



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

“Estudio del efecto del compuesto LQM 731 un derivado del éster fenético del ácido caféico (CAPE), sobre las lesiones preneoplásicas de colon en ratones CD1”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

JAQUELINNE BAUTISTA BAUTISTA

ASESORA: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVANZADA DE
MÉXICO

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

U. N. A. M.
UNIVERSIDAD NACIONAL AVANZADA DE MÉXICO
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio del efecto del compuesto LQM731 un derivado del Éster Fenilico del Ácido Cafeico (CAPE) sobre las lesiones preneoplásticas de colon en ratones CD1

Que presenta la pasante: Jaqueline Bautista Bautista
Con número de cuenta: 407061060 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de abril de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Luisa Martínez Aguilar	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
1er. SUPLENTE	QFB. Luis Alberto Parra Oaxaca	
2do. SUPLENTE	Dra. Dolores Molina Jasso	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

El presente trabajo fue apoyado por el **proyecto PAPIIT IT202512** “Estudio antigenotóxico, antiproliferativo e inhibidor de lesiones preneoplásicas de un grupo de derivados del CAPE sintetizados en la FESC”.

La parte experimental, se realizó en el Laboratorio de Citogenética L-521 y el laboratorio 9 Toxicología y Genética de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la dirección de la **Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo**.

Así como en Unidad de Asilamiento y Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán a cargo del **M. en C. Crisóforo Mercado Márquez**.

El compuesto LQM 731 fue desarrollado en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán a cargo del **Dr. Enrique Ángeles Anguiano**.

A G R A D E C I M I E N T O S

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por permitirme cumplir mis sueños, por todos esos conocimientos, por dejarme pertenecer a ella.

A la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1**, por convertirse en ese lugar donde todo puede pasar.

A mi asesora la **Dra. Sandra Díaz Barriga**, por confiar en mí para la realización de este proyecto, por sus conocimientos y sobre todo por el tiempo invertido para que se logrará presentar este trabajo, gracias.

Al Bioterio de la Escuela Superior de Medicina del IPN a cargo de **M. en C. María Eugenia Aguilar Nájera**, por su amable ayuda para la obtención de los animales que se usaron a lo largo de este proyecto.

Al **Dr. Carlos Gerardo García Tovar**, por su ayuda en una parte muy primordial de la experimentación.

A los miembros del jurado **Dra. Luisa Martínez, QFB. Rosalba Bonilla, QFB. Alberto Parra y Dra. Dolores Molina**, por sus comentarios para la mejora de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis **papás**, ya llegamos hasta aquí, gracias por todos esos momentos felices y también por los más horribles, por esos detalles que me convirtieron en la mujer que soy ahora, sé que esto es muy importante para ustedes, este logro es nuestro, gracias.

A mí **mami**, por ayudarme a cumplir mis sueños por tontos que sean, por ser la única persona que confía ciegamente en mí, unas cuantas líneas no bastan para demostrar el agradecimiento, amor y admiración que tengo hacia ti, así que simplemente gracias.

A mi **papi** por todo lo que me ha aportado a mí persona, por retarme a ser mejor, gracias por tú apoyo y tus palabras y por esos besos en la cabeza cuando era niña.

A mis hermanas, **Wendy y Adriana**, por cuidarme, por preocuparse por mí, por sus consejos, por inspirarme, por quererme, yo no sería ni la mitad de lo que soy sin ustedes, teniéndolas a mí lado todo es más fácil, gracias.

Para ti **Maica**, gracias por mover mi corazón y mi mundo, sé que ya nada saldrá mal ahora que eres mi ángel, fue un placer haber compartido este tiempo contigo.

A **Giova y Kika** por quererme, animarme y por enseñarme cosas tan peculiares de esta vida, son un excelente pretexto para hacer las cosas mejor, este gato los adora y espera estar siempre con ustedes.

A **Cacha, Luna y Des** por dejarme amarrar mi pata quebrada a sus patas, por recibirme siempre felices, siempre levantando el ánimo, sacando sonrisas, sin su compañía todo sería muy aburrido.

A **Laura, Raúl, Armando y Paola**, porque Campo 1 no hubiera sido lo mismo sin ustedes, gracias por las tareas, las risas, los regaños, todas esas anécdotas locas y claro gracias por su amistad, ¡lo logramos!

A **Pamela**, todo este trabajo hubiera sido imposible sin su valiosa ayuda, por su compañía, por esas largas horas en el bioterio, porque al buscar a alguien que me ayudará encontré una amiga, gracias.

A las profesoras **Maritere Domínguez y Rosalba Bonilla**, por enseñarme el maravilloso mundo de la genética, a la profesora **Ana Laura Vázquez**, por ser un ejemplo a seguir, a ellas por ser unas excelentes maestras y por permitirme aprender cosas nuevas.

Para ti ¡venga valiente!...

Sería imposible nombrar a todas las personas que me ayudaron en este viaje, aquellas que dejaron cosas buenas y otras no tanto, pero hicieron la diferencia, gracias

Nada sucede dos veces
ni va a suceder, por eso
sin experiencia nacemos,
sin rutina moriremos.

En esta escuela del mundo
ni siendo malos alumnos
repetiremos un año,
un invierno, un verano.

No es el mismo ningún día,
no hay dos noches parecidas,
igual mirada en los ojos,
dos besos que se repitan.

Wisława Szymborska

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
1 El cáncer	3
1.1 Desarrollo y progresión del cáncer.....	4
2 Características del intestino grueso (IG)	6
2.1 Anatomía del IG.....	6
2.2 Fisiología del IG.....	8
2.3 Microscopía de colon.....	10
3. Cáncer colorrectal (CCR)	10
3.1 Etiología del CCR.....	11
3.2 Síndromes hereditarios de riesgo en el CCR.....	12
3.3 Factores de riesgo en el CCR.....	14
3.4 Genes que intervienen en el CCR.....	16
3.4.1 Oncogén K-ras.....	19
3.5 Estadios del CCR.....	20
3.6 Cuadro clínico.....	26
3.7 Diagnóstico.....	27
3.8 Tratamiento.....	28
4. Modelo experimental de inducción	29
4.1 Principales carcinógenos.....	29
4.2 Focos de criptas aberrantes (FCA) como precursores del CCR.....	30
4.3 Alteraciones genéticas de los FCA.....	33
4.4 Identificación de FCA.....	33
5 Compuesto inductor de lesiones preneoplásicas	34

5.1 Mecanismo de la 1,2-Dimetilhidrazina.....	34
5.2 Características y aplicaciones.....	36
5.3 Síntesis.....	38
6 Éster fenílico del ácido caféico (CAPE).....	39
6.1 Propóleo.....	40
6.2 Ácido caféico y sus derivados.....	42
6.3 Mecanismo de acción del CAPE.....	43
6.4 Análogos estructurales del CAPE.....	45
III. JUSTIFICACIÓN.....	48
IV. OBJETIVOS.....	49
V. MATERIALES.....	50
VI. MÉTODOS.....	51
VII. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	53
VIII. RESULTADOS.....	54
IX. RESULTADOS: IMÁGENES.....	56
X. DISCUSIÓN.....	68
XI. CONCLUSIONES.....	73
XII. PERSPECTIVAS.....	74
XIII. REFERENCIAS.....	75
Apéndice.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases del desarrollo tumoral.....	4
Figura 2. Etapas del cáncer.....	5
Figura 3. Anatomía del intestino grueso.....	7
Figura 4. Mortalidad por CCR según lugar de residencia en México.....	11
Figura 5. Etapas del proceso de carcinogénesis colónica.....	18
Figura 6. Estadio 0 en el CCR.....	20
Figura 7. Cáncer de colon estadio I.....	21
Figura 8. CCR estadio II.....	22
Figura 9. CCR en estadio IIA.....	23
Figura 10. Estadio IIB en CCR.....	24
Figura 11. Estadio IIC de CCR.....	25
Figura 12. Estadio IV en CCR.....	26
Figura 13. Modelo de tumorigénesis.....	32
Figura 14. Mecanismo de reacción de 2,4-DNFH y un aldehído o cetona.....	37
Figura 15. Síntesis de la 2,4-DNFH.....	38
Figura 16. Propóleo.....	39
Figura 17. Estructura del CAPE.....	41
Figura 18. Estructura del CA.....	41
Figura 19. Amida Fenólica del ácido caféico.....	44
Figura 20. Estructura del derivado del análogo del CAPE NA01.....	45
Figura 21. Esquema de inducción de lesiones precancerosas.....	50
Figura 22. Número de FCA al microscopio con tinción azul de metileno.....	53
Figura 23. Grado de tinción del IG teñido con azul de metileno.....	55

Figura 24. Representación del grado de ruptura del tejido.....	55
Figura 25, 26, 27, 28, 29. Lote control positivo.....	56, 57
Figura 30, 31, 32, 33. Lote control negativo.....	58,59
Figura 34, 35, 36, 37, 38. Lote 2, 4-DNFH+LQM 731 (20mg/Kg).....	60, 61
Figura 39, 40, 41. Lote 2, 4-DNFH+LQM 731 (40mg/Kg).....	62
Figura 42, 43, 44, 45, 46. 2, 4-DNFH+aceite de maíz.....	64
Figura 47, 48, 49, 50, 51, 52. 2,4-DNFH (56 días).....	64, 65
Figura 53, 54, 55, 56. LQM 731 (20 mg/Kg).....	65, 66
Figura 57, 58, 59, 60. LQM 732 (40mg/Kg).....	67

Í N D I C E D E T A B L A S

Tabla 1. Riesgo de CCR en los síndromes hereditarios.....	14
Tabla 2. Genes que cambian su regulación en el proceso de carcinogénesis.....	17
Tabla 3. Clasificación de los carcinógenos químicos colónicos.....	30
Tabla 4. Composición y características del propóleo.....	42
Tabla 5. Número de campos donde se observan FCA.....	54
Tabla 6. Observación del intestino grueso a 10 X teñido con azul de metileno.....	56

A B R E V I A T U R A S

Abreviatura	Significado
1,2-DMH	1,2- Dimetilhidrazina dihidroclorato
2,4-DNFH	2,4- Dinitrofenilhidrazina
A-APC	Poliposis adenomatosa de colon atenuada
Ad5	Adenovirus tipo 5
AINE	Analgésicos no esteroideos
AM	Azoximetano
AOM	Azometano
CAPE	Éster fenético del ácido caféico
CCR	Cáncer colorrectal
COX-2	Ciclooxigenasa II
CS	Síndrome de Cowden
cm	Centímetro
DEN	Dietilnitrosamina
DMBA	12-dimetilbencil [a] antraceno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FCA	Focos de cripta aberrante
g	Gramo
GST	Genes supresores de tumores
HepG2	Línea celular de carcinoma hepático
HMOX	Hemo oxigenasa 1
HUVEC	Células endoteliales del cordón umbilical humano
kDa	Kilodalton
MAM	Metilazoximetanol
mg/Kg	Miligramo por kilogramo
ml	Mililitros
MMP-9	9 Metaloproteinasas de matriz
NA01	N [2 clorobencil] cinamida
IP	Intraperitoneal
JPS	Poliposis juvenil
ODC	Ornitinadescarboxilasa
PAF	Poliposis adenomatosa familiar
PJS	Síndrome de Pentz-Jeghers
PO	Protooncogenes
QP	Quimioterapia
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

I. R E S U M E N

El cáncer colorrectal es la segunda causa principal de muerte por cáncer en México, el tercero más frecuente dentro de la patología oncológica en la población general y el cáncer más común del tracto gastrointestinal, afectando en igual proporción a hombres y mujeres.

La mayor incidencia se ubicaba entre 60 y 65 años de edad, pero actualmente se han descubierto casos en personas de 40, 30 y hasta 20 años. Se trata de una patología que crece exponencialmente en México y el mundo debido a la adopción de malos hábitos dietéticos y el mantenimiento de costumbres perjudiciales.

Las lesiones precursoras del carcinoma colorrectal son las criptas aberrantes y los adenomas; los adenomas avanzados tienen más probabilidades de presentar progresión neoplásica.

Uno de los principales componentes del propóleo es el éster fenélico del ácido caféico (CAPE), al cual se le han encontrado y estudiado diversas actividades como: antiinflamatorio, antifúngico, antimicrobiano, entre otras. Entre estas diversas propiedades, destaca su efecto como un inhibidor de la proliferación celular de diversos tipos de líneas de células cancerígenas.

Existen gran cantidad de compuestos análogos del CAPE, como es el caso de los compuestos CAPA análogos amídicos.

En el Laboratorio de Química Medicinal de la FESC, se han desarrollado una serie de compuestos análogos del CAPE denominada serie LQM 700, todo esto bajo la dirección del Dr. Enrique Ángeles Anguiano.

En el presente trabajo se planteó estudiar la capacidad anticarcinogénica del compuesto LQM 731, se evaluó si el compuesto es capaz de inhibir lesiones preneoplásicas en colon de ratón de la cepa CD1.

Con este fin se utilizó un modelo de inducción de lesiones precancerosas en ratones, que se basa en la administración del compuesto 2,4-Dinitrofenilhidrazina a una concentración de 10 mg/Kg, vía intraperitoneal periódicamente hasta llegar a 28 días. Se trabajó con 40 ratones CD1, hembras jóvenes, distribuidos de la siguiente manera: lote 1, control positivo (2,4-DNFH); lote 2, reto dosis 1 (2,4-DNFH + LQM 731/20mg/Kg); lote 3 reto dosis 2, (2,4-DNFH + LQM 731/40mg/Kg); lote 4, (2,4-DNFH + aceite de maíz); lote 5, 2,4-DNFH con un modelo de inducción por 56 días; lote 6, control dosis 1 (LQM 731/20mg/Kg); Lote 7, control dosis 2 (LQM 731/40mg/Kg) y lote 8 como control negativo.

