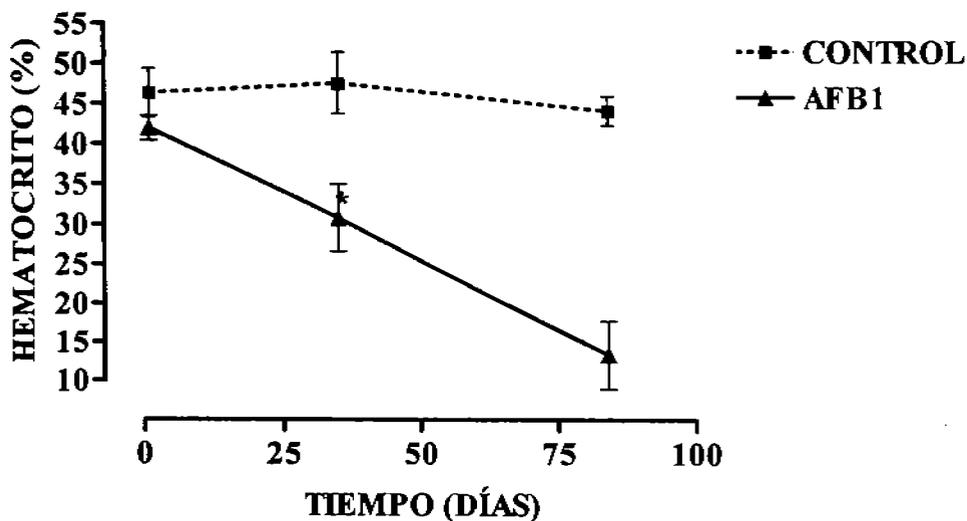


(B)

Figura 9. Síndromes Tóxicos de ratas tratadas con AFB1, AFB1 — NP y AFB1 — VE. (A) Rata que presenta disminución de peso, caída de pelo y anorexia. (B) Rata después de ser tratada con AFB1 durante 35 días y paralelamente la administración de AFB1 + NP, durante el resto del tratamiento (84 días) observando en todo el lote que no hubo caída de pelo al ser tratadas con el NP.

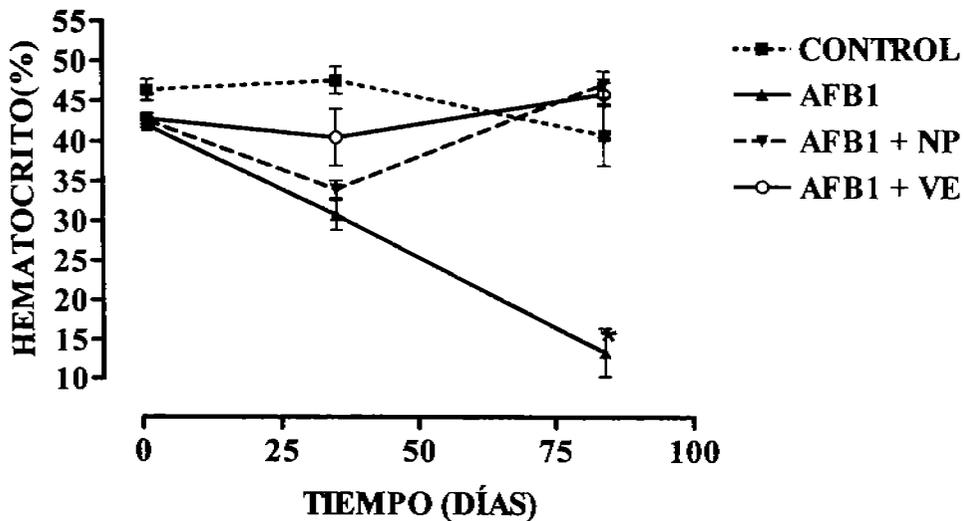
X. 2 DETERMINACIÓN DE HEMATOCRITO

La prueba del hematocrito se basa en la relación del volumen de eritrocitos con el de la sangre total y cuyo valor se ve alterado debido a tumores de riñón, hígado y glándulas suprarrenales, enfermedad renal crónica, hipotiroidismo y anemias entre otras enfermedades (Morrison, 1999). El lote tratado con AFB1 durante 84 días mostró una tendencia a disminuir el porcentaje del hematocrito durante el tiempo del proyecto presentando una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al lote control (*Gráfico y tabla 5*). En el lote tratado con AFB1 + NP, se observó que el porcentaje del hematocrito presentó una tendencia a disminuir hasta el día 35, sin embargo se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en los siguientes días con respecto al lote tratado con AFB1. Con relación al lote tratado con AFB1 + VE el porcentaje del hematocrito se mantuvo constante presentando diferencia significativa con respecto al lote tratado con AFB1 (*Gráfico y tabla 6*). En los lotes AFB1 -- NP y AFB1 -- VE mostraron una tendencia a disminuir en porcentaje hasta el día 35 y aumentar en los días posteriores con una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al lote AFB1 (*Gráfico y tabla 7*). Finalmente, tanto el lote al que se le administró Nadian Plus como al lote que se le administró Vitamina E se observó que el porcentaje de hematocrito se mantiene constante durante los 84 días de tratamiento cayendo los valores dentro del rango normal de 38%-50% (*Gráfico y tabla 8*).



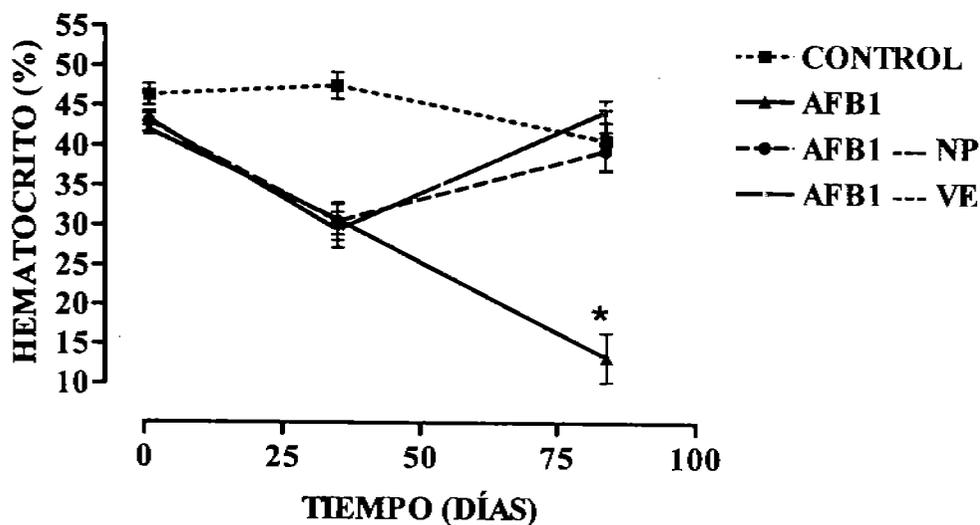
Día	Lote control %	Lote AFB1 %
0	42	40
35	42	28
84	42.85	10.3

Gráfico y tabla 5. Porcentaje de hematocrito obtenido de ratas macho Wistar tratados con AFB1 su respectivo control. A cada lote se le realizó la prueba bioquímica de hematocrito los días 1, 35 y 84; la muestra fue obtenida por punción cardíaca, se llenaron tubos capilares y se centrifugaron en una centrífuga Solbat M-600. Se observa en el gráfico que el lote al que se le administró una dosis de 1.5 ppb de AFB1 presentó una tendencia a disminuir significativamente de porcentaje con respecto a su control. En la tabla se muestra el promedio del porcentaje por lote tratado. Los datos mostrados son la media \pm d.s. de 5 experimentos individuales. * $p < 0.05$



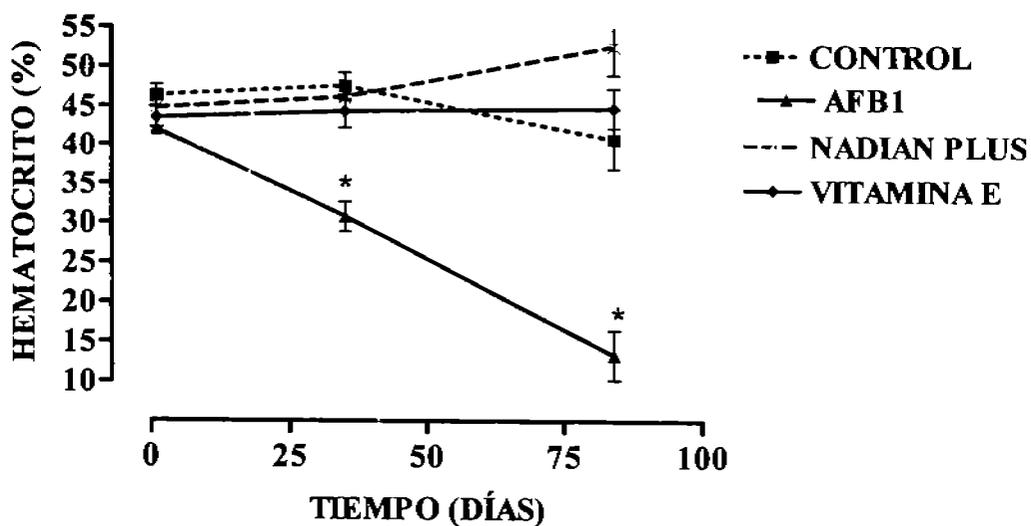
Día	Lote AFB1 + NP	Lote AFB1 + VE
	%	%
0	45	45
35	37	44
84	48.8	44

Gráfico y tabla 6. Porcentaje de hematocrito obtenido de ratas macho Wistar tratados con AFB1 + NP y AFB1 + VE. A cada lote se le realizó la prueba los días 1, 35 y 84. Se observa en el gráfico que el lote al que se le administró AFB1 + NP durante 84 días el porcentaje del hematocrito presentó una tendencia a disminuir hasta el día 35, sin embargo hubo un aumento en el día 84 con una diferencia significativa con respecto al lote administrado con AFB1. El lote tratado con AFB1 + VE tuvo el mismo comportamiento que el lote administrado con AFB1 + NP, no habiendo una diferencia significativa. En la tabla se muestra el promedio del porcentaje por lote tratado. Los datos mostrados son la media \pm d.s. de 5 experimentos individuales. * $p < 0.05$.



Día	Lote AFB1 -- NP %	Lote AFB1 -- VE %
0	40	42
35	30	34
84	37.5	43

Gráfico y tabla 7. Porcentaje de hematocrito obtenido de ratas macho Wistar tratados con AFB1 durante 35 días y posteriormente la administración del Nadian Plus (AFB1 -- NP) y el lote de individuos tratados con AFB1 -- VE. A cada lote se le realizó la prueba de hematocrito los días 1, 35 y 84. En el gráfico se observa que el lote al que se le administró AFB1 -- NP y el lote administrado con AFB1 -- VE, mostraron una tendencia a disminuir en porcentaje hasta el día 35 y un aumento en el día 84, no mostrando una diferencia significativa pero comparándolos con el lote de AFB1 si se observa diferencia significativa. En la tabla se muestra el promedio del porcentaje por lote tratado. Los datos mostrados son la media \pm d.s. de 5 experimentos individuales. * $p < 0.05$

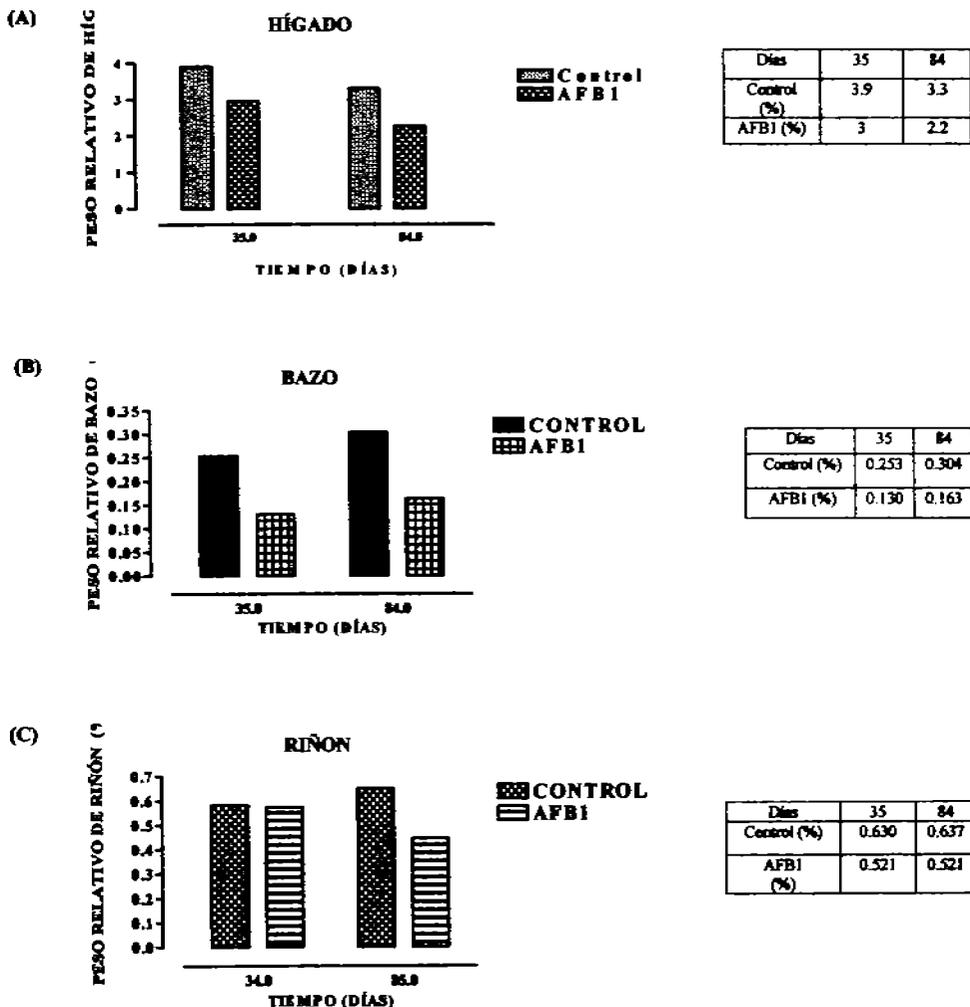


Día	Lote NP %	Lote VE %
0	45	43
35	45	44
84	47	44

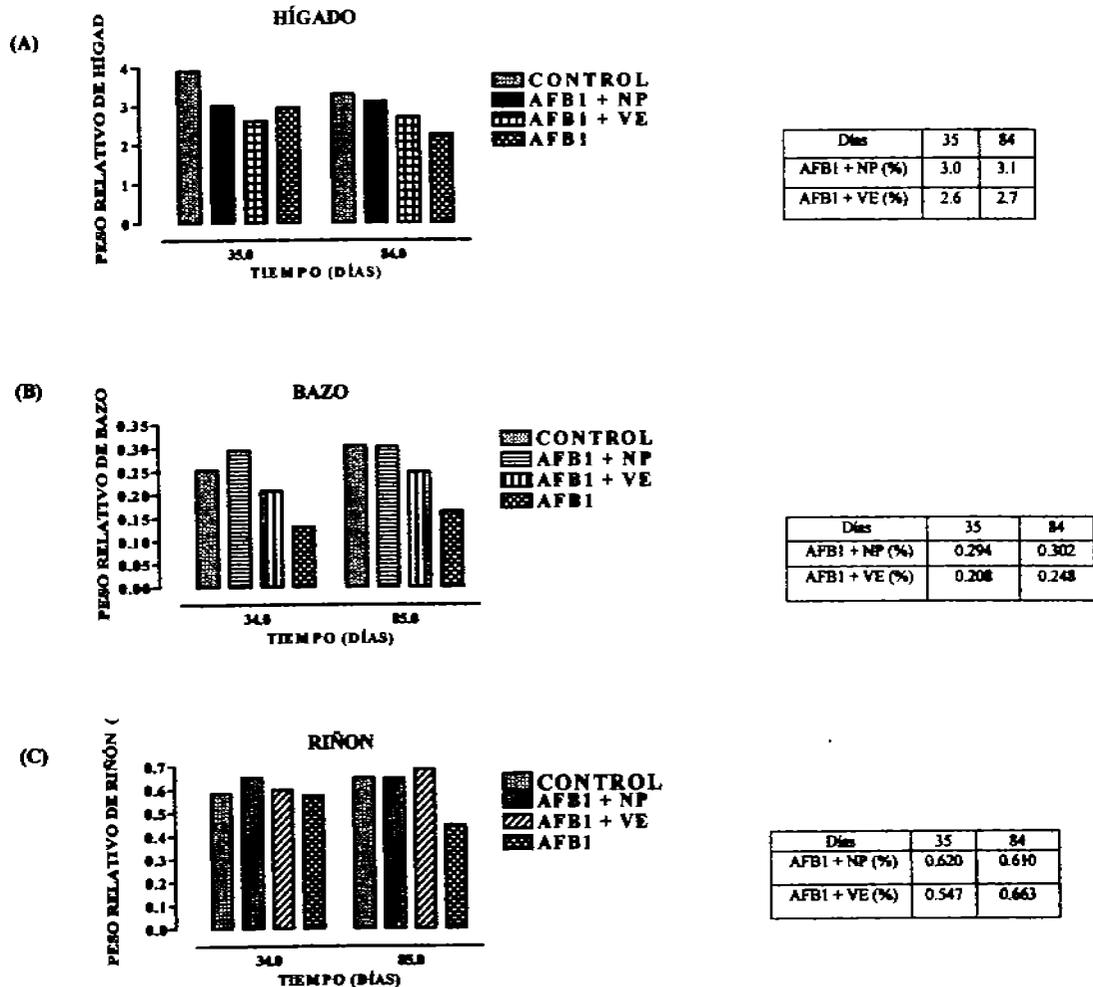
Gráfico y tabla 8. Porcentaje de hematocrito obtenido de ratas macho Wistar tratados con Nadian Plus y Vitamina E. En el gráfico se observa que el lote al que se le administró NP como al lote al que se le administró VE el porcentaje de hematocrito se mantiene constante durante los 84 días de tratamiento sin mostrar diferencia significativa. En la tabla se muestra el promedio del porcentaje por lote tratado. Los datos mostrados son la media \pm d.s. de 5 experimentos individuales. * $p < 0.05$.

X. 3 DETERMINACIÓN DEL PESO RELATIVO DE LOS ÓRGANOS HIGADO, BAZO Y RIÑONES.

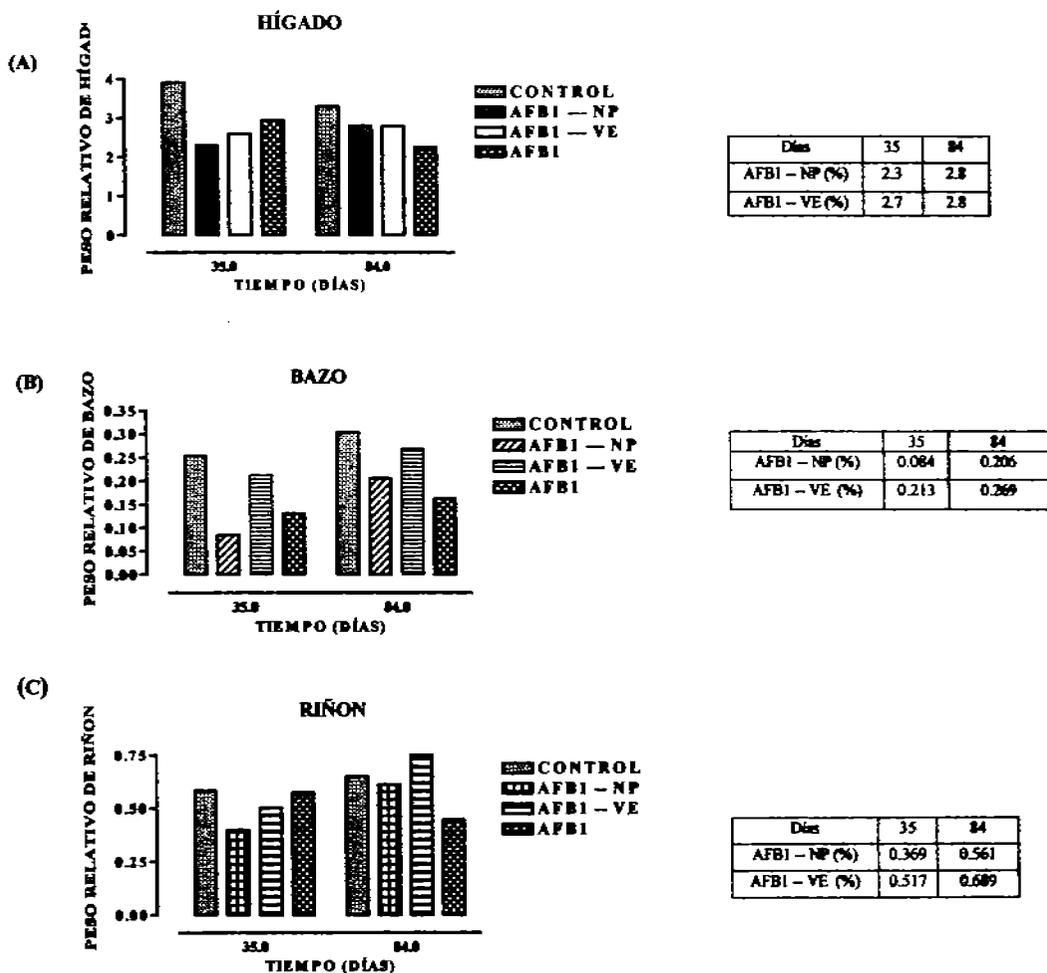
El hígado es el principal órgano que realiza las funciones metabólicas del organismo, cuando sufre un daño por un agente externo este puede sufrir lesiones patológicas, por ejemplo en el hepatocarcinoma celular se presenta una invasión del tumor al tejido y penetración de las células anormales en los vasos sanguíneos y linfáticos a través de comunicaciones venolinfáticas y de los espacios intersticiales de los ganglios linfáticos y otros tejidos como el bazo y los riñones induciendo así a la metástasis (Kohn y Liotta, 1995). El peso relativo de los órganos se obtuvo con base a la relación del peso de cada rata y de cada órgano. El lote tratado con AFB1 durante 84 días mostró una tendencia a disminuir el peso relativo del hígado, del bazo y de los riñones de manera significativa ($p < 0.05$) con respecto al lote control (*Gráficos y tablas 9 A, B y C*). En el lote tratado con AFB1 + NP se observó que el peso relativo de hígado presenta una tendencia a disminuir hasta el día 35 al igual que el lote administrado con AFB1, sin embargo el peso del órgano en el día 84 de tratamiento presentó una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al lote administrado con AFB1. Con relación al peso relativo del bazo se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) durante el tratamiento. Sin embargo el peso relativo de los riñones no presentó diferencia significativa con respecto al lote tratado con AFB1. El lote administrado con AFB1 + VE presentó el mismo comportamiento que el lote con AFB1 + NP (*Gráficos y tablas 10 A, B y C*). La tendencia observada tanto del lote de AFB1 -- NP como la del AFB1 -- VE fue la disminución del peso relativo del hígado, del bazo y de los riñones hasta el día 35 con respecto al lote control sin embargo el día 84 se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) con respecto al lote administrado con AFB1 (*Gráficos y tablas 11 A, B y C*). Finalmente, tanto el lote que recibió NP como en el lote al que se le administró VE, se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en el peso relativo de hígado en el día 35 con respecto al lote control, sin embargo el día 84 se observó un aumento significativo con respecto al lote AFB1. En relación al peso relativo del bazo y de los riñones no hubo diferencia significativa (*Gráficos y tablas 12 A, B y C*).