Transcurrido el tiempo para cada tratamiento, se llevó a cabo el sacrificio de los ratones por dislocación cervical, se extrajo el intestino grueso, se hizo un corte transversal y se enjuagó con solución salina fisiológica al 0.9 % hasta que el tejido quedó limpio, después se fijó con PBS/formaldehído al 10 %, para después teñirse con azul de metileno por 5 minutos, finalmente se enjuagó con agua destilada y se observó al microscopio a 10X. Se evaluaron 50 campos por lote.

Los resultados se analizaron estadísticamente con ANOVA y prueba de Turkey 0.05 con el programa estadístico Statgraphics ®, para determinar las diferencias estadísticas entre los lotes.

En base a los resultados, se observó que el modelo de inducción de lesiones precancerosas fue efectivo ya que al microscopio se observaron como focos de criptas aberrantes y pólipos, así como un daño en la morfología normal del intestino grueso de los ratones.

La dosis en la que el compuesto LQM 731 presentó capacidad para inhibir las lesiones preneoplásicas fue a 20 mg/Kg. A la dosis de 40 mg/Kg presentó mejoría, pero también en el tejido se mostraba inflamación, esto por una posible acción citotóxica del compuesto.

En base a los resultados se concluyó que el compuesto LQM 731 inhibe las lesiones precancerosas a una dosis de 20 mg/Kg, por lo que se puede perfilar como un compuesto quimioprotector, se sugiere la realización de diversos estudios con este compuesto.

II. MARCO TEÓRICO

1. El cáncer

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en 2008 que la principal causa de muerte en el mundo es el cáncer (7.6 millones de casos), localizado en su mayoría en: pulmón, estómago, hígado, colon y mama (OMS, 2011).

La mortalidad por cáncer a nivel mundial presenta un claro patrón ascendente, el cual también se refleja en el CCR. En el 2002, se registraron 12, 684,189 defunciones por cáncer; de ellas, el 4.17 % correspondieron a CCR, ubicándose dentro de las primeras diez causas de mortalidad por neoplasias malignas a nivel mundial (Tirado y Mohar, 2008).

El cáncer es un grupo heterogéneo de trastornos que se originan a partir de una serie de cambios que conducen a la inmortalización y transformación de una célula de un tejido, esto es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) que producen la degeneración de las células con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos (INEGI, año consulta 2013).

La neoplasia puede ser benigna o maligna, siendo ésta última la que se conoce como cáncer, caracterizado por un rápido crecimiento, invasión y destrucción de los tejidos adyacentes y una diseminación por todo el organismo conocido como metástasis (Figura 1), (Granados et. al; 2006).

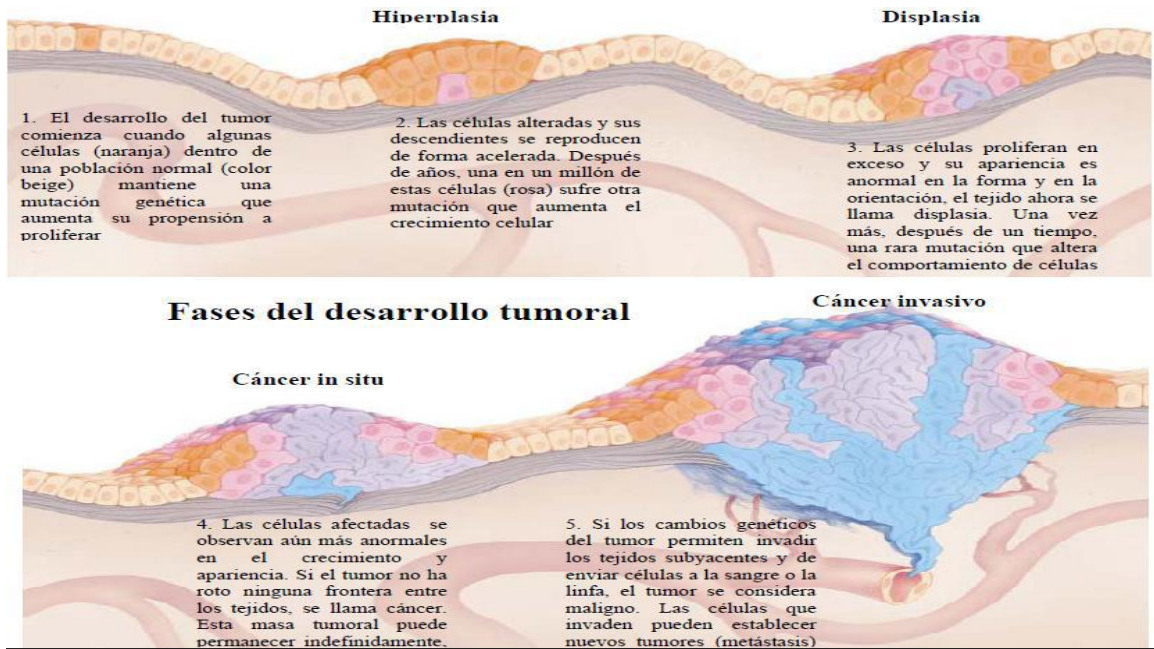


Figura 1. Fases del desarrollo tumoral (Modificado de Weingberg, 1996).

1.1 Desarrollo y progresión del cáncer

El origen del cáncer es clonal, es decir una célula del tejido presenta cambios mutacionales a nivel genético que conducen a su inmortalización y transformación (Domínguez, 2008).

El daño al genoma puede ocurrir en 3 etapas diferentes:

- 1.- **En la línea germinal:** cada célula producida tras la meiosis traerá algún tipo de mutación.
- 2.- **En las células somáticas:** solo la progenie de la célula origen afectada tendrá alteraciones.
- 3.- **En algún punto intermedio:** Un cambio en la célula pluripotencial somática cercana a su diferenciación, afectará a los tejidos que se deriven de éstas (Nang, 2001).

Así mismo es un proceso de múltiples etapas, para el desarrollo de neoplasmas malignos en el que se han identificado tres grandes estadios a saber: iniciación, promoción y progresión (figura 2).

- **Iniciación:** toma lugar a nivel del DNA, molécula en la cual los mutágenos introducen mutaciones y con ello se altera la regulación de la expresión de algunos genes importantes para la célula. Como resultado de ello, las células se adentran en un cambio irreversible caracterizado por una capacidad intrínseca de crecimiento autónomo potenciado.
- **Promoción:** las células son estimuladas a dividirse y se hacen morfológicamente anormales. Esta fase potencia el desarrollo de neoplasmas clínica y patológicamente detectables.
- **Progresión:** es la etapa mediante la cual la célula iniciada anormal experimenta nuevos cambios genéticos que terminan por conferirle fenotipo maligno lo que finalmente se traduce en el desarrollo de cáncer. Esta última etapa se ha subdividido en sub-etapas que caracterizan hitos en el desarrollo del cáncer tales como: angiogénesis o vascularización, desprendimiento, liberación, intravasación, supervivencia y extravasación (Zamorano et. al., 2008).

Durante la última década ha sido posible identificar al menos algunos de los eventos moleculares que subyacen a las etapas de iniciación, promoción y progresión. La gran mayoría de las neoplasias se inician por mutaciones o expresiones alteradas de algunos genes que cumplen funciones vitales en el control de procesos tales como: proliferación celular, apoptosis, reparación del DNA y envejecimiento celular (Granados et.al., 2006).

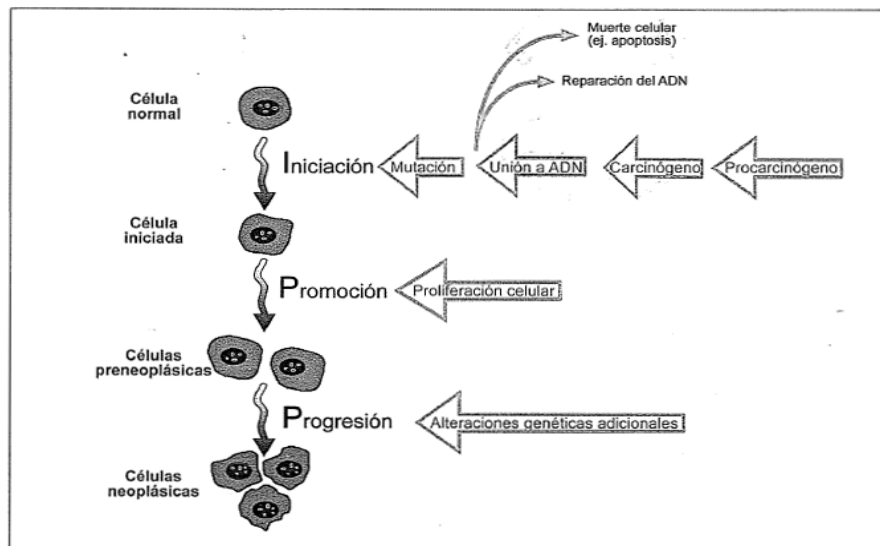


Figura 2. Etapas del cáncer (Granados et. al; 2006).

En la carcinogénesis se involucra la acumulación de alteraciones en dos tipos de genes principalmente:

- **Oncogenes:** participan en el crecimiento de las células normales pero su forma ha tenido una mutación (cambio). Los oncogenes pueden hacer crecer las células cancerosas. Las mutaciones de los genes que se convierten en oncogenes pueden ser heredadas o pueden resultar de la exposición a sustancias del ambiente que causan cáncer.
- **Genes supresores de tumores:** son pares de genes que hacen que la célula elabore una proteína que controla el crecimiento de las células. Se puede contraer cáncer cuando la proteína de los antioncogenos no funciona debido a mutaciones (cambios en el DNA) en los genes). Las mutaciones en los antioncogenos pueden heredarse o contraerse (Dávila, 2012).

2. Características Intestino grueso

2.1 Anatomía del intestino grueso (IG)

El intestino grueso se inicia a partir de la válvula ileocecal en un fondo de saco denominado ciego, de donde sale el apéndice vermiforme y termina en el recto (figura 3).

Su longitud es variable, entre 120 y 160 cm, su calibre disminuye progresivamente, siendo la porción más estrecha la región donde se une con el recto o unión rectosigmoidea donde su diámetro no suele sobrepasar los 3 cm, mientras que el ciego es de 6 o 7 cm (Almangía y Lizana, 2009).

Desde el ciego, al colon ascendente, asciende hasta el nivel del hígado y se dobla en ángulo recto (ángulo hepático) para pasar oblicuamente a través del abdomen como colon transversal. Al llegar al bazo, el colon transversal se dobla hacia abajo (ángulo esplénico) para convertirse en colon descendente.

Cuando esta porción del colon llega a la fosa iliaca izquierda, describe una forma de "S", por lo que se denomina colon sigmoideo a ese nivel. Éste atraviesa el borde del estrecho superior de la pelvis y llega a la cavidad pélvica, para constituir el recto (Langley, 1979).

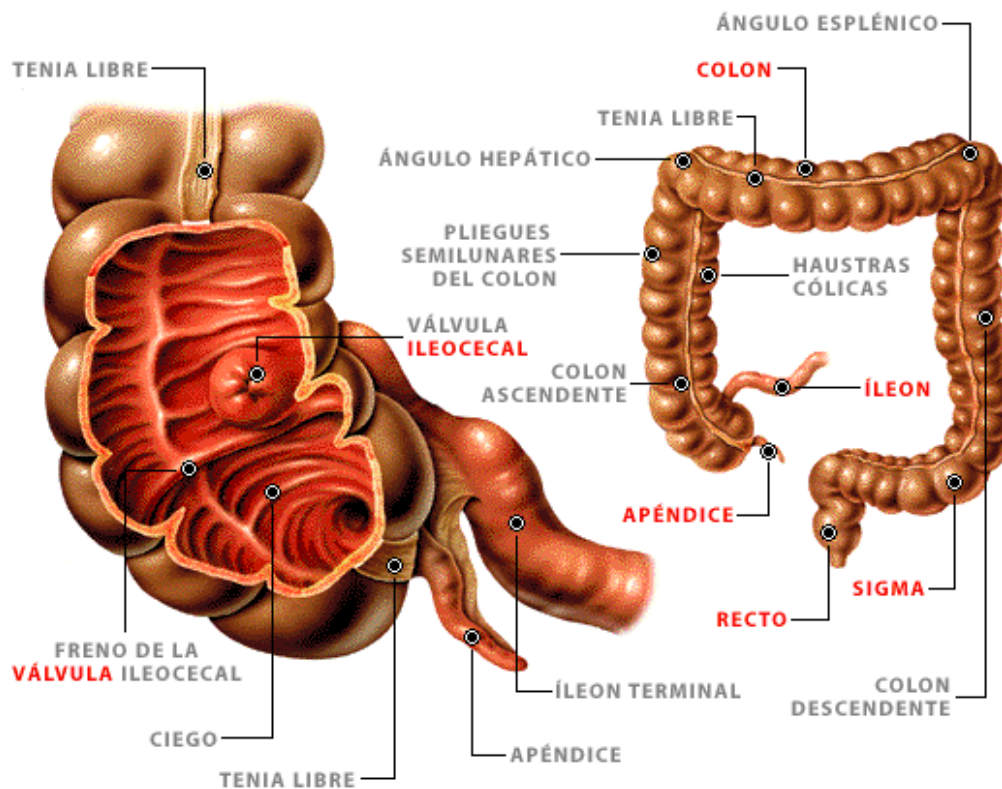


Figura 3. Anatomía del intestino grueso (Almangí y Lizana, 2009).

Las principales características de las porciones en que se divide el intestino grueso son:

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

- **Colon descendente:** el límite inferior de este último corresponde a un plano horizontal que pasa por la cresta iliaca. El peritoneo se comporta con el aproximadamente de igual modo que el colon ascendente. Esta porción difiere del colon ascendente en que es más largo, más voluminoso y se encuentra más profundamente situado en el abdomen.
- **Colon sigmoide:** se inicia cerca de la cresta ileaca izquierda, se proyecta hacia la línea media y termina en el recto, poco más o menos a la altura de la vertebra C3.
- **El recto:** que conforma los últimos 20 cm. del tubo digestivo, está por delante del sacro y cóccix. Sus dos a tres cm terminales se denominan conducto anal.
- **El ano:** de 15 a 20mm de altura en que termina inferiormente el tubo digestivo. Se compone esencialmente de un aparato muscular tapizado por dentro por un revestimiento cutáneo especial. En él se distinguen 2 esfínteres, el esfínter anal interno y el esfínter anal externo (Tortora y Reynolds, 2002).