Gráficas y tablas 9. Peso relativo del hígado, del bazo y de los riñones obstruidos de ratas macho Wistar tratados con AFB1 durante 84 días y su respectivo control. A cada lote se le realizó un estudio patológico los días 35 y 84 del tratamiento. Durante la necropsia se observó turgencia, textura y se pesó a cada uno de los órganos. Posteriormente se realizó la relación del peso de cada órgano con respecto al peso de cada rata para obtener el peso relativo. Los gráficos muestran al lote que recibió una dosis de 1.5 ppb diaria de AFB1 durante 84 días presentando una tendencia a disminuir el peso relativo de (A) hígado, (B) bazo y (C) riñones con respecto al lote control. En las tablas se muestra el promedio del porcentaje por lote tratado. Los datos mostrados son la media \pm d.s. de 3 experimentos individuales. * $p < 0.05$.

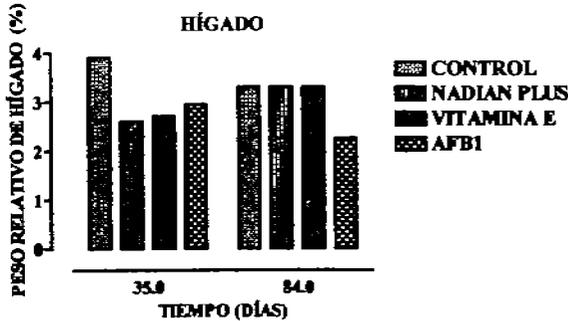


Gráficos y tablas 10. Peso relativo del hígado, del bazo y de los riñones de ratas macho Wistar tratadas con AFB1 + NP y AFB1 + VE durante 12 semanas. Los gráficos A y B muestran que el lote con AFB1 + NP presentó una tendencia a disminuir el peso relativo del hígado y del bazo hasta el día 35 al igual que el lote administrado con AFB1, sin embargo el día 84 presentó una diferencia significativa con respecto al lote administrado con AFB1; sin embargo el peso relativo de los riñones no tuvieron diferencia significativa gráfico C. El lote administrado con AFB1 + VE presentó el mismo comportamiento que el lote tratado con AFB1 + NP sin presentar diferencia significativa. En las tablas se muestran el promedio del porcentaje por lote tratado. Los datos mostrados son la media \pm d.s. de 3 experimentos individuales. * $p < 0.05$.



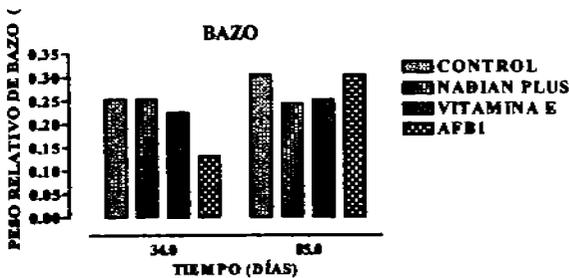
Gráficas y tablas 11. Peso relativo del hígado, del bazo y de los riñones de ratas macho Wistar tratadas con AFB1 - NP y AFB1 - VE durante 12 semanas. A cada lote de ratas se le realizó un estudio patológico los días 35 y 84 del tratamiento, a 3 animales por lote se les realizó la necropsia para el estudio macroscópico de los órganos mencionados. Se observó la tonalidad, la textura y se pesó cada uno de los órganos. Los gráficos muestran que la tendencia de los lotes tratados con AFB1 - NP como con AFB1 - VE es la de disminuir el peso relativo de los órganos hasta el día 35 con respecto al lote control; sin embargo el día 84 se observó un aumento de los pesos relativos de hígado, de bazo y los riñones con una diferencia significativa con respecto al lote tratado con AFB1. En las tablas se muestra el promedio del porcentaje por lote tratado. Los datos mostrados son la media \pm d.s de 3 experimentos individuales. * $p < 0.05$.

(A)



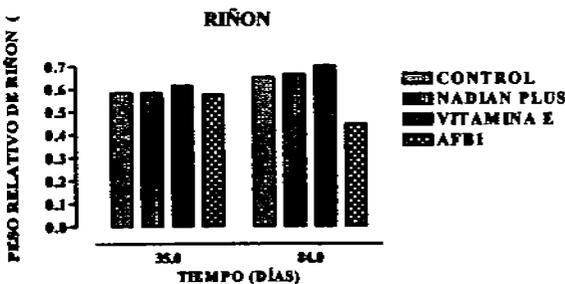
Días	35	84
NP (%)	2.6	3.3
VE (%)	2.7	3.3

(B)



Días	35	84
NP (%)	0.254	0.243
VE (%)	0.224	0.251

(C)



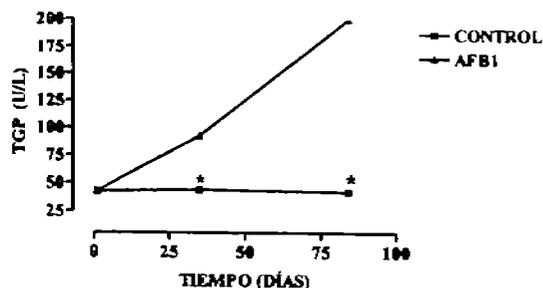
Días	35	84
NP (%)	0.510	0.620
VE (%)	0.492	0.635

Gráficos y tablas 12. Peso relativo del hígado, del bazo y de los riñones de ratas macho Wistar tratados con Nadian Plus y Vitamina E durante 12 semanas. A cada lote de ratas se le realizó un estudio patológico los días 35 y 84 del tratamiento. Se observó la tonalidad, la textura del órgano y se pesaron cada uno de los órganos A (hígado), B (bazo) y C (riñones). Los gráficos muestran que tanto el lote administrado con NP como al lote que se le administró VE presentan una disminución significativa el día 35 en el peso relativo del hígado con respecto al lote control, sin embargo el día 84 se observó un aumento en peso de los órganos (hígado, bazo y riñones). En las tablas se muestran el promedio del porcentaje por lote tratado. Los datos mostrados son la media \pm d.s de 3 experimentos individuales. * $p < 0.05$.

X. 4 MEDICIÓN DE LAS ENZIMAS TGP, TGO Y LDH.

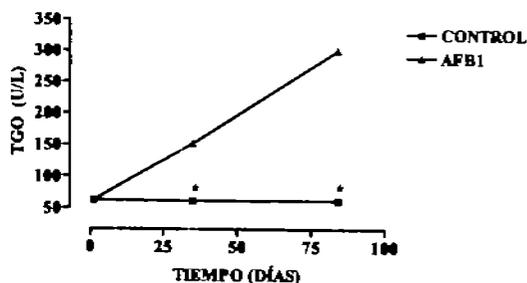
Las Transaminasas TGO y TGP son enzimas ampliamente difundidas en el organismo con elevada concentración en el corazón, en el hígado, en músculo esquelético, en los riñones y en los eritrocitos. La actividad sérica en condiciones normales es baja o nula; un daño o enfermedad en cualquiera de estos tejidos, conduce a un aumento en los niveles séricos; por ejemplo en hepatitis virales y otras formas de enfermedad hepática que involucren necrosis tisular predomina la actividad sérica de TGP (Morrison, 1999). Los valores de los 8 lotes de ratas fueron evaluados por el método colorimétrico para la determinación de la actividad sérica de las enzimas TGO y TGP con kits Wiener. Las ratas que recibieron durante 84 días una dosis de 1.5 ppb de AFB1 mostraron una tendencia a aumentar de manera significativa ($p < 0.05$) la actividad sérica de TGO y TGP con respecto a su control (*Gráficos y tablas 13 A y B*). En los lotes tratados con AFB1 + NP y AFB1 + VE se observó una tendencia a aumentar ligeramente pero significativamente ($p < 0.05$) su actividad sérica con respecto al lote tratado con AFB1, sin embargo en el día 84 se observó una disminución de la actividad sérica (*Gráficos y tablas 14 A y B*). El lote tratado con AFB1 -- NP y el lote con AFB1 -- VE, mostraron una tendencia a aumentar su actividad sérica de TGO y TGP al igual que el lote AFB1 pero el día 84 se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) con respecto al lote AFB1 (*Gráficos y tablas 15 A y B*). Finalmente, tanto los valores del lote al que se le administró NP como al que se le administró VE mantuvieron su actividad sérica de TGO y TGP dentro de los valores normales durante el tratamiento mostrando una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al lote tratado con AFB1 (*Gráficos y tablas 16 A y B*). La enzima LDH mostró el mismo comportamiento que las enzimas TGO y TGP en todos los lotes. Datos no mostrados.

(A)



Días	0	35	84
Control (U/L)	43	44	44
AFB1 (U/L)	42	96	200

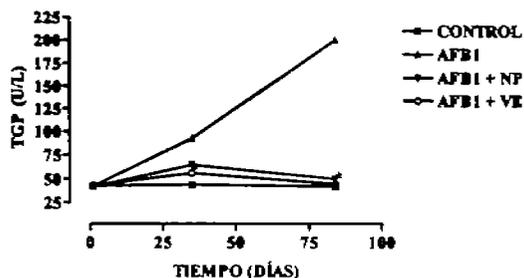
(B)



Días	0	35	84
Control (U/L)	61	60	61
AFB1 (U/L)	62	150	250

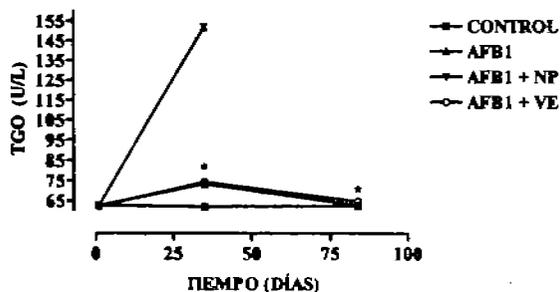
Gráficos y tablas 13. A (Transaminasa glutámico pirúvica, TGP) y B (Transaminasa glutámico oxalacética; TGO). Medición de la enzima TGP y TGO obtenida de ratas macho Wistar tratados con AFB1 durante 84 días y su respectivo control. Los valores de cada lote de ratas fue evaluado los días 1, 35 y 84 por el método colorimétrico para la determinación de la actividad sérica de la enzima TGP y TGO con kits Wiener. Las ratas tratadas con AFB1 mostraron una tendencia a aumentar de manera significativa la actividad sérica de TGP y la de TGO con respecto a su control. En las tablas se muestra el promedio por lote tratado. Los datos mostrados son la media \pm d.s. de 5 experimentos individuales. * $p < 0.05$.