Solamente tres características anatómicas del colon lo diferencian del intestino delgado que son: haustrós, tenias y apéndices epiploicos. Las tenias del colon son tres bandas longitudinales gruesas de músculo, que representan la capa muscular externa longitudinal en esta parte del tubo digestivo y se extienden en toda la longitud del colon.

En el apéndice y recto, las tres bandas se distribuyen formando una capa uniforme de músculo. Debido a que las bandas son más cortas que el colon mismo, arrugan la pared de éste para formar pequeñas bolsas, denominadas haustrós, a todo lo largo de su extensión. Esto da al colon el aspecto festonado. La mucosa entre haustrós adyacentes se dispone en pliegues que rodean la mitad de la luz del tubo.

Los apéndices epiploicos son pequeñas lengüetas de grasa en la superficie externa del colon (Langley, 1979).

2.2 Fisiología del intestino grueso

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

En el intestino grueso ocurre muy poca digestión, las sustancias no absorbidas en el intestino delgado son por lo común productos de desecho, que se acumulan en el intestino grueso y son preparadas para su expulsión.

- **Digestión mecánica:** el paso del quimo del íleon al ciego está regulado por el esfínter ileocecal. Después de las comidas, el reflejo gastroileal intensifica el peristaltismo del íleon y fuerza el paso del quimo al ciego; cuando está distendido, se intensifica la contracción del esfínter. Una vez que cruza el esfínter ileocecal, llega al ciego y se acumula en el colon ascendente. Después existen contracciones que no dirigen el contenido en dirección al ano sino que sirven para fragmentarlo y mezclarlo.

Además, existen los denominados movimientos en masa, de peristaltismo vigoroso, que impulsan el contenido hacia segmentos inferiores. Estos movimientos se llevan a cabo dos o tres veces por día.

El residuo alimentario generalmente es convertido en heces, está listo para su expulsión dentro de las 12 horas que siguen de su ingestión. En promedio el quimo viaja por el intestino delgado en aproximadamente 6 horas y 3 a 4 por el intestino grueso.

- **Digestión química** por flora intestinal: muchos microorganismos son ingeridos junto con los alimentos, la mayor parte de ellos sucumben debido a la acción enzimática y fuertemente ácida del estómago, pero algunos sobreviven y, en el intestino grueso encuentran el medio favorable para los procesos de fermentación y putrefacción. También las bacterias descomponen la bilirrubina en pigmentos más sencillos, como estercobilina que confiere su color pardo característico a las heces. Se requieren diversas vitaminas para el metabolismo normal, entre ellas algunas del complejo B y K, las cuales son productos bacterianos que se absorben en el colon.
- **Heces:** la cantidad de heces formadas varía de acuerdo a cantidad y calidad de alimento ingerido. Incluso durante ayuno completo se forma algo de materia fecal, que consta principalmente de agua, bacterias y células epiteliales. Las heces contienen aproximadamente 75% de agua, ésta es independiente de la cantidad de líquido ingerido. En el colon se puede añadir agua a las heces o absorberla de ellas así mantiene constante el contenido de ésta en las heces.
- **Defecación:** conforme se acumula la materia fecal, el recto se distiende, como resultado ocurren ondas peristálticas en el colon, que dirigen el contenido de éste hacia el ano.

- **Secreciones:** están constituidas por un jugo que tiene pH aproximado de 8, esta alcalinidad sirve para neutralizar los productos finales ácidos de la fermentación. En condiciones normales las secreciones son predominantemente mucosas, producidas por células calciformes, el moco sirve no solo para proteger la pared del intestino sino también para mantener a la materia fecal junta (Langley, 1979).

2.3 Microscopía del colon

El colonocito es la unidad funcional del intestino. Estas células comprenden hasta un 90 % de la superficie del lumen intestinal. Su función es conformar miles de invaginaciones llamadas criptas de Lieberkühn en la mucosa intestinal. La función de las criptas es la de absorber nutrientes, así como también secretar algunas hormonas intestinales mediante células enteroendócrinas. Los tipos celulares restantes que integran las criptas intestinales son las células de Paneth, que producen algunas sustancias antimicrobianas como lisozima, células calciformes o células de Goblet, responsables de la producción de moco en gran cantidad que tiene como finalidad, evitar la absorción de moléculas de gran tamaño, permitiendo la absorción solamente de minerales y agua (Navarro, 2009).

3. Cáncer colorrectal (CCR)

El cáncer de colon es una neoplasia común y letal, la cual en mujeres ocupa el segundo lugar, solo después del carcinoma de mama como causa de la mortalidad por cáncer. En varones es el tercer cáncer mortal más común precedido por los carcinomas pulmonar y de próstata (INEGI, 2010).

Diagnosticándose 1.2 millones de casos nuevos anualmente a nivel mundial y 608,700 muertes anualmente. Casi todos los casos se diagnostican en mayores de 50 años y la frecuencia aumenta de manera progresiva después de esta edad, solo entre el 6 y 8% de los casos ocurren en menores de 40 años (Jensen, 2001).

La mortalidad por cáncer a nivel mundial presenta un claro patrón ascendente, el cual también se refleja en el CCR. En el 2002, se registraron 12, 684, 189 por cáncer, de ellas, el 4.17 % correspondieron a CCR, ubicándose dentro de las primeras diez causas de mortalidad por neoplasias malignas a nivel mundial.

Con relación en la distribución geográfica, en 2002, se observó que las entidades federativas con mayores tasas de mortalidad, de acuerdo con el estado de residencia, correspondieron a las siguientes entidades federativas: Distrito Federal 3.8 %, Chihuahua 3.1 %, Baja California 2.9 %, Jalisco 2.7 %, Baja California Sur 2.6 %, Nuevo León 2.6 %,

Sonora 2.4 %, Zacatecas 2.4 %, Morelos 2.2 % y Veracruz 2.2 % (figura 4), (Tirado y Mohar 2008).

Con referencia a su localización, 23 % de estas neoplasias afectan el recto, 10 % la unión rectosigmoidea, 25 % el sigma, 6 % el colon descendente, 13 % el colon transverso, 8 % el colon ascendente y 15 % el ciego. El cáncer de recto predomina en los varones y el de colon derecho en las mujeres (Hechavarría et. al; 2003).



Figura 4. Mortalidad por CCR según lugar de residencia en México 2002 (Tirado y Mohar, 2008).

3.1 Etiología del CCR

La etiología del CCR es compleja; incluye diversos factores físicos, químicos, biológicos, ambientales y genéticos. Aproximadamente el 75 % de los tumores malignos de colon y recto se presentan en pacientes sin factores de riesgo conocidos. Los individuos con colitis ulcerativa, poliposis familiar, y cáncer de colon hereditario no polipósico tienen riesgo mayor de desarrollar la enfermedad; sin embargo, representan menos de 10 % de todos los cánceres colorrectales (Morgan et. al; 2008).

Los pacientes que tienen riesgo intermedio son aquellos que tienen cincuenta años o más, a quienes se recomienda realizar examen de sangre oculta en deposiciones cada año y sigmoidoscopia flexible cada 4-5 años; también colonoscopia o enema de bario de doble contraste cada 5-10 años. Sin embargo, hay grupos de alto riesgo, sobre los que se debe actuar en forma más dirigida como son los pacientes que tienen antecedentes personales de pólipos o CCR, o en los familiares de primer grado (Saenz et. al; 2009).

La predisposición genética al CCR se clasifica en dos grandes grupos:

- **CCR familiar:** 15 al 20 % de los casos.
- **CCR hereditario:** 5 % de los casos.

En el CCR familiar, los familiares de primer grado de personas con CCR, o pólipos adenomatosos, tienen aproximadamente un riesgo dos veces superior de padecer CCR y el riesgo aumenta con el número de familiares afectados. También aumenta el riesgo una historia familiar de cánceres extracolónicos (por ejemplo; uterino) o la presencia en miembros familiares individuales de múltiples cánceres colorrectales.

El mayor riesgo en el CCR familiar está transmitido por la herencia de uno o muchos alelos de susceptibilidad de penetrancia baja. El CCR se divide de modo convencional en síndromes con poliposis y CCR hereditario no asociado a poliposis. Se definen los síndromes de poliposis por la presencia de múltiples pólipos en la luz intestinal. El más común e importante es la poliposis adenomatosa familiar.

La otra categoría importante de poliposis hereditarias es la de síndromes de poliposis hamartomatosos, principalmente el síndrome de Peutz-Jeghers, la poliposis juvenil hereditaria y el síndrome de Cowden.

Hay otros síndromes de poliposis hereditaria y no hereditaria muy infrecuentes (Lichtenstein y Wu, 2005).

3.2 Síndromes hereditarios de riesgo en CCR (tabla I).

Síndromes de poliposis

- **Poliposis adenomatosa familiar (PAF):** es un trastorno autosómico dominante que afecta aproximadamente a 1 de cada 10.000 individuos y da cuenta del 0.5 al 1 % de los casos de CCR. Se desarrollan en los individuos de cientos a miles de adenomas colónicos entre los 25 y los 30 años. El CCR es inevitable en los individuos no tratados y se manifiestan en su mayoría a los 45 años de edad. En

un 90 % de los individuos se desarrollan adenomas en el intestino delgado y poliposis gástrica.

Esta poliposis es causada por una mutación en la línea germinal del gen supresor de tumores APC localizado en el cromosoma 5q21, una minoría de los casos es causada por una mutación bialélica en el gen reparador de las bases de escisión MYH.

- **Síndrome de Peutz-Jeghers:** es un síndrome de predisposición al cáncer heredado de modo autosómico dominante caracterizado por la presencia de numerosos pólipos hamartomatosos en el tubo digestivo y pigmentación mucocutánea. El síndrome es infrecuente y se da aproximadamente en 1 de cada 20 000 nacimientos. Las clásicas manchas mucocutáneas de pigmento de melanina se dan en los labios y en la mucosa bucal. La característica clínica predominante es la presencia de pólipos hamartomatosos gastrointestinales, desde el esófago hasta el recto de 3 a 4 cm. de tamaño, se observan en el estómago en el 40 % de los casos, en intestino delgado en el 80 % de los casos y en la región colorrectal en el 40 % de los casos. Los pólipos se producen en una edad temprana, un tercio de los pacientes experimenta síntomas a los 10 años de edad y del 50 al 60 % tienen síntomas antes de los 20 años de edad. Las principales complicaciones son las hemorragias y la obstrucción intestinal, los cánceres intestinales son secundarios a la degeneración maligna de los pólipos.

Este síndrome está causado por una mutación en la línea germinal del gen supresor de tumores STK11, localizado en 19p. El producto de dicho gen es una serina-treonina-cinasa implicada en la transducción de señales de crecimiento intracelulares

- **Poliposis juvenil:** se produce aproximadamente en 1 de cada 100 000 individuos, los pólipos son hamartomas con aspecto hiperplásico con gran cantidad de moco, varían de tamaño desde milímetros hasta centímetros, se encuentran comúnmente en la región colorrectal. La principal manifestación clínica es la hemorragia colorrectal, se asocia a un mayor riesgo de CCR hacia los 40 años. Es un trastorno autosómico dominante y pueden encontrarse mutaciones en la línea germinal, la mayoría de las mutaciones se encuentran en el gen SMAD4, localizado en 18q, que es un gen supresor de tumores.

- **Síndrome de Cowden:** también denominado síndrome de hamartomas múltiples gingivales, es un síndrome raro, 1 de cada 20 000 individuos que se caracteriza por lesiones cutáneas, hamartomas intestinales y un mayor riesgo de cáncer, es hereditario con un modo de transmisión autosómico dominante. Está causado

por una mutación en la línea germinal del gen supresor de tumores PTEN ubicado en 10q (Lichtenstein y Wu, 2005).

Tabla I. Riesgo de CCR en los síndromes hereditarios (Saenz et. al; 2009).

Síndromes hereditarios	Porcentaje de riesgo
PAF	100 %
HNPCC	80 %
Síndrome de Pentz-Jeghers (PJS)	40 %
Poliposis Juvenil (JPS)	45 %
Síndrome de Cowden (CS)	17 %
Poliposis Adenomatosa de colon atenuada (A-APC)	60 %

Síndromes no poliposos.

- **CCR no polipósico hereditario:** el síndrome autosómico dominante es la forma más común de CCR hereditario. Cerca de 75 % de los pacientes afectados desarrollarán CCR, aproximadamente a los 65 años de edad. Este síndrome se caracteriza por el inicio temprano de CCR de predominio derecho asociado a hasta 100 pólipos que se distinguen por una rápida progresión a CCR.

Existen dos tipos: **Lynch I** sólo presenta CCR y la edad de comienzo es temprana (alrededor de los 44 años), con una propensión (70 %) a la afectación del colon proximal y **Lynch II**, que asocia a otros tipos de cáncer (endometrio, intestino delgado y urológico). La edad promedio de diagnóstico de CCR es de 45 años; en el 35 % de las pacientes, el primer diagnóstico es de cáncer endometrial (Morgan et. al; 2008).