(A)



Días	0	35	84
AFB1 + NP	40	62	50
AFB1 + VE	47	58	45

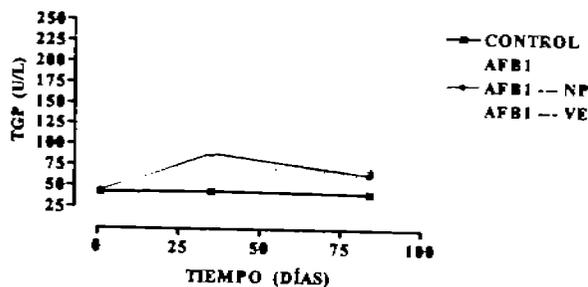
(B)



Días	0	35	84
AFB1 + NP	61	74	61
AFB1 + VE	63	75	62

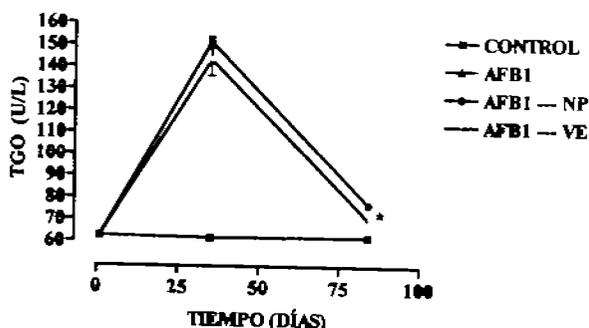
Gráficos y tablas 14. A (Transaminasa glutámico pirúvica, TGP) y B (Transaminasa glutámico oxalacética; TGO). Medición de la enzimas TGP y TGO obtenidas de ratas macho Wistar (tratados con AFB1 + NP y AFB1 + VE). Los valores de cada lote de ratas fueron evaluados los días 1, 35 y 84 por el método colorimétrico para la determinación de la actividad sérica de las enzimas TGP y TGO con kits Wiener. Los gráficos muestran en ambos lotes una tendencia a aumentar ligeramente pero significativamente su actividad sérica con respecto al lote tratado con AFB1, sin embargo el día 84 se observó una disminución de la actividad sérica de TGP y TGO. Entre ambos lotes no hay diferencia significativa. En las tablas se muestra el promedio por lote tratado. Los datos mostrados son la media \pm d.s. de 5 experimentos individuales. * $p < 0.05$.

(A)



Días	0	35	84
AFB1 -- NP	42	87	65
AFB1 -- VE	42	93	60

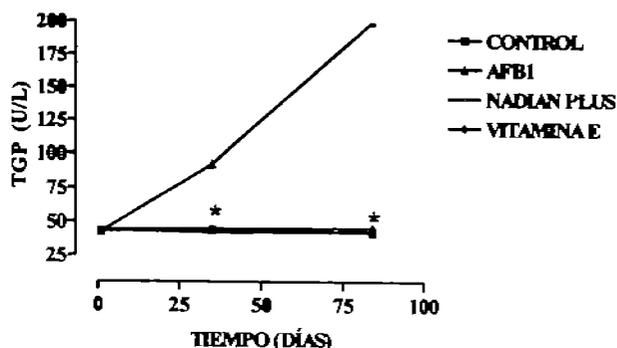
(B)



Días	0	35	84
AFB1 -- NP	42	87	65
AFB1 -- VE	42	93	60

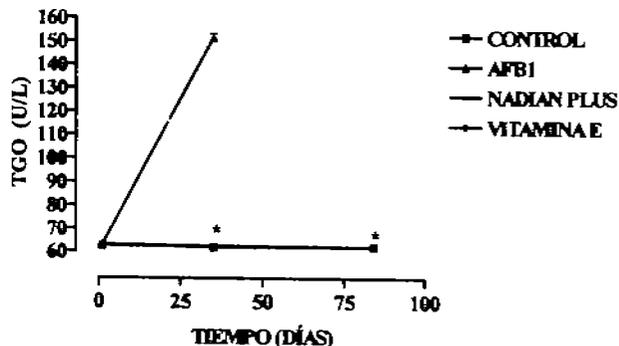
Gráficos y tablas 15. A (Transaminasa glutámico pirúvica, TGP) y B (Transaminasa glutámico oxalacética; TGO). Medición de las enzimas TGP y TGO obtenidas de ratas macho Wistar tratados con (AFB1 -- NP) y tratados con (AFB1 -- VE). Los valores de cada lote de ratas fue evaluado los días 1, 35 y 84 por el método colorimétrico para la determinación de la actividad sérica de las enzimas TGP y TGO con kits Wiener. El lote de ratas tratado con AFB1 -- NP y el lote tratado con AFB1 -- VE, mostraron una tendencia a aumentar su actividad hasta el día 35 al igual que el lote administrado con AFB1; sin embargo se observó una disminución de la actividad sérica de la TGP y TGO el día 84 mostrando una diferencia significativa con respecto al lote AFB1. Entre ambos lotes no hubo diferencia significativa. En las tablas se muestra el promedio por lote tratado. Los datos mostrados son la media \pm d.s. de 5 experimentos individuales. * $p < 0.05$.

(A)



Días	0	35	84
NP	44	42	43
VE	45	47	45

(B)



Días	0	35	84
NP	44	42	43
VE	45	47	45

Gráfico y tabla 16. A (Transaminasa glutámico pirúvica, TGP); B (Transaminasa glutámico oxalacética; TGO). Medición de las enzimas TGP y TGO obtenidas de ratas macho Wistar tratadas con Nadian Plus y Vitamina E. Los valores de cada lote fue evaluado los días 1, 35 y 84 por el método colorimétrico para la determinación de la actividad sérica de las enzimas TGP y TGO con kits Wiener. El lote de ratas tratado con NP y el lote al que se le administró VE mantuvieron su actividad sérica de TGP y TGO con valores normales; sin embargo hubo una diferencia significativa con respecto al lote tratado con AFB1. En las tablas se muestra el promedio por lote tratado. Los datos mostrados son la media + d.s. de 5 experimentos individuales. * $p < 0.05$.

X.5 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.

El diagnóstico del HCC ha sido establecido sobre pruebas básicas citológicas e histopatológicas, la neoplasia se constituye por células hepáticas anormales dispuestas en cordones separados por sinusoides con diferenciación variable; las células tienen núcleos crecidos y muestran nucleolos prominentes e hiper cromatismo (Llovet y Beaugrand, 2003). Con relación al estudio histopatológico de los órganos (hígado, bazo y riñones) realizado en nuestro proyecto se observó que el día 35 el lote control presentó en hígado degeneración albuminosa difusa moderada e hiperplasia de conductos biliares (*Figura 10A y 10B*) comparadas con el lote AFB1 que presentó degeneración albuminosa difusa moderada, poliploidia, picnosis, congestión difusa leve, necrosis coagulativa peri acinar moderada, anisocariosis, hepatitis grasa severa y degeneración vacuolar severa (*Figura 10C - 10F*); sin embargo el día 84 el lote control presentó degeneración albuminosa difusa y degeneración vacuolar multifocal leve (*Figura 11A*) y en el lote AFB1 se observó anisocariosis leve, necrosis individual coagulativa, lobulillos con puentes de tejido conjuntivo, degeneración vacuolar, megacariosis, anisocitosis, necrosis y fibrosis (*Figura 11B - 11E*). Las características presentadas en el bazo el día 35 del lote control fueron depleción linfóide y congestión difusa leve (*Figura 12A*) y en riñones se observó degeneración albuminosa moderada y congestión leve (*Figura 12B*), comparando con el lote AFB1 que presentó en bazo depleción linfóide moderada, congestión severa y hemosiderosis (*Figura 12C y 12D*); en riñones se observó degeneración albuminosa difusa severa, glomerulitis, necrosis coagulativa difusa moderada, picnosis y congestión multifocal moderada (*Figura 12E y 12F*). El día 84 el lote control presentó nódulos linfóides en bazo (*Figura 13A*) y en riñones se observó degeneración albuminosa difusa moderada (*Figura 13B*), comparado con el lote AFB1 que se observó en bazo depleción linfóide moderada y hemosiderosis moderada (*Figura 13C y 13D*) y en riñones se observó degeneración albuminosa difusa moderada, nefritis intersticial multifocal leve y congestión difusa leve (*Figura 13E y 13F*). El lote con AFB1 + NP presentó el día 35 las siguientes lesiones hepáticas: degeneración albuminosa centrolobulillar leve, degeneración vacuolar leve, células de Kupffer, hiperplasia de conductos biliares leve y necrosis individual (*Figura 14A - 14D*); comparado con el lote AFB1 + VE que presentó hepatitis albuminosa, necrosis individual, células mononucleares, anisocariosis, megacariocitos, hemosiderosis, hiperplasia de conductos biliares, degeneración albuminosa leve y congestión leve

(Figura 14E - 14H); sin embargo el día 84 en el lote AFB1 + NP se observó degeneración albuminosa centrolobulillar, degeneración vacuolar y necrosis en espacio porta (Figura 16A); y el lote AFB1 + VE presentó hiperplasia de conductos biliares y degeneración vacuolar periportal (Figura 16D). El día 35 se observaron las siguientes lesiones en bazo del lote AFB1 + NP depleción linfocítica moderada y congestión difusa moderada (Figura 15A) y en riñones se presentó degeneración albuminosa moderada, glomerulitis y congestión difusa moderada (Figura 15B); sin embargo el lote AFB1 + VE presentó depleción linfocítica moderada, congestión y hemosiderosis difusa moderada (Figura 15C y 15D) y en riñones se observó degeneración albuminosa difusa moderada y congestión leve (Figura 15E); el día 84 el lote AFB1 + NP presentó en bazo depleción linfocítica difusa moderada (Figura 16B) y en riñones degeneración albuminosa difusa moderada y hemorragia multifocal moderada (Figura 16C) comparado con el lote AFB1 + VE que presentó en bazo depleción linfocítica difusa moderada y hemosiderosis (Figura 16E) y en riñones se observó degeneración albuminosa severa, congestión difusa multifocal, hemorragia y glomerulitis (Figura 16F y 16G). Los lotes AFB1 — NP y AFB1 — VE presentaron el día 35 la misma patología en hígado (Figura 10C - 10F), bazo (Figura 12C y 12D) y riñones (Figura 12E y 12F) que el lote AFB1. Sin embargo el día 84 en ambos lotes se observó a nivel hepático degeneración periportal vacuolar moderada e hiperplasia de conductos biliares (Figura 17A y 17B) en bazo se observó depleción linfocítica moderada y hemosiderosis (Figura 17C) y en riñones se presentó degeneración albuminosa difusa moderada, hemorragias multifocal y congestión (Figura 17D). El lote administrado con NP durante 35 días presentó a nivel hepático hiperplasia de conductos biliares, necrosis individual moderada, hepatitis grasa difusa moderada y congestión difusa moderada (Figura 18A - 18C). El lote administrado con VE presentó degeneración albuminosa, congestión leve e hiperplasia de conductos biliares (Figura 18D y 18E); en el día 84 el lote NP presentó degeneración albuminosa leve (Figura 20A) y en el lote VE se observó degeneración albuminosa difusa, degeneración vacuolar leve e hiperplasia de conductos biliares leve (Figura 20D y 20E). Las características presentadas en el bazo del lote NP el día 35 fueron depleción linfocítica moderada, hemosiderosis leve y congestión moderada (Figura 19A y 19B) y a nivel renal se presentó degeneración albuminosa difusa moderada y congestión leve (Figura 19C). En el lote VE se observó en bazo depleción linfocítica leve, congestión moderada difusa y

hemosiderosis leve (*Figura 19D*) y a nivel renal se presentó degeneración difusa leve y congestión leve (*Figura 19 E*); en el día 84 en el lote NP se observó en bazo depleción linfoide leve (*Figura 20B*) y en riñones degeneración albuminosa moderada y congestión leve (*Figura 20C*). En el bazo del lote VE se observó depleción linfoide leve y poca hemosiderosis (*Figura 20F*) y a nivel renal se observó degeneración albuminosa leve difusa y congestión leve (*Figura 20G*).