3.3 Factores de riesgo en el CCR

Los factores de riesgo para la presentación de cáncer de colon, de forma general son:

- **Edad:** mayores de 50 años. El riesgo aumenta en mayores de 50 años y existe mayor riesgo genético en pacientes más jóvenes. Es conocido el hecho que la incidencia de CCR, aumenta de acuerdo a la progresión de edad. Por otra parte, la historia familiar de acuerdo al número de familiares afectados, también incrementa el riesgo. Así, sí el riesgo de cáncer colorrectal de la población general es 6 %, aumenta al doble en individuos con un familiar directo afectado. La aparición de neoplasias en edades precoces, hace pensar en algún elemento genético involucrado. Cuando aparece a edad avanzada suele tener menor componente genético (Saenz et. al; 2009).
- **Dieta (alto consumo de grasas y carnes proteicas):** la ingesta de dietas ricas en lípidos saturados de origen animal aumenta el riesgo de CCR. La ingesta de carnes rojas aumenta el riesgo de CCR. Influyen la temperatura de preparación de la carne ya que a mayor temperatura mayor cantidad de aminas heterocíclicas; de igual forma, influye si la carne se fríe o no en estos casos la ingesta de carne con estas características incrementa dos veces la prevalencia de adenomas.
- **Diabetes y obesidad:** se ha relacionado el grado de actividad física y el Índice de Masa Corporal (IMC) de forma inversa con el riesgo de cáncer de colon pero no de recto, este efecto es mayor en los hombres.
- **Tabaquismo y alcoholismo:** se he sugerido que la ingesta de más de dos bebidas alcohólicas por día aumenta dos veces el riesgo de CCR. El tabaquismo prolongado se asocia a mayor riesgo de CCR.
- **Uso de analgésicos no esteroideos:** los analgésicos no esteroideos (AINE) pueden actuar de forma selectiva inhibiendo la enzima COX-2 o no selectiva inhibiendo ambas enzimas (COX-1 y COX-2). La prostaglandina E2, es un potente agente mitogénico en los cultivos de células de cáncer de colon, esta prostaglandina refuerza la señal de la vía Wnt, cuyos componentes se unen a su receptor en la membrana celular, inhibiendo la acción de la vía intracelular APC/Axina/GSK3b y liberando la B catenina (la cual, por lo regular, es atrapada por la APC/Axina/GSK3b marcándola para ser destruida por vía proteosómica) que está

libre para entrar al núcleo celular y activar factores de transcripción. Por lo anterior, el uso de AINE se asocia con una disminución del riesgo de CCR, los estudios epidemiológicos reportan disminución en la incidencia de adenomas, CCR y muerte por CCR. De igual manera, se ha reportado que el uso de AINE, específicamente sulindac y celecoxib favorecen la disminución del número y tamaño de los adenomas en la PAF e incluso pueden provocar la regresión de las lesiones (Jacobo, 2013).

- **Carga genética:** los antecedentes familiares de CCR confieren un riesgo aumentado a lo largo de la vida para CCR. La afección de un familiar de primer grado duplica el riesgo de CCR y aumenta de forma importante si el familiar es menor de 60 años. Asimismo, los antecedentes de CCR incrementan el riesgo de pólipos adenomatosos en familiares directos (Monges, 2011).

3.4 Genes que intervienen en el CCR

El desarrollo de una neoplasia en colon requiere al menos de cambios en tres tipos de genes celulares: protooncogenes (PO), genes supresores de tumores (GST) y genes de reparación de DNA.

Algunos de los genes estudiados que cambian su regulación en el proceso de carcinogénesis de colon se muestran en la Tabla 2.

Se ha demostrado que durante el proceso de carcinogénesis de colon, intervienen factores genéticos (mutaciones) y epigenéticos.

- PO son activados a oncogenes que promueven un crecimiento celular potenciado, ya que los productos codificados por proto-oncogenes ejercen efectos de control positivo sobre la proliferación celular y su mutación les confiere carácter dominante desde un punto de vista genético. A su vez, la inactivación de GST promueve igualmente un crecimiento potenciado debido a que los productos codificados por genes supresores de tumores ejercen una función reguladora negativa sobre los procesos de proliferación celular, lo que determina que su mutación en procesos tumorales les confiera un carácter recesivo (Zamorano et. al; 2008).
- Los cambios genéticos que conducen al CCR se inician con la inactivación de APC (Adenomatous Polyposis Coli o Poliposis Adenomatosa de Colon) un GST que

puede ser el responsable de la transformación del epitelio colónico desde un estado normal a uno hiperproliferativo. El producto de este gen mutado es una proteína de 300 kDa truncada. Tras inactivarse APC, se observa la activación mutacional del PO llamado K-ras, tras lo cual se evidencia la inactivación del GST llamado DCC (Deleted in Colorectal Cancer o delecionado en el cáncer colorrectal) ubicado en la región 18q22 y codifica una proteína de membrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Kathleen y Bert, 1992).

El último evento de inactivación se detecta en p53, otro GST, el cual está aparentemente involucrado en el cambio del estado de adenoma al de carcinoma (Nishisho *et al.*, 1991).

- Los genes de reparación de DNA contribuyen también al desarrollo de tumores de colon. Mutaciones en cualquiera de los genes de reparación señalados en la tabla I inducen a errores en la duplicación originando lo que se conoce como inestabilidad de microsatélites. Debe señalarse que el orden de los procesos de inactivación o activación descritos, no es absoluto y la acumulación total de cambios es quizás más importante que su orden, en determinar el proceso (Catalán *et al.*, 2003).

Tabla 2. Genes que cambian su regulación en el proceso de carcinogénesis (Catalán et al., 2003)

GEN	FUNCIÓN
<p>Oncogenes</p> <p>K-Ras CTNNB₁ SRC New/Her² MyC</p> <p>Genes supresores de tumores</p> <p>APC p53 DCC MCC SMAD4 SMAD2 TGF-B1 Nm23-H1 Nm23-H2</p> <p>Genes de reparación</p> <p>hMSH-2 hMLH-1 hPMS-1 hPMS-2 hMSH6</p>	<p>Transducción de señales Adhesión celular y transducción de señales Transducción de señales Receptor factor de crecimiento Regulación de ciclo celular</p> <p>Adhesión celular Regulación del ciclo celular (Detención en G₁) Adhesión celular Transducción de señales Transducción de señales Transducción de señales Transducción de señales Inhibe metástasis Inhibe metástasis</p> <p>Reparación de ADN Reparación de ADN Reparación de ADN Reparación de ADN Reparación de ADN</p>

El conocimiento de los mecanismos genéticos que llevan al desarrollo de CCR ha permitido conocer mejor cuáles son las etapas en el proceso de carcinogénesis colónica. El primer paso consiste en la inactivación del gen supresor APC, sumándose posteriormente la activación del oncogen KRas y la inactivación de otros genes supresores (TP53, SMAD4 y otros); todo ello conduce al desarrollo del carcinoma colorrectal (Figura 5), (Riestra y Rodrigo, 2007).

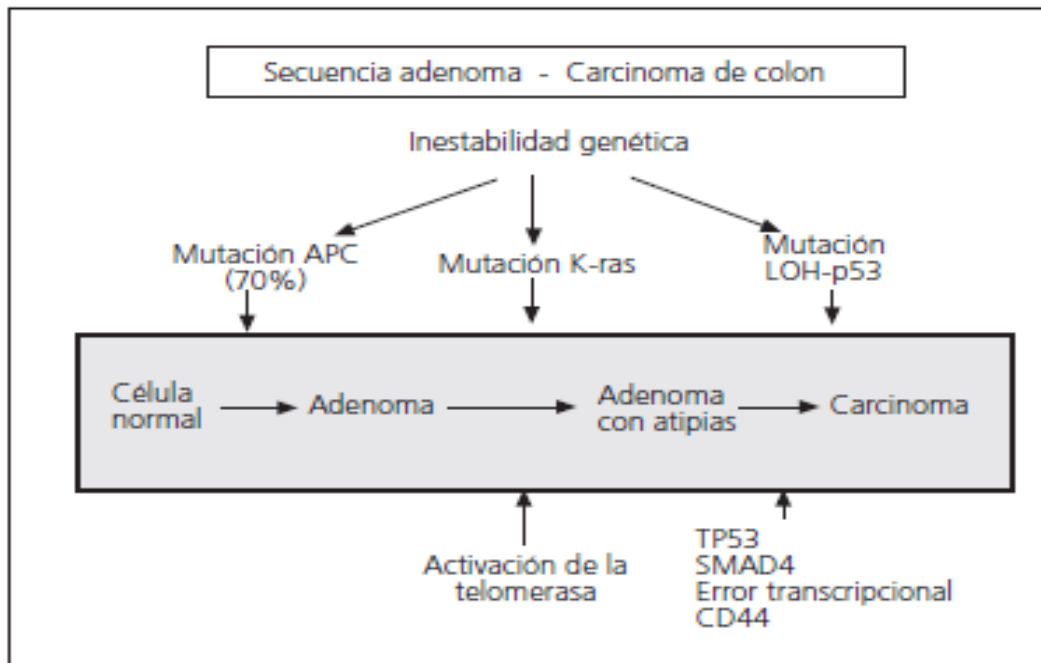


Figura5. Etapas en el proceso de carcinogénesis colónica (Riestra y Rodrigo, 2007).

3. 4. 1. Oncogén K-ras

Uno de los grandes avances en la genética molecular de los tumores colorrectales fue la identificación de mutaciones en el oncogén K-ras. La mayoría de las mutaciones K-ras identificadas (85 %) está confinada a los codones 12 y 13, el resto al codón 61. Las mutaciones de los codones 12 y 13 están asociadas a más del 50 % de los tumores. Las relaciones entre el tipo de mutación K-ras y el pronóstico del cáncer de colon y recto han sido investigadas intensamente, se ha reportado una clasificación genotípica pronóstica según el tipo de mutación K-ras. La detección de estas mutaciones en estadios tempranos de la secuencia adenoma-carcinoma, permite el seguimiento estricto de los pacientes; la determinación de la relación de las mutaciones con su pronóstico es vital para establecer la secuencia de eventos moleculares que ocurren previos al desarrollo de carcinoma, sin embargo, no está bien dilucidado en que porcentaje este gen está asociado al número de pacientes con cáncer de colon (Monges, 2011).

3.5 Estadios del CCR

- **Estadio 0 (carcinoma *in situ*):** en la figura 6 se observa el estadio 0, en este estadio se encuentran células anormales en la mucosa (capa más interna) de la pared del colon. Estas células anormales se pueden volver cancerosas y diseminarse (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

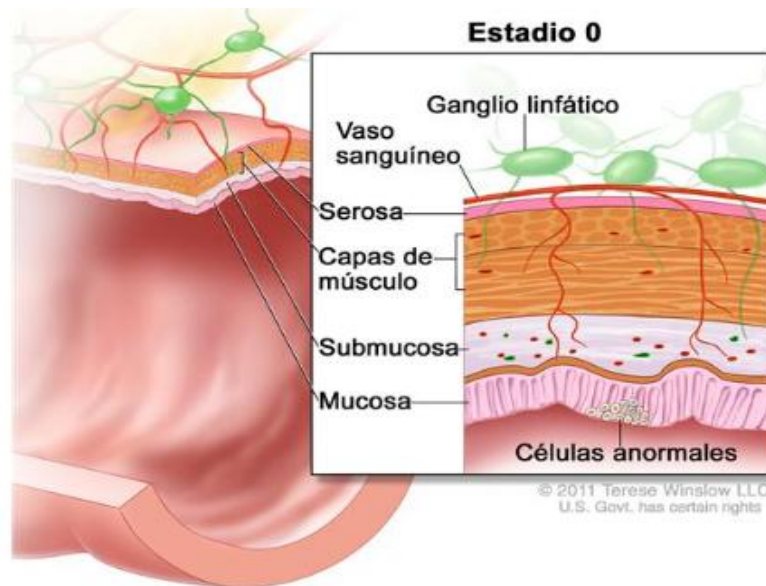


Figura 6. Estadio 0: se muestran células anormales en la mucosa de la pared del colon (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

- **Estadio I:** en esta etapa el cáncer se formó en la mucosa (capa más interna) de la pared del colon y se diseminó hasta la submucosa (capa del tejido debajo de la mucosa). El cáncer se puede haber diseminado hasta la capa muscular de la pared del colon (figura 7).

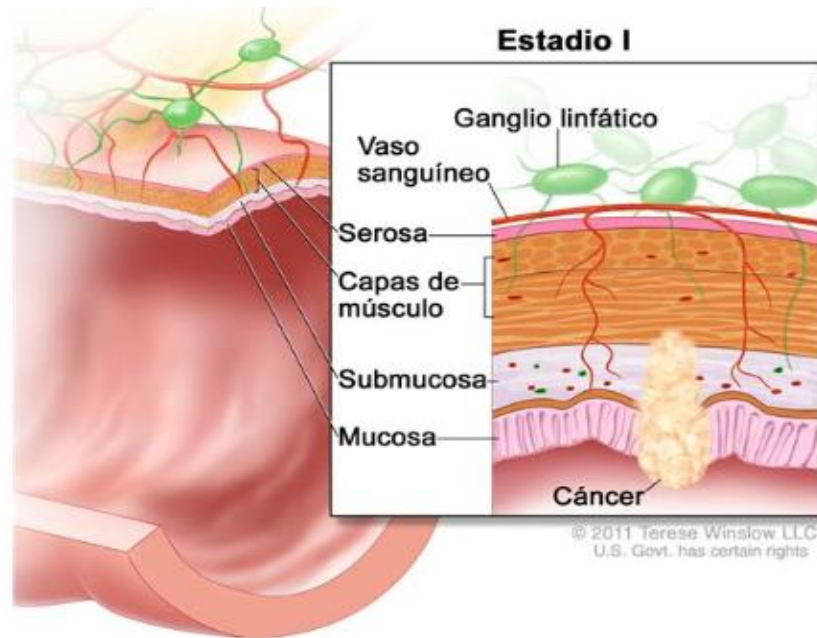


Figura 7. Cáncer de colon estadio I. El cáncer se diseminó desde la mucosa de la pared del colon hasta la capa del músculo (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

- **Estadio II:** este estadio se divide en estadio IIA, estadio IIB y estadio IIC (figura 8).
 - a) **Estadio IIA:** el cáncer se diseminó a través de la capa muscular de la pared del colon hasta la serosa (capa más externa) de la pared del colon.
 - b) **Estadio IIB:** el cáncer se diseminó a través de la serosa (capa más externa) de la pared del colon, pero no se diseminó a los órganos cercanos.
 - c) **Estadio IIC:** el cáncer se diseminó a través de la serosa (capa más externa) de la pared del colon hasta los órganos cercanos (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