**CONTROL
HÍGADO**



(A)

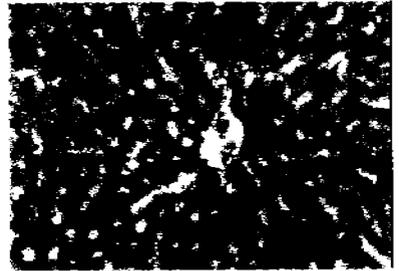


(B)

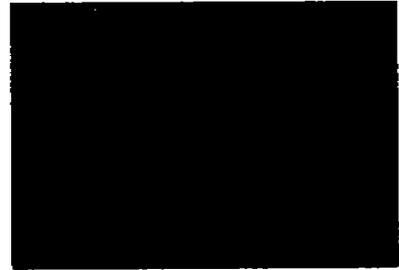
AFB1 HÍGADO



(C)



(D)



(E)



(F)

Figura 18. Cortes histológicos de lesiones hepáticas de los lotes control y AFB1 durante 35 días; A y B lote control; C, D, E y F lote AFB1. (A) degeneración albuminosa difusa moderada, (B) hiperplasia de conductos biliares. (C) degeneración albuminosa difusa moderada, poliploidia, picaosis, coagestión difusa leve, (D) necrosis coaglativa periacinar moderada, (E) anisocariosis, (F) hepatosis grasa severa y degeneración vacuolar severa.

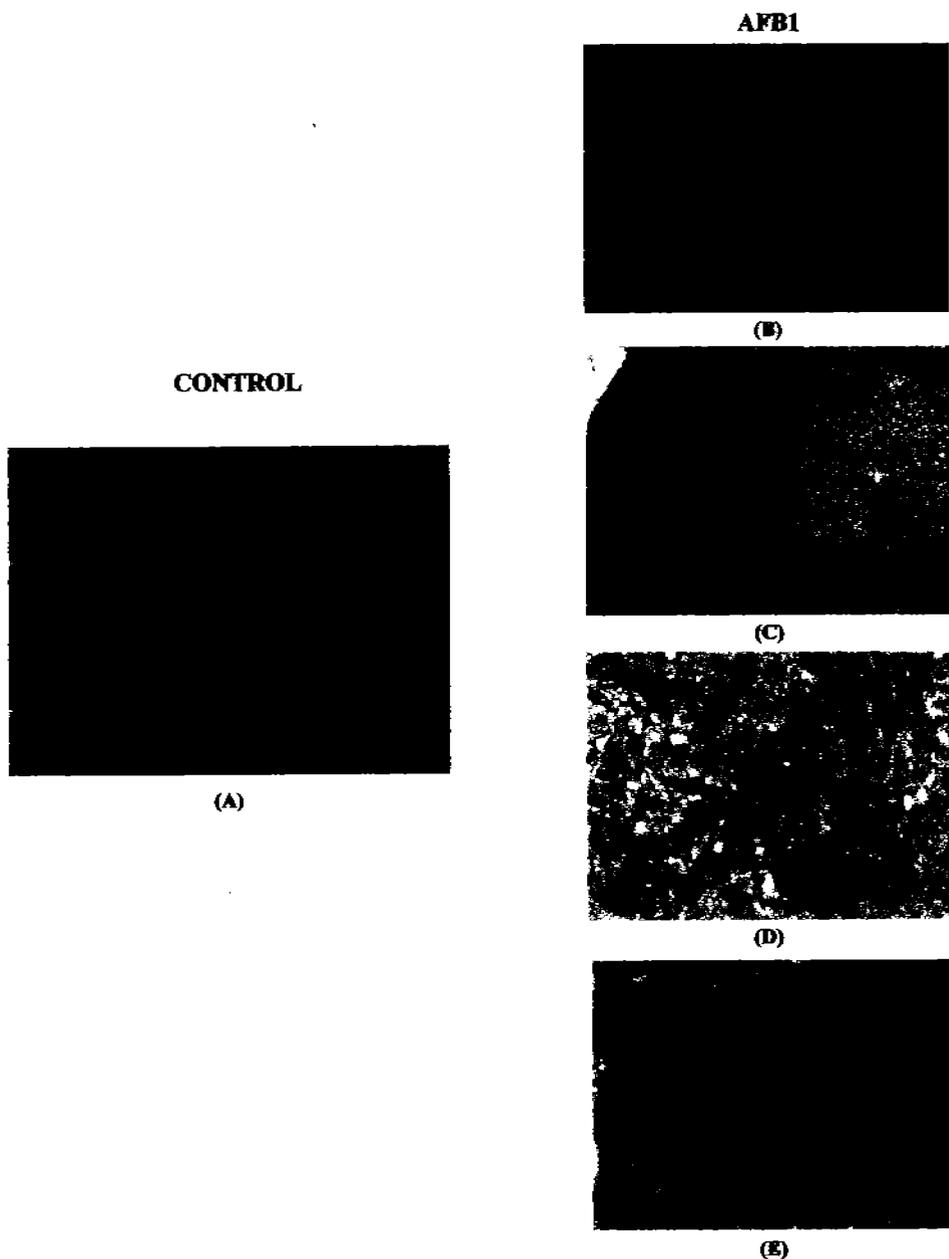


Figura 11. Cortes histológicas de lesiones hepáticas en los lotes control y AFB1 día 84; A lote control; B, C, D y E lote AFB1. (A) degeneración albuminosa difusa y degeneración vacuolar multifocal leve. (B) anisocariosis leve y necrosis individual coagulativa, (C) lobulillos con puentes de tejido conjuntivo, (D) degeneración vacuolar, megacariosis y anisocitosis, (E) necrosis y fibrosis.

**CONTROL
BAZO**



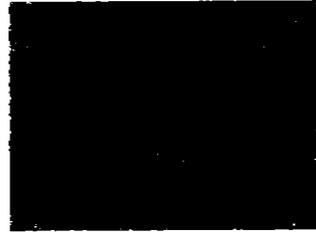
(A)

**CONTROL
RIÑÓN**

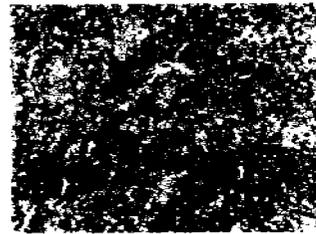


(B)

AFB1 BAZO



(C)



(D)

AFB1 RIÑÓN



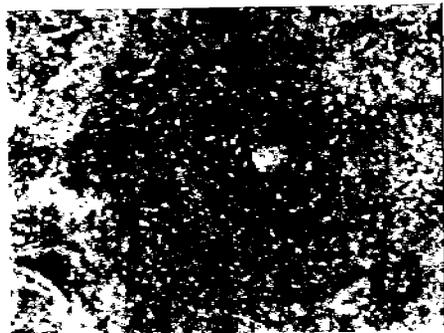
(E)



(F)

Figura 12. Cortes histológicos de lesiones en bazo y riñones de los lotes control y AFB1 durante 35 días; A bazo del lote control y B de riñón; B y C bazo del lote AFB, E y F de riñón. (A) depleción linfóide leve y congestión difusa leve. (B) degeneración albuminosa moderada y congestión leve, (C) depleción linfóide moderada y congestión severa, (D) hemosiderosis. (E) degeneración albuminosa difusa severa, glomerulitis, necrosis coagulativa difusa moderada, (F) picaosis y congestión multifocal moderada.

**CONTROL
BAZO**



(A)

AFB1 BAZO



(C)



(D)

**CONTROL
RIÑÓN**



(B)

AFB1 RIÑÓN



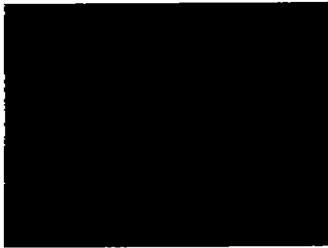
(E)



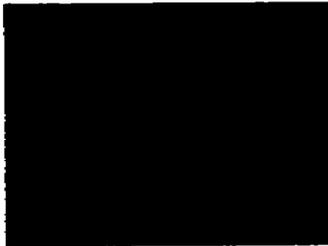
(F)

Figura 13. Cortes histológicos de lesiones en bazo y riñones de los lotes control y AFB1 día 84; A bazo del lote control y B de riñón; B y C bazo del lote AFB1; E y F de riñón. (A) nódulos linfoides, (B) degeneración albuminosa difusa moderada, (C) depresión linfóide moderada, (D) hemosiderosis moderada, (E) degeneración albuminosa difusa moderada, nefritis intersticial multifocal leve, (F) congestión difusa leve.

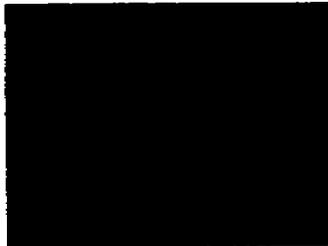
AFB1 + NP HÍGADO



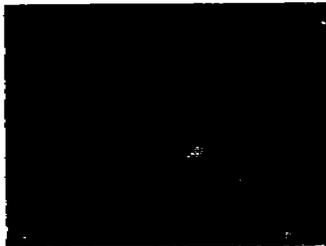
(A)



(B)



(C)

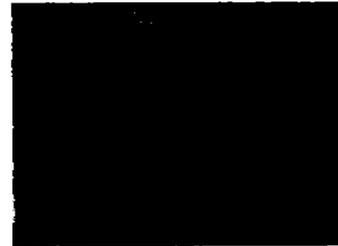


(D)

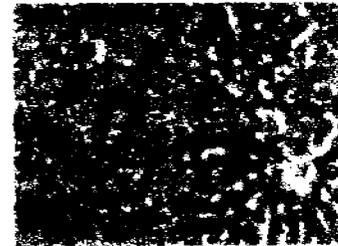
AFB1 + VE HÍGADO



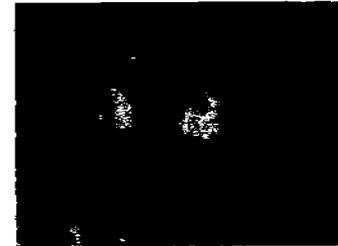
(E)



(F)



(G)



(H)

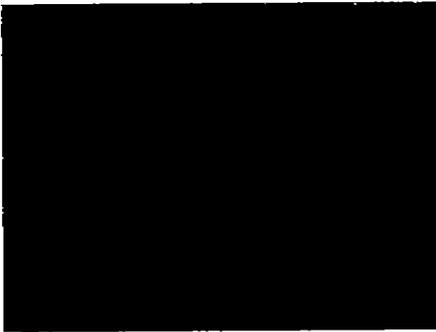
Figura 14. Cortes histológicos de lesiones de hígado de los lotes AFB1 + NP y AFB1 + VE durante 35 días; A, B, C y D lote AFB1 + NP; E, F, G y H lote AFB1 + VE. (A) degeneración albuminosa centrolobulillar leve, degeneración vacuolar leve, (B) células de Kupffer, (C) hiperplasia de conductos biliares leve, (D) necrosis individual, (E) hepatosis albuminosa, necrosis individual, células mononucleares, (F) anisocariosis, megacariocitos y hemosiderosis, (G) hiperplasia de conductos biliares, (H) degeneración albuminosa leve y congestión leve.