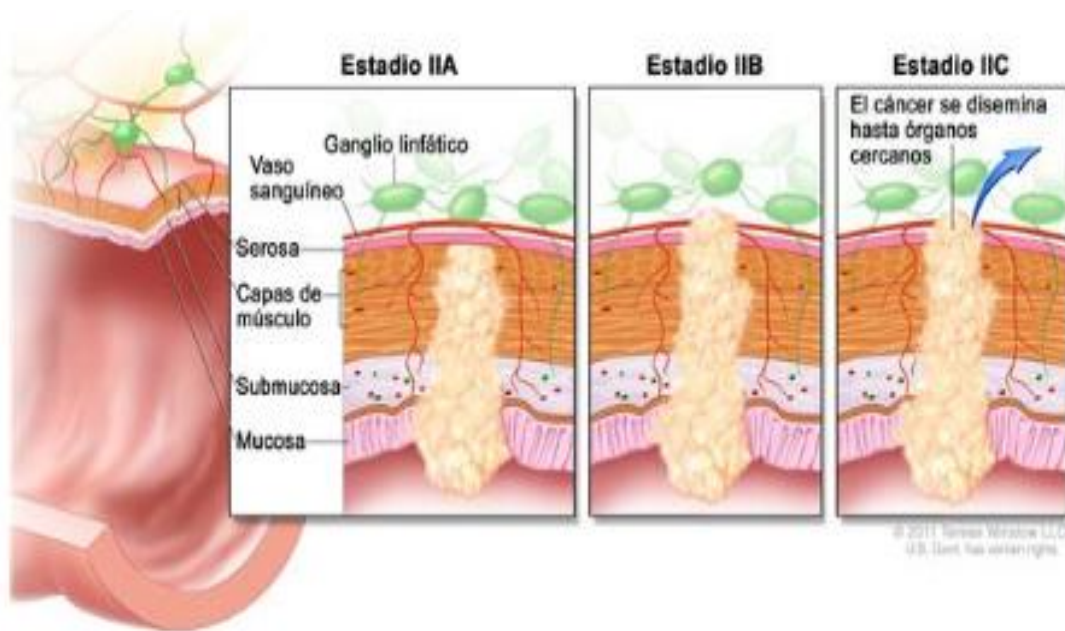


Figura 8. CCR en estadio II, se observa estadio IIA, IIB y IIC (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

- **Estadio III:** el cáncer de colon en estadio III, se divide en estadio IIIA, estadio IIIB y estadio IIIC:

a) **En el estadio IIIA:** en la figura 9 se muestra que el cáncer se puede haber diseminado a través de la mucosa (capa más interna) de la pared del colon hasta la submucosa (capa de tejido debajo de la mucosa) y se puede haber diseminado hasta la capa muscular de la pared del colon. El cáncer se diseminó a por lo menos uno, pero no más de tres ganglios linfáticos cercanos.

También se observa que otra opción puede ser que se formaron células cancerosas en los tejidos cercanos a los ganglios linfáticos, o el cáncer se diseminó a través de la mucosa (capa más interna) de la pared del colon hasta la submucosa (capa de tejido debajo de la mucosa).

En este caso el cáncer se diseminó a cuatro, pero no a más de seis, ganglios linfáticos cercanos (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

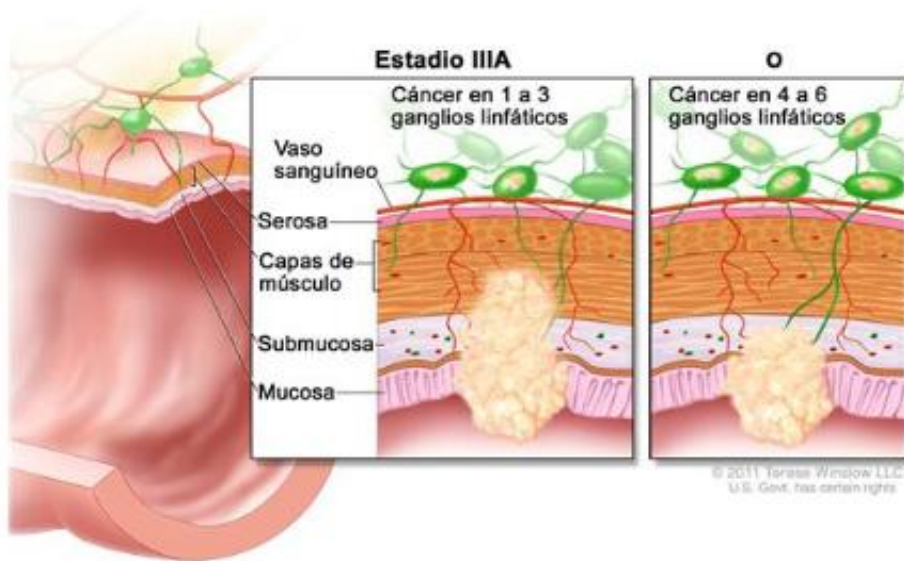


Figura 9. CCR en estadio IIA (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

- b) **En el estadio IIIB:** en la figura 10 se observa que el cáncer se diseminó a través de la capa muscular del colon hasta la serosa (capa más externa) de la pared del colon. El cáncer se diseminó a través de la serosa, pero no hasta los órganos cercanos.

Se diseminó hasta uno, pero no más de tres, ganglios linfáticos cercanos o se formaron células cancerosas en los tejidos cercanos a los ganglios linfáticos,

La segunda opción es que el cáncer se diseminó hasta la capa muscular de la pared del colon o hasta la serosa (capa más externa) de la pared del colon. Se diseminó a por lo menos cuatro, pero no más de seis, ganglios linfáticos cercanos.

La última opción es que el cáncer se diseminó a través de la mucosa (capa más interna) de la pared del colon hasta la submucosa (capa de tejido debajo de la mucosa) y se puede haber diseminado hasta la capa muscular de la pared del colon. Se diseminó a siete o más ganglios linfáticos cercanos (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

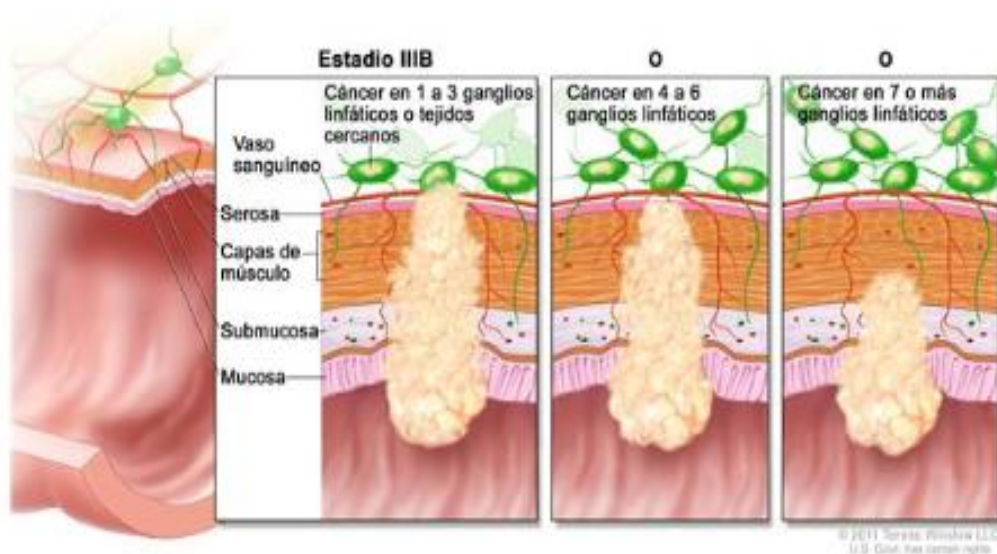


Figura 10. Estadio IIB de CCR (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

- c) **Estadio IIIC:** el cáncer se diseminó a través de la serosa (capa más externa) de la pared del colon, pero no se diseminó hasta los órganos cercanos. El cáncer se diseminó a por lo menos cuatro, pero no más de seis, ganglios linfáticos cercanos.

También la figura 11 muestra que el cáncer podría diseminarse a través de la capa muscular de la pared del colon hasta la serosa (capa más externa) de la pared del colon o se diseminó a través de la serosa, pero no se diseminó hasta los órganos cercanos. El cáncer se diseminó a siete o más ganglios linfáticos cercanos.

La última opción es que el cáncer se diseminó a través de la serosa (capa más externa) de la pared del colon y se diseminó hasta órganos cercanos. El cáncer se diseminó a uno o más ganglios linfáticos cercanos, o se formaron células cancerosas en los tejidos cercanos a los ganglios linfáticos (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

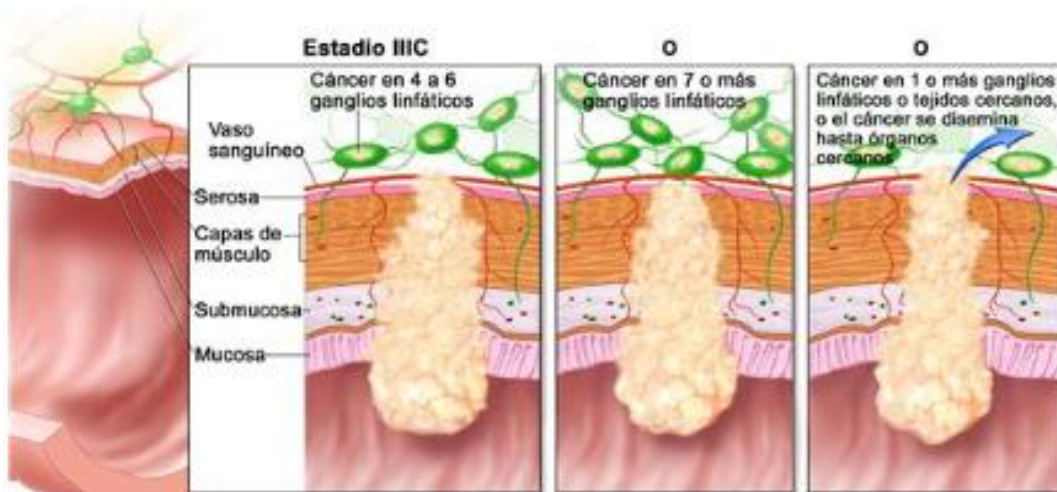


Figura 11. Estadio IIC de CCR (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

- **Estadio IV:** el cáncer de colon en estadio IV se divide en estadio IVA y estadio IVB:

En la figura 12 se puede observar que en el estadio IVA: el cáncer se puede haber diseminado a través de la pared del colon y se puede haber diseminado a órganos o ganglios linfáticos cercanos. El cáncer se diseminó a un órgano que no está cerca del colon, como el hígado, un pulmón o un ovario, o hasta un ganglio linfático lejano.

También se observa que en el estadio IVB: el cáncer se puede haber diseminado a través de la pared del colon y se puede haber diseminado hasta órganos o ganglios linfáticos cercanos. El cáncer se diseminó a más de un órgano que no está cerca del colon o hasta el revestimiento de la pared abdominal (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

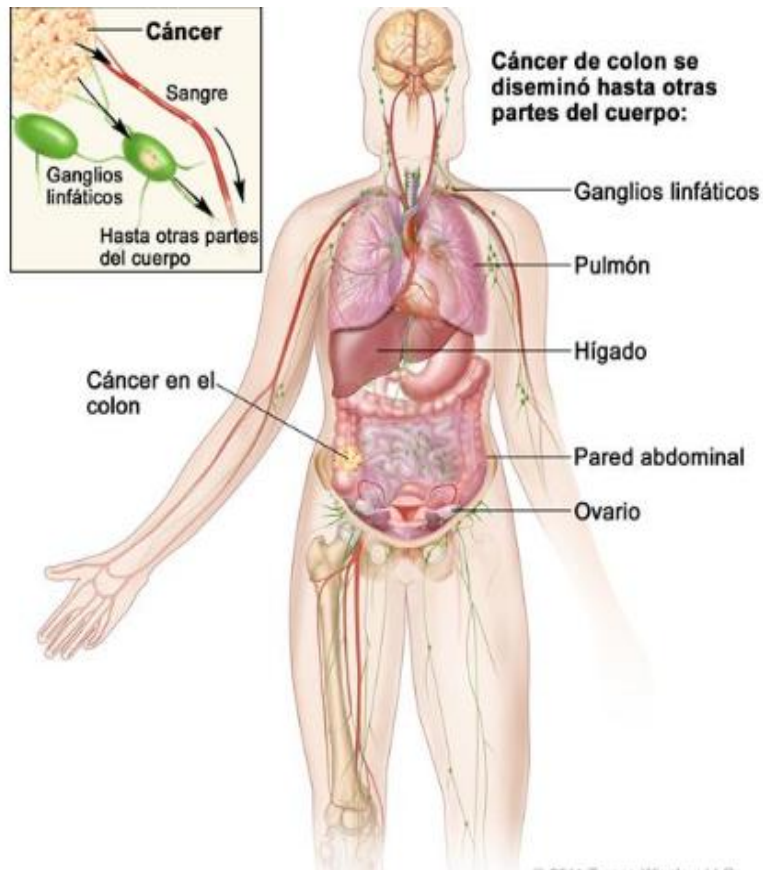


Figura 12. Estadio IV en CCR (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

3.6 Cuadro clínico

Los signos y síntomas de cáncer colorrectal son variables e inespecíficos. La presencia de síntomas notables o la forma en que se manifiestan depende del sitio del tumor y la extensión de la enfermedad de la misma forma depende del momento de la presentación pero entre algunos de los más frecuentes se pueden encontrar:

- **Sangre en las heces:** es uno de los síntomas más frecuentes del cáncer colorrectal. Puede tratarse de sangre roja, más frecuente en tumores de recto, sigma y colon descendente, o de sangre negra, que se mezcla con las heces dando lugar a deposiciones de color negro también llamadas melenas. Las melenas aparecen con más frecuencia cuando el tumor está situado en el colon ascendente.