**AFB1 + NP
BAZO**



(A)

**AFB1 + NP
RIÑÓN**

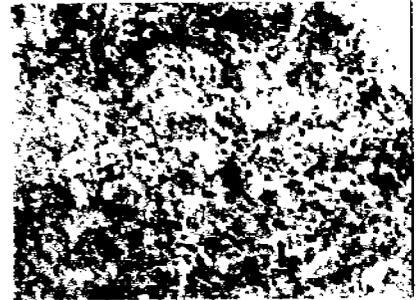


(B)

**AFB1 + VE
BAZO**



(C)



(D)

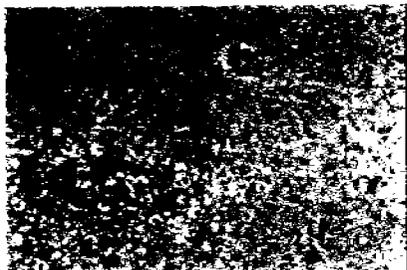
**AFB1 + VE
RIÑÓN**



(E)

Fig. 15. Cortes histológicas de lesiones de bazo y riñones de los lotes AFB1 + NP y AFB1 + VE día 35; A bazo y B riñón del lote AFB1 + NP; C, D bazo y E riñón del lote AFB1 + VE. (A) depleción linfóide moderada y congestión difusa moderada, (B) degeneración albuminosa moderada, glomerulitis, congestión difusa moderada, (C) depleción linfóide moderada y congestión, (D) hemosiderosis difusa moderada, (E) degeneración albuminosa difusa moderada y congestión leve.

**AFB1 + NP
HÍGADO**



(A)

**AFB1 + NP
BAZO**



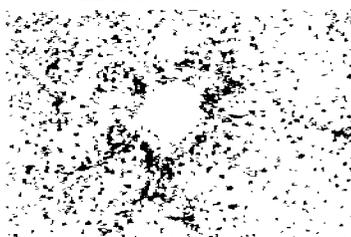
(B)

**AFB1 + NP
RIÑÓN**



(C)

AFB1 + VE HÍGADO



(D)

AFB1 + VE BAZO



(E)

AFB1 + VE RIÑÓN



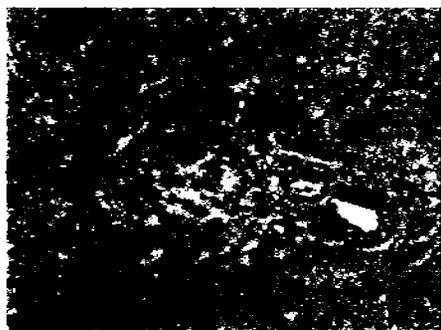
(F)



(G)

Figura 16. Cortes histológicas de lesiones en hígado, bazo y riñones de los lotes AFB1 + NP y AFB1 + VE día 35; A hígado, B bazo y C riñón del lote control; D hígado, E bazo, F y G riñón del lote AFB1. (A) degeneración albuminosa centrolobulillar, degeneración vacuolar y necrosis en espacio porta, (B) depleción linfóide difusa moderada, (C) Degeneración albuminosa difusa moderada y hemorragia multifocal moderada, (D) hiperplasia de conductos biliares y degeneración vacuolar periportal, (E) depleción linfóide difusa moderada y hemostiderosis, (F) degeneración albuminosa severa y congestión difusa multifocal y hemorragia, (G) glomerulofitias.

**AFB1 — NP y AFB1 — VE
HÍGADO**



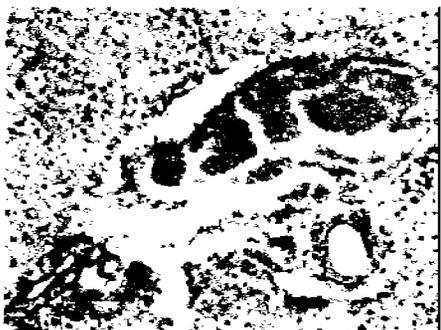
(A)

**AFB1 — NP y AFB1 — VE
BAZO**

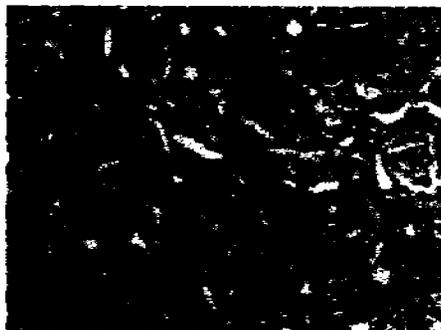


(C)

**AFB1 — NP y AFB1 — VE
RIÑÓN**



(B)



(D)

Figura 17. Cortes histológicos de lesiones en hígado, bazo y riñones en los lotes AFB1 — NP y AFB1 — VE día 85; A y B Hígado, C bazo y D riñón. (A) degeneración periportal vacuolar moderada, (B) hiperplasia de conductos biliares, (C) depleción linfocítica moderada y hemosiderosis, (D) degeneración albuminosa difusa moderada, hemorragias multifocal y congestión.

**NP
HÍGADO**



(A)



(B)



(C)

**VE
HÍGADO**



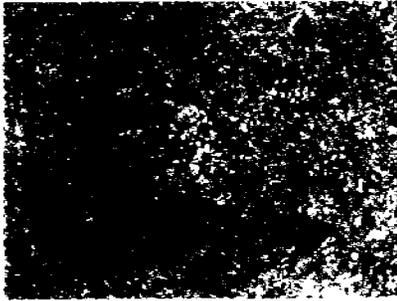
(D)



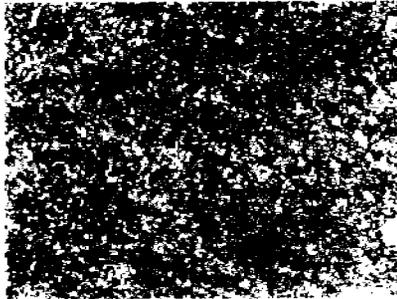
(E)

Figura 18. Cortes histológicos de lesiones hepáticas de los lotes NP y VE durante 35 días; A, B y C hígado del lote NP, D y E del lote VE. (A) hiperplasia de conductos biliares, (B) necrosis individual moderada, (C) hepatosis grasa difusa moderada y congestión difusa moderada, (D) degeneración albuminosa y congestión leve, (E) hiperplasia de conductos biliares.

NP
BAZO



(A)



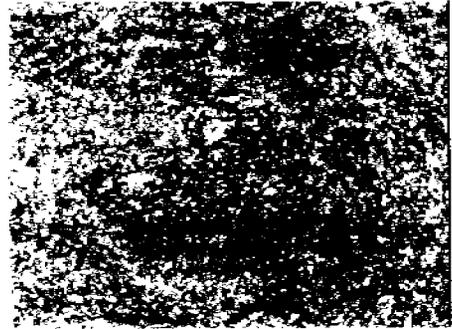
(B)

NP
RIÑÓN



(C)

VE
BAZO



(D)

VE
RIÑÓN



(E)

Figura 19. Cortes histológicas de lesiones de bazo y riñones de los lotes NP y VE día 35; A, B bazo y C riñón del lote NP; D bazo y E riñón del lote VE. (A) depleción linfóide moderada, (B) hemosiderosis leve y congestión moderada, (C) degeneración albuminosa difusa moderada y congestión leve, (D) depleción linfóide leve, congestión moderada difusa y hemosiderosis leve, (E) degeneración difusa leve y congestión leve.

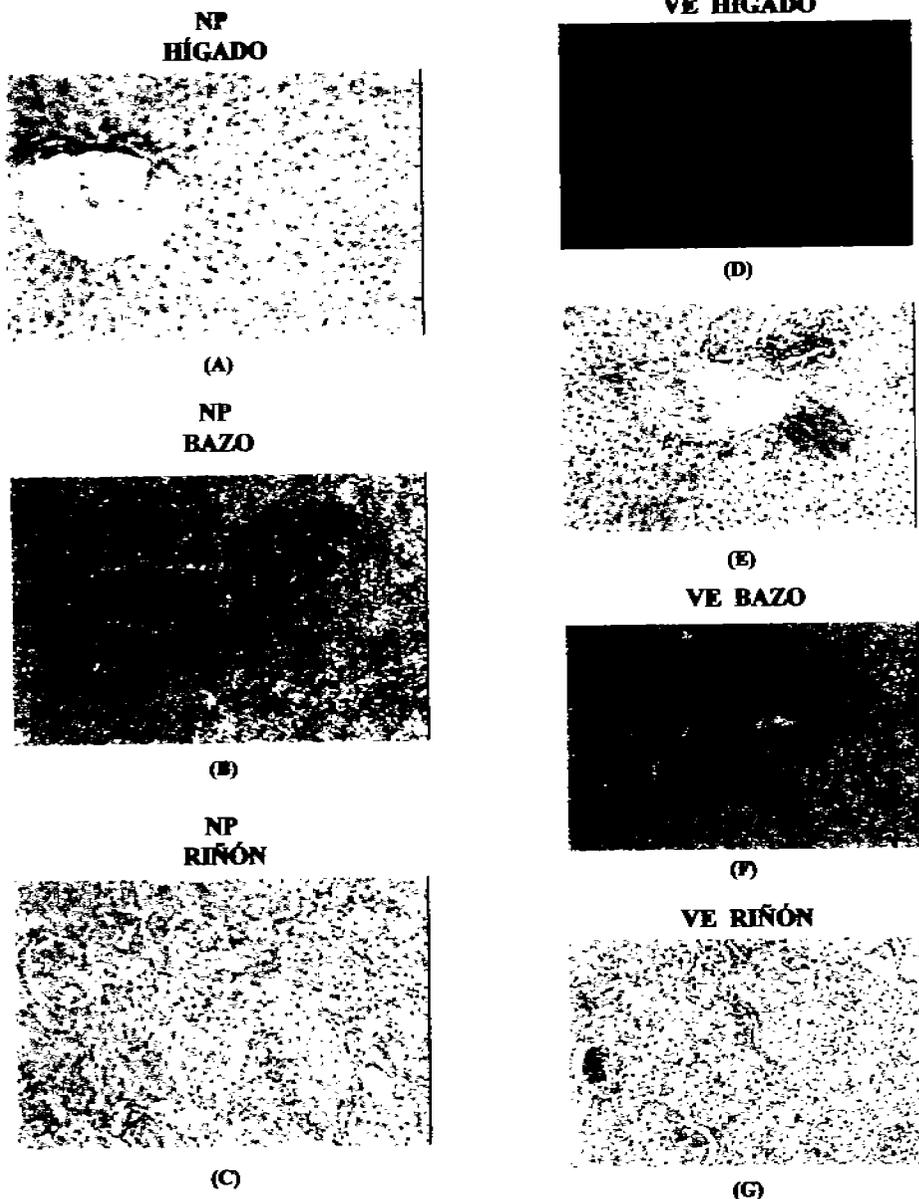


Figura 29. Cortes histológicos en lesiones hepáticas, bazo y riñones de los lotes NP y VE día 85; A hígado, B bazo y C riñón del lote NP; D y E hígado, F bazo y G riñón del lote VE. (A) degeneración albuminosa leve, (B) depleción linfóide leve, (C) degeneración albuminosa moderada y congestión leve, (D) degeneración albuminosa difusa y degeneración vacuolar leve, (E) hiperplasia de conductos biliares leve, (F) depleción linfóide leve y poca hemosiderosis, (G) degeneración albuminosa leve difusa y congestión leve.

XI. DISCUSIÓN.

El HCC representa aproximadamente el 5% de los cánceres en el mundo y el número de muertes excede a las 500,000 por año. Uno de los principales factores epidemiológicos que caracterizan este cáncer son enfermedades hepáticas previas como la cirrosis, el virus de la hepatitis B y C (Llovet y Beaugrand, 2003).

SÍNDROMES TÓXICOS.