Tras cierto tiempo de sangrado y cuando la hemorragia no es detectada o no se acude al médico para su diagnóstico y tratamiento, suele aparecer una anemia que puede producir, en mayor o menor medida, una serie de síntomas como la sensación de falta de aire, cansancio, palpitaciones, mareo.

- **Cambio en el ritmo de las deposiciones:** aparece diarrea o estreñimiento en personas con ritmo intestinal previo normal, aunque, lo más frecuente es que se intercalen periodos de estreñimiento con periodos de diarrea.
- **Heces más estrechas:** generalmente esto se produce porque el tumor está estrechando el intestino y no permite el paso de las heces normalmente.
- **Tenesmo o sensación de evacuación incompleta:** Suele aparecer en tumores localizados en el recto o en el colon izquierdo.
- **Dolor abdominal:** suele ser un síntoma frecuente, aunque generalmente, se trata de un dolor inespecífico. Cuando el tumor cierra parcialmente el calibre del tubo intestinal se produce un cuadro de dolor abdominal tipo cólico. Cuando el cierre es completo se acompaña de estreñimiento y vómitos.
- **El cansancio extremo o la pérdida de peso sin causa aparente:** son síntomas generales e inespecíficos que ocurren con frecuencia en determinadas enfermedades, entre las que se encuentran los tumores (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

3.7 Diagnóstico

Además del interrogatorio completo, las técnicas diagnósticas incluyen el tacto rectal, que es útil en el caso de los tumores bajos y permite conocer las características del tumor, como su relación con la pelvis y los órganos vecinos.

La colonoscopia es el estudio diagnóstico de elección. Con ella se puede observar por completo colon y recto, tomar biopsias pertinentes.

Entre los procedimientos que se pueden utilizar se encuentran los siguientes:

- **Examen físico y antecedentes :** examen del cuerpo para revisar los signos generales de salud, incluso verificar si hay signos de enfermedad, como masas o cualquier otra cosa que parezca anormal. También se toman los antecedentes médicos de las enfermedades y los tratamientos anteriores del paciente.

- **Examen digital del recto** : el médico o enfermero introduce un dedo cubierto por un guante lubricado en el recto para palpar y ver si hay masas o cualquier otra cosa que parezca poco usual.
- **Prueba de sangre oculta en la materia fecal** : análisis que evalúa la presencia de sangre visible solamente al microscopio en las heces (residuos sólidos). Se colocan muestras pequeñas de heces sobre tarjetas especiales y se envían al médico o al laboratorio para evaluación (Jacobo, 2013).

Cuando la presentación es aguda, existen síntomas agudos que indican obstrucción o perforación de intestino grueso. La oclusión de colon sugiere firmemente cáncer, en particular en pacientes de edad avanzada. En menos del 10 % de enfermos con CCR ocurre obstrucción completa, pero es una urgencia que requiere diagnóstico y tratamiento quirúrgico de inmediato. Como ideal, esta urgencia quirúrgica se evitaría identificando temprano cambios en las defecaciones. Los pacientes con obstrucción completa se quejan de incapacidad para eliminar flatos o heces, dolor en abdomen tipo cólico y distensión abdominal.

El examen descubre un abdomen distendido timpánico; en ocasiones es posible palpar el tumor obstructor como una masa abdominal, si la obstrucción no se alivia y el colon continúa distendido, la presión en la pared intestinal puede exceder la de los capilares, y no llegará sangre oxigenada a la pared del intestino, lo que origina isquemia y necrosis. En estos casos el paciente se quejará de dolor intenso del abdomen y en la exploración se encontrará hipersensibilidad de rebote y disminución o ausencia de ruidos intestinales. Si no se trata de inmediato la necrosis evoluciona hasta la perforación con peritonitis fecal y sepsis (Monges, 2011).

3.8 Tratamiento

Aproximadamente una cuarta parte de los pacientes con CCR tienen metástasis al momento del diagnóstico y una tercera parte de los enfermos diagnosticados con CCR resecable, desarrollaran metástasis durante su vigilancia. La historia del tratamiento sistémico de CCR se puede englobar en 3 periodos:

- 1) La incorporación del 5-Fluoruracilo (5FU), la biomodulación con diferentes fármacos destacando el ácido folínico, y el desarrollo de infusiones prolongadas.
- 2) La introducción de irinotecan y oxaliplatino.
- 3) La adición de las terapias dirigidas a los esquemas de quimioterapia (QT).

La cirugía ofrece el mayor porcentaje de control de la enfermedad, presentando en las diferentes series de casos sobrevividas que oscilan entre el 24 y 58 % con promedio del 40 % y riesgo de mortalidad posquirúrgica baja la cual llega a ser < 5 % (Jacobo, 2013).

4. Modelo experimental de inducción

El estudio de la carcinogénesis de colon en roedores tiene una larga historia, que se remonta casi 80 años. Hay muchas ventajas para el estudio de la patogénesis de cáncer de colon inducido por carcinógenos en modelos de ratones, incluyendo la reproductibilidad y la rapidez de la inducción de tumores y las similitudes con el cáncer colorrectal humano, con esto se busca identificar el primer precursor morfológico del desarrollo de carcinoma de colon esta búsqueda condujo a la descripción de FCA, uno de los primeros eventos visibles en los modelos inducidos por carcinógenos de la tumorigénesis colorrectal (Fenoglio y Noffsinger, 1999).

4.1 Principales carcinógenos

Los tumores de intestino han sido inducidos por distintos carcinógenos, que se han desarrollado principalmente en estos últimos 40 años.

Los tumores animales producidos por carcinógenos deben seguir unos criterios para su utilización como modelos para estudios epidemiológicos y quimioterapéuticos:

1. Aparición unilocular del tumor.
2. Período de incubación tumoral relativamente corta, bien definida y con pequeña desviación tumoral.
3. Tumor diagnosticable en el tiempo.
4. Biología tumoral paralela a su equivalente humano.
5. Quimiosensibilidad paralela a su equivalente humano.

Los carcinógenos químicos colónicos pueden ser clasificados en 7 grupos en base a su estructura química, tal como se muestra en la tabla 3 (Piñols, 2010).

Tabla 3. Clasificación de los carcinógenos químicos colónicos (Piñols, 2010).

FAMILIA QUÍMICA	CARCINÓGENO
Hidracinas	1, 1 - Dimetilhidrazina (1,1-DMH) 1,2 - Dimetilhidrazina dihidrocloruro (1,2-DMH) Metilhidracina (MH) Acido fórmico 2-4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolilhidracida (FAH) l-Metil-2-butilhidracina dihidrocloruro (MBH) Trimetilhidracina hidroccloruro (TMH)
Compuestos azoxi	Azoximetano (AM) ONN-Metilazoxibutano (MAB) Metilazoximetanol (MAM) Metilazoximetanol glucósido, cicasina (MAMG)
Compuestos N-Nitroso	N-Metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) N-Metilnitrosourea (NMU) N-Nitrosobis (2-hidroxipropil) amina (BHP) N-Nitrosobis (2-oxopropil) amina (BOP)
Dextrano sulfato y polisacáridos relacionados	Asbestos
Aminas ariles y heterocíclicas	3,2'-Dimetil-4-aminobifenil (DMAB) 35 2-Amino-3-Metilimidazolquinolina
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	3-Metilcolantreno
Aflatoxina	AFB1, AFB2

4. 2 Focos de criptas aberrantes (FCA) como precursores de CCR

Los intestinos grueso y delgado actúan como barreras importantes en contra de agentes exógenos particularmente sustancias con capacidad mutagénica y carcinogénica (Mori et. al; 2004).

En la formación y desarrollo de lesiones preneoplásicas y neoplásicas en el colon y recto, existen factores etiológicos que se explican como resultado de procesos de biotransformación, activación o eliminación de compuestos químicos que se han ingerido por diferentes vías al organismo (Zamorano et. al., 2008).

Un hallazgo importante fue que las alteraciones genéticas pueden estar presentes en una mucosa del colon que no muestra signos histológicos de la neoplasia (Fenoglio y Noffsinger, 1999).

Uno de los eventos más tempranos en carcinogénesis colorrectal, es la alteración del patrón proliferativo de las células epiteliales en las criptas colónicas, asociado a un trastorno en el control de muerte celular programada (apoptosis) en el epitelio colónico. Esto resulta en la formación de pólipos y es conocido que los pólipos adenomatosos son precursores del CCR (Secuencia adenoma-carcinoma).

Se ha reconocido que un paso aún más precoz en el proceso de carcinogénesis sería el desarrollo de criptas morfológicamente anormales en la superficie de la mucosa colónica, lo que se ha denominado "*focos de criptas aberrantes*" (FCA) y podría constituir un precursor del CCR y por lo tanto, ser usado como marcador de carcinogénesis en individuos con un riesgo aumentado (León y Roque, 2007).

Se ha encontrado una correlación entre la presencia de los FCA y los carcinomas colorrectales de 100 %, esto significa que los FCA son considerados como un biomarcador confiable de cáncer colorrectal y por lo tanto, una herramienta útil para la detección temprana de esta enfermedad (Bird y Good, 2000).

La primera descripción de FCA fue en 1987 por Bird, quien observó bajo microscopía criptas aberrantes en mucosa colónica teñida con azul de metileno de ratas tratadas con un agente carcinogénico el azoximetano. A cuatro años de su primera descripción en ratones Pretlow y colaboradores los describían en colon y recto de seres humanos (Alrawi et. al., 2006).

Los FCA son lesiones hiperproliferativas encontradas en el colon de animales tratados previamente con algún carcinógeno. De manera que los FCA se han propuesto como lesiones precancerosas caracterizadas por el incremento de diámetro y con algunas

irregularidades y tortuosidades, con ocasionales evaginaciones de la capa epitelial de la mitad superior de la cripta (Bird, 1995).

Los FCA fueron identificados y definidos por su apariencia microscópica en la mucosa colónica, en que las criptas presentan las siguientes características:

- 1)** Son más alargadas que lo normal.
- 2)** Tienen espacio pericriptico aumentado que las separa de las criptas normales.
- 3)** Tienen una capa más gruesa de células epiteliales, que a menudo se tiñen más oscuras.
- 4)** Generalmente tienen un lumen oval más que circular.
- 5)** Frecuentemente se aprecian elevadas sobre la mucosa, pero también pueden ser deprimidas. Pueden ser observadas como criptas únicas alteradas o como un grupo de criptas alteradas que se denominan "foco" (León y Roque 2007).

Suelen visualizarse microscópicamente al observar la mucosa colorrectal utilizando una tinción con azul de metileno, difieren de las criptas normales circundantes porque tienen más protuberancias en la superficie de la mucosa y porque se tiñen más oscuro que la mucosa circundante.

Son variables en tamaño, desde una única cripta a grandes áreas con cientos de criptas y ambos tipos de alteraciones pueden estar en el mismo paciente (Rosenberg et. al; 2009). Los resultados anteriores sugieren fuertemente que los FCA, son lesiones precursoras de adenomas y cánceres (Figura 13), (León y Roque, 2007).

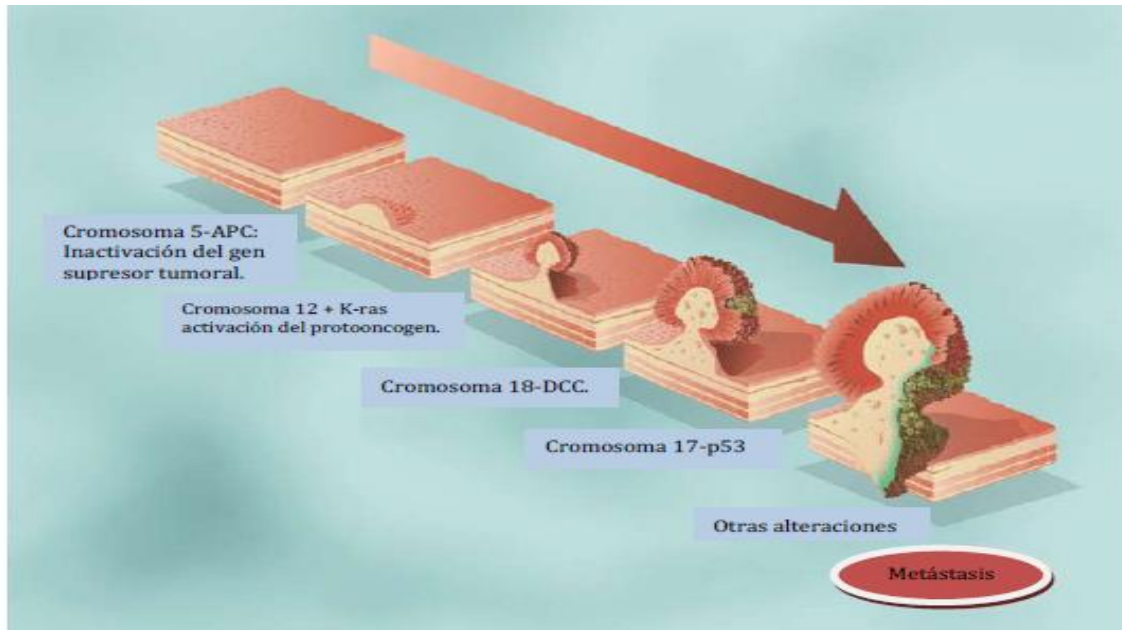


Figura 13. Modelo desde el punto de vista genético y citológico de la tumorigénesis colorrectal (Márquez, 2002)

Los FCA corresponden a lesiones preneoplásicas y son de extrema utilidad para realizar experimentos con factores ambientales que permiten estimar la etiología, el tratamiento y la prevención del cáncer de colon. Los modelos experimentales en roedores pueden imitar con un elevado nivel de significación muchos de los rasgos principales del CCR humano.

Entre las ventajas que se han descrito y que argumentan a favor del uso de este modelo de inducción química de carcinogénesis, se pueden mencionar: potencia, reproducibilidad, simpleza y similitudes con el CCR humano como por ejemplo la ubicación de tumores que en ratón y humanos se concentra en la parte distal del colon (Montenegro et. al; 2003).

La disminución de FCA en ratas se ha empleado para identificar y evaluar agentes con capacidad anticarcinogénica (Reddy et. al; 1996).

4.3 Alteraciones genéticas de FCA

El cáncer de colon es el resultado de la acumulación de múltiples defectos genéticos en la misma célula. Si los FCA son lesiones precursoras de estos cánceres, deberían presentar

algunas de estas alteraciones. La primera alteración genética identificada en FCA en humanos fue la aparición de mutaciones en el gen K-RAS, la que se observa en un 73 %. La mutación del gen APC es frecuente en los pólipos, pero en contraste a la mutación KRAS es mucho más difícil de identificar y se produce en el momento en que los FCA llegan a ser adenomas.

Respecto a las mutaciones en el gen p53, se piensa que es un evento tardío en el proceso de carcinogénesis, por lo que no ha sido detectado en lesiones FCA.

Además de las alteraciones genéticas mencionadas, hay varios estudios que muestran un rol en la metilación de DNA muy temprano en la tumorigénesis colorrectal. Se ha demostrado metilación del gen p16, MGMT, hMMH1 MINT31, MINT2 y MINT1. Según las aproximaciones anteriores, hay múltiples razones para concluir que FCA son los precursores más tempranos de cáncer colorrectal (Andrew et. al; 1998).

4.4 Identificación de FCA

Los FCA pueden ser identificados *in vivo*, usando endoscopia con magnificación con la ayuda de tinción de azul de metileno. Es necesario utilizar un endoscopio con magnificación y realizar una colonoscopia completa. La mucosa colorrectal debe ser lavada con agua, y se recomienda utilizar una proteasa como N-acetylcisteína para remover el mucus en la mucosa. Luego se debe aplicar a toda la superficie azul de metileno al 0,25 % por cerca de 2 minutos y lavar otra vez con agua.

Los FCA aparecen endoscópicamente como lesiones en que las criptas son teñidas más intensamente con azul de metileno, comparado con criptas normales y tienen un mayor diámetro, a menudo con lúmenes ovoides y un epitelio más engrosado (Roncucci et. al; 1991).

Además es posible utilizar como tinción para cromoendoscopia colónica una solución de índigo carmina, que involucra una tinción que contrasta azul, que acentúa los contornos de la lesión y así provee de una vista detallada de sus bordes y formas sin tener que usar el colonoscopio con magnificación (Takayama et. al; 2005).

Los adenomas que presentan un alto riesgo de poder convertirse en CCR, son aquellos que tienen un tamaño superior a 1 cm, presentan displasia grave de alto grado (carcinoma *in situ*) o carcinoma invasor, por lo que se les denomina genéricamente como adenomas avanzados. Aproximadamente el 5 % de los adenomas colorrectales presentan transformación carcinomatosa. El crecimiento de estas lesiones es lento, de forma que un pólipo menor de 1 cm, tarda aproximadamente entre 5-10 años en malignizarse (Dolara et. al; 1997).

El término "pólipo" comprende cualquier crecimiento circunscrito que hace protrusión desde la pared hacia la luz intestinal. Dependiendo de su naturaleza histológica, los pólipos colorrectales se clasifican en neoplásicos y no neoplásicos (Riestra y Rodrigo, 2007).

5. Compuesto inductor de lesiones preneoplásicas: 2,4-dinitrofenilhidrazina

5.1 Mecanismo de la 1,2-Dimetilhidrazina:

Debido a que no se encuentra en el país la 1,2- Dimetilhidrazina dihidroclorato (1,2-DMH), se utilizó la 2,4-Dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH), se desconoce el mecanismo de acción exacto de ésta, pero tomando en cuenta sus similitudes estructurales se cree que es semejante al de la 1,2-DMH (Del Monte y Sánchez, 2011).

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

Es un carcinógeno efectivo y selectivo de colon, debido a su actividad alquilante en los ácidos nucleicos del epitelio intestinal y sus propiedades mutagénicas. Actúa modificando el genoma de la célula, ocasionando eventualmente alteraciones del fenotipo celular, tales como diferenciación, invasividad o conducta proliferativa anormal. La N-Metilguanina y la O-6 Metilguanina han sido aisladas del ADN de la mucosa colónica de ratas inyectadas con 1,2-DMH y en colon de rata cultivado tras su incubación con DMH marcado.

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

La carcinogénesis por 1,2-DMH en el colon de la rata es un proceso en 2 etapas y el producto de las tasas a las que cada paso aparece es de alrededor de 2×10^{-8} /célula en riesgo/dosis de DMH/año.

Un tratamiento con 1,2-DMH es capaz de inducir directamente un cambio estable y transmisible en un número de células epiteliales que por consiguiente estarían en riesgo respecto a un segundo suceso capaz de iniciar el crecimiento tumoral. Este cambio es

transmisible dentro de la mucosa, que se renueva por períodos prolongados. Las células afectadas no tienen expresión fenotípica en términos de ventaja proliferativa.

El segundo cambio no requiere exposición al carcinógeno y afecta aleatoriamente a las células expuestas al carcinógeno a una tasa que es constante, al menos dentro del tejido considerado.

El primer paso representa una mutación somática. Las propiedades químicas y biológicas de la 1,2-DMH, sus propiedades mutagénicas, así como la naturaleza transmisible y estable de sus efectos en el epitelio intestinal apoyan este mecanismo. Cada inyección de 1,2-DMH entra en interacciones inespecíficas diseminadas con el DNA y otros constituyentes macromoleculares celulares y es probablemente capaz de inducir, sobre una base aleatoria, una primera mutación específica en una proporción dada de células del colon.

Estas células estarían en riesgo para el segundo cambio, que permitiría la expresión del fenotipo cáncer. En tal sistema, el umbral teórico de la dosis de carcinógeno sería la dosis más pequeña capaz de inducir la primera mutación específica en al menos una célula. En este momento, existe un mecanismo en el epitelio del colon que puede aparecer independientemente de la exposición al carcinógeno y es capaz ya de producir un efecto mutacional específico en las células.

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

La organoespecificidad de la 1,2-DMH depende de reacciones de oxidación catalizadas por reacciones enzimáticas no identificables en los tejidos diana. Estudios autorradiográficos utilizando 1,2-DMH marcado muestran que este agente es captado por el hígado aproximadamente 1 hora después de la inyección y en las células epiteliales del colon 3 horas después de la misma.

La 1,2-DMH es excretada primariamente por el pulmón y riñones que eliminan del animal aproximadamente un 50 % de la dosis inyectada. Los principales metabolitos en aire espirado son CO₂ y azometano; la orina contiene, 1,2-DMH inalterada, azoximetano, azometano y metilazoximetanol. Se presume que el hígado es el lugar primario de oxidación de 1,2-DMH a metilazoximetanol (MAM), que es entonces transportado vía sangre y/o corriente fecal al colon y otros órganos, aunque otros estudios indican que el colon en sí mismo contiene tipos celulares epiteliales o enzimas capaces de convertir la 1,2-DMH en productos mutagénicos sin implicar necesariamente metabolismo

intermediario por hepatocitos, de hecho la mucosa colorrectal implantada en el estómago es sensible a la tumorigénesis causada por 1,2-DMH.

También se ha observado que el tránsito intestinal enlentecido induce un número aumentado de neoplasias colónicas en relación con el contacto prolongado con la mucosa del carcinógeno o debido a una mayor concentración en la luz colónica.

Los estudios de Stralka y Strobel, en 1991 usando anticuerpos policlonales anti P450, IIB1 y IIA1 postularon un sistema de metabolización de la droga P450-dependiente en el colon capaz de activar y metabolizar el modelo de carcinógeno colon-específico 1,2-DMH.

Algunos inhibidores metabólicos pueden interrumpir la activación del 1,2-DMH y prevenir la inducción tumoral. Algunos antioxidantes como el disulfiram y otros compuestos relacionados como el carbón disulfuro o el bis (etilxantógeno) son capaces de inhibir la carcinogénesis inducida por DMH y azometano (AOM) inhibiendo la N-oxidación in vivo de AOM a azoximetano y la oxidación del AOM in vivo (Piñols, 2010).

Davies et. al; en 1991 demostraron que aparecen alteraciones en la bomba de Na⁺/K⁺ en la mucosa premaligna de animales tratados con 1,2-DMH meses antes de que se desarrollen tumores visibles y estos cambios pueden explicar parcialmente los niveles alterados de Na⁺ y K⁺ en el citoplasma y membrana basal de colonocitos premalignos y malignos. La despolarización epitelial se produce tras la inyección del carcinógeno

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

5.2 Características y aplicaciones de la 2,4-DNFH.

Es un compuesto orgánico sólido presente como polvo húmedo rojo o anaranjado, cristalino, relativamente sensible a golpes y fricción, por lo que debe tener especial cuidado con su uso.

Sinónimos: Hidracina, (2,4-dinitrofenil)-; 2,4 DNPH

Peso molecular: 198.14

Formula química: C₆H₆N₄O₄

Olor: Ninguno.

Solubilidad: Poco soluble en agua.

Densidad: Información no disponible.

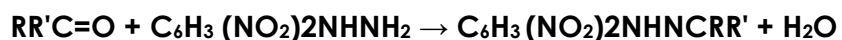
pH: Información no disponible.

% de volátiles por volumen a 21°C: 0

Punto de ebullición: No hay información.

Punto de fusión: 198 - 202° C (Ficha de seguridad, 2001).

La 2,4-dinitrofenilhidracina puede usarse para detectar cualitativamente los grupos carbonilo de cetonas y aldehídos (figura14). El resultado es positivo cuando hay un precipitado rojo o amarillo (dinitrofenilhidrazona):



Esta reacción puede describirse como una reacción de condensación: se unen dos moléculas y pierden agua. También es llamada reacción de adición-eliminación: una adición nucleofílica del grupo -NH₂ al grupo carbonilo C=O, seguida de la remoción de una molécula de H₂O (Sustitución nucleofílica aromática obtención de 2,4 Dinitrofenilhidrazina, 2011).

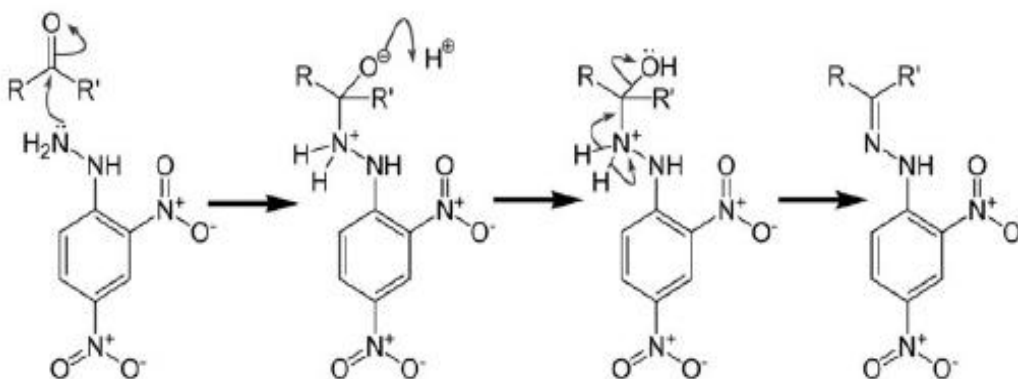


Figura 14. Mecanismo de reacción entre la 2,4-DNFH y un aldehído o cetona (Sustitución nucleofílica aromática obtención de 2,4 Dinitrofenilhidrazina, 2011).

5.3 Síntesis

La obtención de 2,4-dinitrofenilhidracina es una reacción de sustitución Nucleofílica aromática (figura 15). La sustitución de un halógeno por un nucleófilo en un halogenuro de arilo que no tiene grupos electro atractores como sustituyentes es muy difícil. El anillo aromático es un sistema rico en electrones, lo que le dificulta reaccionar con reactivos

que también son ricos en electrones. Sin embargo cuando hay grupos electro atractores, especialmente grupos nitro en posición orto o para al halógeno, la sustitución nucleofílica toma lugar con relativa facilidad. Este cambio de reactividad del anillo aromático es debido a que los grupos nitro además de que hacen menos rico en electrones al anillo, estabilizan la carga negativa por efecto inductivo (con el nitrógeno cargado positivamente) y por efecto de resonancia (con un doble enlace C=N (Sustitución nucleofílica aromática obtención de 2,4 Dinitrofenilhidrazina, 2011).

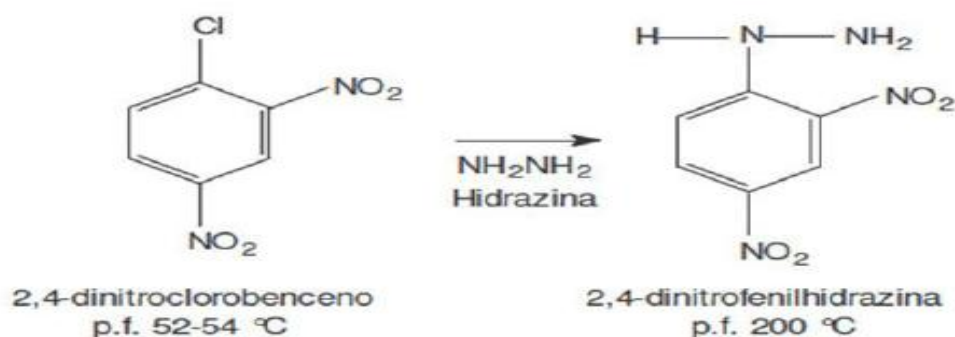


Figura 15. Síntesis de la 2,4-DNFH (Sustitución nucleofílica aromática obtención de 2,4 Dinitrofenilhidrazina, 2011).

6. Éster fenílico del ácido caféico (CAPE)

En los últimos años la investigación de los fármacos antitumorales ha progresado extraordinariamente, la síntesis de nuevos medicamentos ha sido una herramienta de gran importancia para dicho avance. Uno de los componentes del propóleo más estudiados en los últimos 10 años, es el CAPE, compuesto fenólico, que posee un amplio espectro de actividades biológicas, incluyendo las de quimioprevención y reversión de tumores (Beltrán et. al., 2006).