Existen varias características clínicas que incluyen un HCC entre ellas, se presenta un dolor en el cuadrante superior derecho, dolor abdominal agudo, anorexia, hemorragias en hígado, caída de pelo y la pérdida de peso entre otras (Befeler y Di Bisceglie, 2002). Los resultados en nuestro modelo animal nos permitieron determinar algunos síntomas clínicos como la anorexia, la pérdida de pelo y la disminución en peso. Los resultados mostraron que el lote tratado con AFB1 presentó una disminución significativa de peso con respecto a sus controles (NP, VE y control) mientras que los lotes AFB1 + NP, AFB1 + VE, AFB1 -- NP y AFB1 -- VE mostraron el mismo comportamiento que AFB1 pero con una tendencia a incrementar de peso a partir del día 50 sin diferencia significativa. Además el lote AFB1 presentó caída de pelo y anorexia. Estos resultados nos hacen sugerir que: a) la AFB1 esta ocasionando pérdida de pelo, disminución en peso y anorexia; b) el NP y la VE pudieran ayudar a contrarrestar los efectos provocados por la AFB1 con respecto a la caída de pelo y la anorexia; sin embargo si el tratamiento hubiese durado más de 100 días es probable que existiera una diferencia significativa en relación al aumento de peso.

HEMATOCRITO.

Morrisson, (1999) sugiere que el hematocrito puede verse alterado debido a la formación de algunos tumores, enfermedades renales y/o anemias entre otras. El lote que se trató con AFB1 disminuyó el porcentaje del hematocrito sin embargo los lotes AFB1 + NP, AFB1 + VE, AFB1 -- NP y AFB1 -- VE a partir del día 35 presentaron un incremento en el porcentaje del hematocrito de manera significativa con respecto al lote AFB1 hasta llegar a su valor normal. Esto nos hace sugerir que tanto el NP y la VE pudieran ayudar a contrarrestar el efecto de seguir disminuyendo el hematocrito debido a que el NP contiene hierro (componente de la hemoglobina y mioglobina), vitaminas B₆ y B₁₂ que ayudan en la

producción de glóbulos rojos, además contiene vitamina C que interviene en la absorción del hierro (Casanueva y col.,2001).

MEDICIÓN DE LAS ENZIMAS TGO Y TGP.

Las enzimas TGO y TGP son enzimas que pueden verse alteradas por alguna afección hepática (Morrison, 1999). Las ratas tratadas con AFB1 mostraron un aumento significativo en los valores de las enzimas TGO y TGP, sin embargo al haber tratado a los lotes AFB1 + NP, AFB1 + VE, AFB1 — NP y AFB1 — VE los valores disminuyeron de manera significativa con respecto al lote AFB1. Estos resultados sugieren que tanto el NP como la VE pudieran ayudar a contrarrestar el efecto de seguir aumentando la concentración de TGO y TGP ya que la vitamina E es un antioxidante y la vitamina C que se encuentra en el NP podría estar contribuyendo a la regeneración celular, además de mejorar la resistencia al cáncer ya que es un antioxidante intracelular. Con lo discutido previamente la AFB1 está ocasionando caída de pelo, disminución de peso, anorexia, disminución de hematocrito y valores elevados de las enzimas TGO, TGP y LDH. Estas son algunas características que pudieran asemejarse a un HCC (Marrero y col, 2005). Sin embargo el incremento de las enzimas TGO y TGP no necesariamente son mediciones básicas de un HCC ya que pueden verse afectadas por alteraciones en corazón, en el hígado o en los riñones (Morrison, 1999).

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.

Con relación al estudio histopatológico realizado en nuestro proyecto observamos que el lote tratado con AFB1 presentó en hígado, en bazo y en los riñones lesiones que afectan la estructura celular de estos órganos comparado con sus controles donde las lesiones observadas fueron leves. Estos resultados nos hacen sugerir que el sorgo ingerido por los controles contenía una concentración baja de AFB1. Esto nos podría indicar que la AFB1 está ocasionando daño los órganos mencionados. Sin embargo cuando nuestros animales fueron tratados con AFB1 + NP durante 35 días se observó que las lesiones en el hígado fueron leves, además de la presencia de células de Kupffer sugiriéndonos que el sistema inmune podría estar activado. En bazo y riñones las lesiones disminuyeron a un grado moderado. Por otro lado, el lote AFB1 + VE presentó un mayor daño hepático que el lote

AFB1 + NP esto nos hace sugerir que el NP está contrarrestando mejor los efectos de la AFB1 en el hígado, ya que en el bazo y en los riñones no hubo diferencias en cuanto a lesiones. El peso relativo de los órganos disminuyó a los 35 días de tratamiento; sin embargo su tendencia fue de aumentar, esto nos hace pensar que el NP puede estar jugando un papel terapéutico en la alteración hepática que esta provocando la AFB1. Finalmente los parámetros histopatológicos de los lotes tratados con AFB1 — NP o AFB1 — VE mostraron que la administración de NP o VE contrarrestó el avance de las lesiones en los órganos mencionados evitando que en el hígado se pudiera presentar cirrosis como se observó en el lote tratado con AFB1 a los 84 días de tratamiento. Este estudio histopatológico nos indica que el NP podría estar contrarrestando desde el inicio los efectos provocados por la AFB1 pero también nos hace sugerir que la vitamina E pudiera estar jugando un papel importante en disminuir los efectos provocados por la AFB1 ya que es un eficaz antioxidante; sin embargo los resultados nos sugieren que el NP pudiera tener un efecto más potente que la vitamina E ya que este suplemento contiene diferentes elementos nutricionales que ayudan al mantenimiento de las funciones bioquímicas del organismo. por ejemplo la vitamina A que capta radicales libres, interviene en el mantenimiento de los epitelios, en la respuesta inmune y en la diferenciación celular. La vitamina B₁ es un antioxidante, interviene en reacciones de descarboxilación. La vitamina B₂ que interviene en reacciones de oxido-reducción e incrementa la formación de anticuerpos. La vitamina B₆ que interviene en reacciones de transaminación y descarboxilación, además mejora la actividad de los linfocitos T y B contribuyendo a la prevención del cáncer. La vitamina B₁₂ que interviene en las reacciones de metilación y mejora la resistencia a las enfermedades gracias a su influencia en la actividad de los linfocitos T y B. La vitamina C que interviene en las reacciones de carboxilación, transcarboxilación y descarboxilación, antioxidante del radical superóxido, del peróxido de hidrógeno, del hipoclorito y del radical hidróxilo, contribuye a la formación de los tejidos, además mejora la resistencia al cáncer y es un antioxidante hidrosoluble intracelular. La vitamina D que participa en la respuesta inmune. La vitamina E que también es un antioxidante. El calcio que interviene en la permeabilidad de las membranas. El magnesio cofactor en reacciones donde interviene el ATP. Finalmente derivados de la colmena que tienen función antibiótica y son fuente de proteínas y minerales (Casanueva y col.; 2001).

XII. CONCLUSIONES.

1.- La AFB1 provocó síndromes tóxicos como son disminución de peso, caída de pelo, anorexia y mortalidad; a nivel bioquímico se presentó una disminución en el volumen de eritrocitos representado por el porcentaje del hematocrito; y se incrementó la concentración de las enzimas TGO, TGP y LDH indicándonos una enfermedad hepática que involucra necrosis tisular.

2.- El estudio histopatológico nos confirmó un severo daño hepático hasta llegar a inducir cirrosis, así como daño en bazo y riñones.

3.- El Nadian Plus debido a los elementos nutricionales que contiene podría inhibir los síndromes tóxicos como la anorexia, la caída de pelo y disminución en el peso; además de mantener los niveles normales del hematocrito y de las enzimas TGO, TGP y LDH que fueron alteradas por la AFB1.

4.- Con base a los resultados mostrados sugerimos que el Nadian Plus ayuda a disminuir el grado de lesiones presentes en los órganos de los animales tratados con AFB1.

5.- Sugerimos que el efecto que tiene el Nadian Plus en el organismo ante un daño hepático podría ser mejor que el de la vitamina E.

XIII. GLOSARIO

Anisocitosis: Desigualdad en el tamaño de las células especialmente de los glóbulos rojos.

Anóxica: Término general para los estados de oxigenación insuficiente.

Ascitis: Acumulación de líquido en la cavidad peritoneal por exudación o trasudación.

Congestión: Acumulación excesiva o anormal de sangre en los vasos de una parte.

Criptogénica: Procesos infectivos cuya puerta de entrada o asiento se ignora.

Degeneración: Alteración de los tejidos o elementos anatómicos, con cambios químicos de la sustancia constituyente y pérdida de los caracteres y funciones esenciales.

Depleción: Disminución de la cantidad de líquidos, especialmente de la sangre del cuerpo o de un órgano.

Edema: Acumulación excesiva de líquido subcutáneo y espacio intersticial en el tejido celular.

Embolia: Obstrucción brusca de una arteria por un cuerpo arrastrado por la corriente sanguínea.

Endoflebitis: Inflamación de la túnica interna de las venas.

Epigastrio: Región superior y media del abdomen, entre ambos hipocondrios y desde la apófisis xifoides hasta dos dedos por encima del ombligo.

Epiplón: Repliegue que une las vísceras entre sí y contiene los vasos y conductos.

Esplenomegalia: Aumento del volumen o hipertrofia del bazo.

Estroma: Armazón de un órgano, glándula u otra estructura, generalmente de tejido conjuntivo que sirve para sostener entre sus mallas los elementos celulares.

Extravasación: Salida de un líquido del vaso que lo contiene.

Febrícula: Fiebre ligera, especialmente la de larga duración y origen no bien conocido.

Fibrosis: Formación de tejido fibroso.

Ginecomastia: Volumen excesiva de las mamas en el hombre.

Glomerulitis: Inflamación de los glomérulos renales.

Hedor: Olor fétido.

Hematemesis: Vomito de sangre.

Hemocromatosis: Trastorno metabólico caracterizado por acumulación de grandes cantidades de hierro con pigmentación cutánea y visceral.

Hemosiderina: Pigmento amarillo oscuro que contiene hierro, producto de descomposición de la hemoglobina que se encuentra en los focos hemorrágicos antiguos, en determinados estados patológicos, infiltrando las vísceras, particularmente el hígado.

Hemosiderosis: Depósito de hemosiderina en los tejidos, especialmente en el hígado.

Hepatolenticular: Relativo al hígado y al núcleo lenticular.

Hepatomegalia: Aumento del volumen del hígado, que lo hace palpable por debajo del reborde costal derecho.

Hipercromatismo: Forma de degeneración del núcleo celular en la que éste se llena de partículas pigmentarias.

Hiperplasia: Multiplicación anormal de los elementos de los tejidos, hipertrofia numérica.

Hilio: Fisura o depresión en una víscera parenquimatosa por la que entran y salen los elementos vasculares, nerviosos y linfáticos.

Hipocondrio: Región superior y lateral del abdomen a cada lado del epigastrio.

Ictericia: Coloración amarilla de la piel, mucosas y secreciones debido a la presencia de pigmentos biliares en la sangre.

Intersticio: Pequeño espacio o hendidura en un tejido. Espacio pequeño entre dos órganos o partes.

Lóbulo: Porción saliente de una víscera, limitada por cisuras y divisiones.

Megacariocitosis: Abundancia de megacariocitos.

Melena: Expulsión de sangre alterada por el ano, sola o con heces.

Neoplasia: Crecimiento de tejido, en el que la multiplicación de las células no está totalmente controlada por los sistemas reguladores del organismo y tiene un carácter a veces progresivo.

Necrosis: Mortificación de un tejido en general. **Coagulativa:** Tipo de necrosis en la que los tejidos afectados conservan su consistencia y microscópicamente mantienen sus límites celulares.

Nefritis: Nombre genérico que se refiere a las inflamaciones renales. **Intersticial:** Aquella que presenta predominio de lesiones en el intersticio, como las causadas por infecciones, tóxicos, etc.

Nevos arácnos: Vasos dilatados que se disponen en forma radiada como las patas de una araña.

Ozonolisis: Proceso químico en el que se utiliza ozono para la ruptura de un hidrocarburo etilénico.

Picnosis: Condensación, espesura, especialmente degeneración celular en la que el protoplasma se hace más denso y el tamaño de la célula disminuye.

Sinuosoides: Forma de vaso sanguíneo terminal con túnica terminal completa.

Trabéculas: Cada uno de los tabiques que se extienden desde la envoltura de un órgano parenquimatoso a la sustancia de éste formando con los otros la parte esencial del estroma.

Trasudación: Paso de líquido o suero a través de las paredes o membranas que lo contienen.

XIV. REFERENCIAS

- Alberts Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. 2002. **Molecular Biology of the Cell**. ed. 4^a Ed. Garland Science. Pags. 983-1015; 1313-1361.
- Altman R, Sargi JM. 2000. **The cancer Dictionary**. Ed. Facts on file, INC. Estados Unidos. Septiembre. Pags: 166-168.
- Andreoli T, Bennett C, Carpenter C, Plum F. 1999. **Compendio de Medicina Interna**. Ed. McGraw Hill Interamericana. México. Pags: 322-340.
- Angel G, Angel M. 2001. **Interpretación clínica del laboratorio**. ed. 6^a Ed. Panamericana. Colombia. Pags: 101-279.
- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. 1993. **Cyclin D1 is a protein required for cell cycle progresión in G1**. Genes Dev 7(5):812-821.
- Befeler S, Bisceglie AM. 2002. **Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and Treatment**. Gastroenterology 122: 1609-1619.
- Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. 1987. **Prevalence of RAS gene mutations in human colorectal cancers**. Nature 327(6120):293-297.
- Bueno DJ, Oliver G. 2004. **Determination of aflatoxin and zearalenone in different culture media**. Methods Mol Biol 268:133-137.
- Casanueva E, Kaufer HM, Pérez LA, Arroyo P. 2001. **Nutriología Médica**. Ed. Panamericana. México. Pags: 448-459.

Chiou SK, Rao L, White E. 1994. **Bcl-2 blocks p53 dependent apoptosis.** Mol Cell Biol 14(4):2556-2563.

Delgado BN, Revuelta MM. 1993. **Manual de manejo de animales de laboratorio.** Ed. UNAM. México.

De Vita TV, Hellman S, Rosenberg AS. 2000. **Cáncer. Principios y práctica de Oncología.** ed. 5ª Ed. Panamericana.

Emi Sakuno, Ying Wen, Hidemi Hatabayashi, Hatsue Arai, Chiemi Aoki, Kimiko Yabe, Hiromitsu Nakajima. 2005. ***Aspergillus parasiticus* cyclase catalyzes two dehydration steps in Aflatoxin Biosynthesis.** Applied and environmental Microbiology 71(6): 2999-3006.

Fidler IJ. 1995. **Modulation of the organ microenvironment for the treatment of cancer metastasis.** J Natl Cancer 87(21):1588-1592.

Folkman J. 1995. **Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.** Nature Med 1(1):27-31.

Ganong FW. 2002. **Fisiología Médica.** ed. 17ª. Ed. El manual Moderno. México. Pags: 555-561.

Gartner PL, Hiatta LJ. 2002. **Histología.** eJ. 2ª Ed. Mc Graw Hill Interamericana. México. Pags. 408-412.

Glaves D. 1983. **Correlation between circulating cancer cells and incidence of metastases.** Br J Cancer 48(5):665-673.

Goodman GA, Hardman GJ, Limbird EL. 2003. **Bases farmacológicas de la Terapéutica.** ed. 10ª. Vol. II. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. México. Pags. 1806-1809.

- Guo Y, Breeden LL, Zarbl H, Preston BD, Eaton DL. 2005. **Expression of a human cytochrome p450 in yeast permits analysis of pathways for response to and repair of aflatoxin-induced DNA damage.** *Mol Cell Biol* 25(14):5823-5833.
- Hart IR, Goode NT, Wilson RE. 1989. **Molecular aspects of the metastatic cascade.** *Biochim Biophys Acta* 989(1):65:84.
- Hartwell LH, Kastan MB.1994. **Cell cycle control and cancer.** *Science* 266(5192):1821-1828.
- Henry JR, Cannon CD, Winkelman WJ, Chimena ZA. (1996). **Química clínica.** Ed. JIMS Barcelona. Pags. 936-938.
- Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ. 1995. **Novel INK4 protein, p19 and p18 are specific inhibitors of the cyclin D dependent kinase CDK4 and CDK6.** *Mol Cell Biol* 15(5):2672-2681.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. 1991. **p53 mutations in human cancers.** *Science* 253(5015):49-53.
- Jansen-Durr P, Meichle A, Steiner P, Pagano M, Finke K, Botz J, Wessbecher J, Draetta G, Eilers M.. 1993. **Differential modulation of cyclin gene expression by MYC.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(8):3685-3689.
- Jun C, Dong HY, Xiang JB, Zi RF. 2001. **Methylation status of c-fms oncogene in HCC and its relationship with clinical pathology.** *World J Gastroenterol* 7(1):136-139.
- Kohn EC, Liotta LA. 1995. **Molecular insights into cancer invasion : strategies for prevention and intervention.** *Cancer Res* 55(9):1856-1862.

Kumar V, Cotran SR, Robbins LS. 2004. **Patología Humana**. ed. 7ª Ed. Elseiver. España. Pags. 598-604; 625-627.

Lee MH, Reynisdottir I, Massague J. 1995. **Cloning of p57, a cyclin dependent kinase inhibitor with unique domains structure and tissue distribution**. Genes Dev 9(6):639-649.

Lee YI, Lee S, Das GC, Park US, Park SM, Lee YI. 2000. **Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma**. Oncogene 19(33):3717-3726.

Liu LX, Liu ZH, Jiang HC, Zhang WH, Qi SY, Hu J, Wang XQ, Wu M. 2003. **Gene expression profiles of hepatoma cell line HLE**. World J Gastroenterol 9(4):683-687.

Llovet JM, Beaugrand M. 2003. **Hepatocellular carcinoma: present status and future prospects**. J Hepatol 38 Suppl 1:s136-149.

Lynch JW, Mellor DL, Spare DP, Inwood HJM. (1997). **Métodos de laboratorio**. 2ª edición, vol 2. Nueva editorial interamericana. México. Pags.1112-1153.

Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. 1991. **Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation**. Cancer Res 51(18sup):5054-5059.

Marrero JA, Fontana RJ, Barrat A, Askari F, Conjeevaram HS, Su GL, Lok AS. 2005. **Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an American cohort**. Hepatology 41(4): 707-716.

Metzler DE. 1981. **Bioquímica**. Ed. Omega. Barcelona. Pags. 592-593.

Miyashita T, Reed JC. 1995. **Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene.** Cell 80(2):293-299.

Moore LK, Dalley FA. 2003. **Anatomía con orientación clínica.** ed. 4ª. 2ª reimp. Ed. Médica Panamericana. México. Pags.268-276.

Morrisson TK. 1999. **Laboratorio clínico y pruebas de diagnóstico.** Ed. Manual moderno. México.

Mulligan J, Kwok J, Healey C. 1993. **Germ line mutations of the RET protooncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A.** Nature 363:458

Nagy JA, Masse EM, Herzberg KT, Meyers MS, Yeo KT, Yeo TK, Sioussat TM, Dvorak HF. 1995. **Patogénesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation.** Cancer Res 55(2):360-368.

Nakajima M, Chop AM. 1991. **Tumor invasion and extracellular matrix degradative enzymes:regulation of activity by organ factors.** Semin Cancer Biol 2(2):115-127.

Nevins JR. 1992. **E2F: a link between the Rb tumor supresor protein and viral oncoproteins.** Science 258(5081):424-429.

Nevins JR. 1994. **Cell cycle targets of the DNA tumor viruses.** Curr Opin Gen Dev 4(1):130-134.

Parakrama C, Clive T. 1999. **Patología general.** ed. 3ª. Ed. El Manual Moderno. México. Pags: 685-693.

Pozzi CR,Correa B, Xavier JG, Direito GM, Orsi RB, Matarazzo SV. 2001. **Effects of prolonged oral administration of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in rats.** Mycopathologia 151(1):21-27.

Qing W, Zhi YL, Xiao LF. 2001. **Alterations in metastatic properties of hepatocellular carcinoma cell following H-ras oncogene transfection.** World J Gastroenterol 7(3):335-339.

Riba S, Villa BL, García IF, Rivero UM. 1993. **Manual práctico de Nutrición y Dietética.** Ed. Madrid Vicente. Madrid. Pags. 23

Rodríguez RA. 2001. **Valores Normales de Determinaciones de Laboratorio y Pruebas de Función.** ed. 5ª. Ed. ScyMed Medi-Data. México. Pags: 7-16.

Ross HM, Romrell JL, Kaye IG. 2001. **Histología. Texto y Atlas a color.** ed. 3ª . Ed. Panamericana. México. Pags. 494-495.

Sánchez NA. 2002. **Interacción entre Lactobacillus ssp y Aspergillus flavus.** Tesis de Licenciatura UNAM.

Sandrine B, Isabelle OP. 2005. **The effect of mycotoxins fungal food contaminants in the intestinal epithelial cell derived innate immune response.** Veterinary Immunology and Immunopathology. En avances.

Sawyers CL, Callahan W, Witte ON. 1992. **Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes.** Cell 70(6):901-910.

Schwartz IC, Shires T, Fisher EJ. 2000. **Principios de cirugía.** . ed. 7ª Ed. McGraw Hill Interamericana. México. Pags. 325-395.

Slebos RJ, Lee MH, Plunkett BS, Kessis TD, Williams BO, Jacks T, Hedrick L, Kastan MB, Cho KR. 1994. **p53 dependent G1 arrest involves pRb related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein.** Proc Natl Acad Sci USA 91(12):5320-5324.

Stettler PM, Sengstag C. 2001. **Liver carcinogen aflatoxin B1 as an inducer of mitotic recombination in a human cell line.** Mol Carcinog 31(3):125-138.

Testut L, Latarjet A. 1998. **Compendio de Anatomía Descriptiva.** Reimp. 2ª. Ed. Masson. México. Pags: 640 – 650.

Tolonen M. 1995. **Vitaminas y minerales en la salud y la nutrición.** Ed. Acribia. España. Pags. 143- 148.

Wang R, Ferrell di, Faouzi S, Maher JJ, Bishop M. 2001. **Activation of the Met Receptor by Cell attachment induces and sustains Hepatocellular Carcinomas in Transgenic Mice.** J Cell Biol 153(5):1023-1033.

Wang JS, Groopman JD. 1999. **DNA damage by mycotoxins.** Mutant Res 424(1-2):167-181.

Weinberg R. 1985. **The action of oncogenes in the cytoplasm and the nucleus.** Science 230(4727):770-776.

Xiao ZG, Xiao DS, Min PL, Jian HX, Li NR, Jia JZ, Hong YL, Di W. 2002. **Effect of bax, bcl-2 and bclxL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma.** World J Gastroenterol 8(6):1059-1062.

Xiao YF, Hong YW, Lu T, Shu QL, Hui FC, Meng CW. 2002. **Overexpression of p28/gankyrin in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance.** World J Gastroenterol 8(4):638-643.

Yin Y, Tainsky M, Bischoff F. 1992. **Wild Type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles.** Cell 70(6):937-948.