6.1 Propóleo

La palabra propóleo se deriva del griego *pro* (en defensa de) y *polis* (la ciudad), con lo cual se designa a la sustancia que recubre la colmena o polis de las abejas y cumple funciones defensivas (Burdock, 1998).

El propóleo es el nombre genérico de una sustancia fuertemente adhesiva y resinosa, tiene su origen en los brotes jóvenes de los árboles, pero también en las fracturas y golpes que sufren estos, de donde brota resina (Marcucci, 1995).

El material resinoso es colectado por las abejas de la especie *Apis mellifera*, los materiales colectados son triturados humedecidos con saliva, secreciones enzimáticas, mezclados con la cera producida por las glándulas céricas y finalmente transportados por las abejas hacia la colmena (Gerónimo, 2011).

El propóleo (figura 16), se utiliza en la colmena para sellar los agujeros, fijar los panales de miel, pulir las paredes interiores, proteger la entrada contra los intrusos, previene el crecimiento de microorganismos y para embalsamar a sus presas (Montoro, 2006).



Figura 16. Propóleo

Desde tiempos antiguos se han reconocido las propiedades terapéuticas del propóleo. Los egipcios conocían sus propiedades anti-putrefactivas y lo usaban para embalsamar cadáveres. En Grecia y Roma se empleaba como antiséptico, cicatrizante, en el tratamiento de heridas y como desinfectante bucal. Las civilizaciones del Nuevo Mundo, también conocieron sus propiedades; se conoce que los Inca emplearon el propóleo como agente antipirético. Adicionalmente, la farmacopea Inglesa en el siglo XVII, incluyó el propóleo en el listado de medicamentos oficiales (Castaldo y Capasso, 2002).

La composición química del propóleo es altamente variable, ya que ésta depende del sitio de recolección y por lo tanto de los diferentes ecosistemas donde las abejas recolectan los exudados y las secreciones de las plantas.

Sin embargo, se puede decir que en general los propóleos están compuestos por 50 % de resinas, 30 % de ceras, 10 % de aceites esenciales y aromáticos, 5 % de polen y 5 % de otras sustancias que incluyen escombros orgánicos (Burdock, 1998).

Además, se ha determinado que los componentes del propóleos se originan de tres fuentes: los exudados de las plantas que colectan las abejas, las sustancias secretadas por el metabolismo de las abejas y los materiales que se introducen durante la elaboración del propóleos (Daugusch et. al; 2008).

Los análisis de composición química de este producto apícola han permitido la identificación de por lo menos 300 compuestos , entre los que se incluyen flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres, aldehídos y cetonas, ácidos grasos y sus ésteres, terpenos, esteroides, aminoácidos, polisacáridos, hidrocarburos, alcoholes, y otros compuestos presentes en trazas (García, 2009).

El propóleo es un producto de extraordinario interés para la medicina e industria farmacéutica, al que se atribuyen diversos efectos beneficiosos para la salud, como antioxidante, secuestrador de radicales libres, antiinflamatorio, inmunoestimulante, hepatoprotector, antiviral, antifúngico, antiprotzoario, carcinostático, antimicrobiano y anestésico (Farré et. al; 2004).

Tabla 4. Composición y características del propóleo (Montoro, 2006).

COMPOSICIÓN	(%)	COMPUESTOS, CARACTERÍSTICAS Y OBSERVACIONES
Resinas	45-55	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres
Ceras	7.55 a 35	La mayoría cera de abeja, también de origen vegetal
Aceites esenciales	5-10	Volátiles
Ácidos grasos	5	La mayoría proceden de la cera y el resto dependen del origen botánico
Polen	5	Proteínas del polen y aminoácidos libres. Predominan arginina y prolina
Otros compuestos orgánicos y minerales	5	-14 oligoelementos Fe y Zn son los más abundantes, otros: Au, Ag, Cs, Hg, K, Sb. -Cetonas -Lactosas y otros azúcares -Quinonas -Esteroides -Ácido benzoico y ésteres -Vitaminas: B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₆ . Pequeñas cantidades procedentes principalmente del polen.

6.2 Ácido caféico y sus derivados

El término de quimioprevención se acuñó para describir una nueva disciplina en oncología, que consiste en el uso de compuestos sintéticos o naturales para inhibir, retardar o revertir la carcinogénesis. La quimioprevención se basa en la hipótesis de que la interrupción de los eventos biológicos involucrados en la carcinogénesis inhibirá este proceso y reducirá la incidencia de cáncer (Tsao et. al; 2004).

Este es el caso del propóleo y de sus componentes. Uno de los componentes del propóleo más estudiados en los últimos 10 años, es el CAPE (figura 17), derivado del ácido cinámico (CA) (figura 18), que confiere directamente varias propiedades al propóleo que posee un amplio espectro de actividades biológicas, incluyendo las de quimioprevención y reversión de tumores (Beltrán et. al; 2006).

El CAPE [ácido 2-propenoico, 3-(3,4-dihidroxifenil)-, 2-fenetil éster] es un compuesto polifenólico, es un polvo color blanco, cuya fórmula molecular es $C_{17}H_{16}O_4$ y presenta un peso molecular de 284.31 g/mol (Domínguez, 2008).

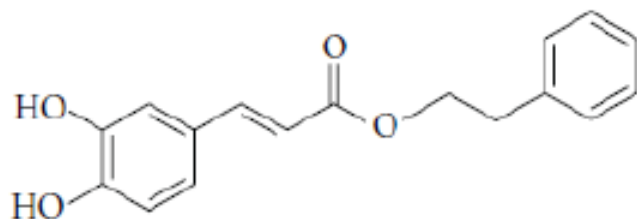


Figura 17. Estructura del CAPE (Beltrán et. al; 2006).

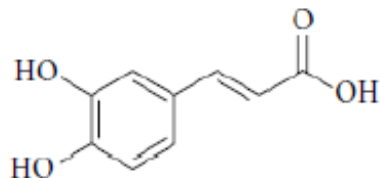


Figura 18. Estructura de CA (Beltrán et. al; 2006).

6.3 Mecanismos de acción del CAPE

A este compuesto se le han realizado diversos estudios desde principios de la década de los 90's con los cuales se comenzó a establecer su potencial como agente quimiopreventivo por distintos mecanismos. Es un antioxidante que ha tenido actividad contra el cáncer oral y de colon, debido al efecto inhibitorio de la ciclooxygenasa II (COX-2) (Ya-Ting et. al., 2005).

Su et. al; en 1991 investigaron el efecto tóxico diferencial de CAPE, encontraron que éste es citotóxico al tumor y no a las células normales, estudiando la transformación de fibroblastos embrionarios mediante adenovirus tipo 5 (Ad5); el genoma de este adenovirus proporcionó una importante herramienta para estudiar la función de la supresión tumoral.

Huang et. al; en 1996 determinaron el efecto inhibitorio del CAPE en la promoción tumoral inducida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) en ratones previamente inducidos por 7,12-dimetilbencil [a] antraceno (DMBA) aplicando CAPE a las concentraciones de (1, 10, 100 y 3000 nmol) junto con 5 nmol de TPA durante 20 semanas a las espaldas de los ratones. Disminuyendo el número de tumores de la piel del ratón en un 24 a 70 % y el volumen del tumor fue inhibido en un 42 a 74 %.

Wu et. al; en 2001, indujeron carcinogénesis química con 12-O tetradecanoilforbol-13-acetato e intentaron establecer si CAPE inhibía la promoción del tumor. Para ello, aplicaron tratamientos tópicos de CAPE en ratones a bajas dosis que inhibieron fuertemente el proceso oxidativo mediado por TPA que es considerado esencial para la promoción del tumor. A una concentración de 0.5 nmol de CAPE suprimió la explosión metabólica oxidativa de los leucocitos polimorfonucleares en un 50 %. A altas dosis, CAPE inhibió la actividad enzimática de ornitina descarboxilasa (ODC). Esto demostró que CAPE es un potente agente quimiopreventivo, pudiendo ser usado también en enfermedades que cursen con componentes de estrés oxidativo como varios tipos de cáncer.

Wang et. al; en 2005 reportan que el CAPE inhibió la proliferación en células HCT116 e indujo la interrupción del ciclo celular y apoptosis, usando concentraciones de CAPE de 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 mg/L. En el 2006 Hsing-Chun et. al; reportan que el CAPE posee un potencial antitumoral en células de glioma C6, el CAPE inhibió del crecimiento de estas células tumorales dosis y tiempo dependiente, aumento el porcentaje de células en fase G0/G1 y indujo una significativa disminución dosis dependiente en el crecimiento tumoral de xenoinjertos en ratones sin pelo.

Con el estudio de Saravana y Mahitosh en 2009, se concluyó que CA y su derivado CAPE: (1) inhibe la actividad enzimática de MMP-9 que juega un papel muy importante en la invasión de cáncer y metástasis, (2) bloqueando el potencial invasivo a través de la supresión de la transcripción de MMP-9 por inhibición de la función NF- κ B en PMA-simulado en células HepG2 y (3) supresión del crecimiento de células HepG2 y xenoinjertos en ratones sin pelo. Por tanto, estos dos compuestos fueron reportados como fuertes candidatos para el tratamiento de cáncer y metástasis vía mecanismo dual (inhibición de actividad enzimática específica de metástasis y transcripción).

El CAPE inhibe el crecimiento tumoral, tanto en células de adenocarcinoma colónico humano como en lesiones precancerosas inducidas en colon de rata, observándose que inhiben de forma significativa la incidencia y la multiplicidad, invasiva y no invasiva, de los adenocarcinomas de colon en la carcinogénesis inducida por azoximetano

subcutáneo en ratas macho. Los derivados de ácidos p-cumáricos actúan contra el hepatocarcinoma (Saiz et. al., 2006).

Las propiedades anticancerígenas del CAPE se han estudiado en el modelo de hepatocitos modificados resistentes. Administrando CAPE en varias dosis durante la promoción causó una disminución del 90 % en la estimulación de glutamiltranspeptidasa positiva GGT+ (marcador de laboratorio de enfermedad hepática) en focos en el día 25; disminuciones en marcadores de lesiones preneoplásicas, la actividad GGT, y la cantidad de proteína glutatión-S-transferasa clase Pi (GST-p) también fueron observados (Hsing-Chun, et. al; 2006)

Las isoformas CYP1A1/2 y CYP2B1/2 del citocromo P450 participan en el metabolismo de dietilnitrosamina (DEN), se ha demostrado que usando CAPE se reduce la actividad enzimática asociadas con las isoformas, por esa razón reduce la bioactivación de los agentes carcinógenos como benzo[a]pireno (Beltrán et. al., 2006).

El CAPE en por lo menos 3 modelos diferentes de carcinogénesis, ha demostrado que inhibe la inducción de tumores o neoplasias. Inhibe el cáncer de colon inducido por azoximetano, también reprime la inducción de tumores en la piel del ratón cuando el proceso cancerígeno se inicia por dimetilbenzo-(a)-antraceno, inhibe la formación del tumor intestinal en un 63 % en un modelo de ratones de la poliposis adenomatosa familiar que se manifiesta por la aparición de tumores intestinales en forma similar (Carrasco et. al., 2006).

6.4 Análogos estructurales del CAPE

A pesar de la gran variedad de actividades biológicas relacionadas con el CAPE, solo un limitado número de análogos estructurales han sido examinados, especialmente aquellos que implican modificaciones al anillo de catecol.

Estudios previos han reportado la síntesis e investigación de derivados del CAPE con anillo del catecol fluorado con respecto a la habilidad de citoprotección contra el estrés oxidativo *in vitro*. La citoprotección contra el estrés oxidativo por el CAPE y sus análogos ha sido relacionado por su habilidad de regular el aumento de la expresión de la hemo oxigenasa 1 (HMOX 1).

A pesar de la significativa demostración de la citoprotección contra el daño oxidativo *in vivo* e *in vitro*, se sabe que el CAPE se hidroliza fácilmente con el plasma. Estudios muestran que la actividad de la esterasa en la sangre y células es responsable de la rápida de gradación del CAPE.

Estudios farmacocinéticos mostraron utilizando un modelo de rata que el CAPE es eliminado rápidamente después de su aplicación intravenosa a las ratas (Gerónimo, 2011).

En estudios realizados de la actividad citoprotectiva de una serie de amidas derivadas del CAPE y análogos previamente reportados resulto que las amidas están generalmente asociadas con alta energía hidrolítica de activación en comparación con los ésteres debido a esto se sintetizó la Amida Fenólica del Ácido Caféico (CAPA por sus siglas en inglés) su estructura se observa en la figura 19 .

Se ha reportado su habilidad para actuar como un antioxidante contra la peroxidación lipídica así como un potencial agente antiinflamatorio a través de la inhibición de la 5-lipoxigenasa (Yang et. al; 2010).

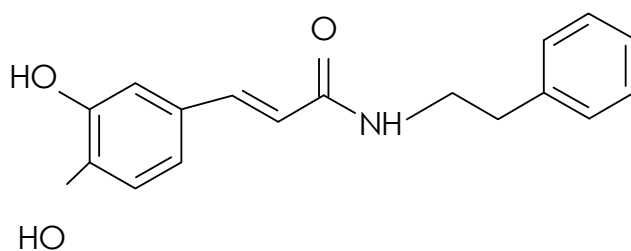


Figura 19. Amida fenólica del ácido caféico (Yang et. al; 2010).

En el 2010 Yang et. al; sintetizaron una serie de compuestos CAPA, los cuales se estudiaron para detectar la actividad citoprotectora contra el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en las células endoteliales del cordón umbilical humano (HUVEC). CAPA y tres análogos fluorados se encontraron que eran significativamente citoprotectores en comparación con el control positivo (CAPE).

Aunque el mecanismo de citoprotección para estas amidas no es bien conocido, la citoprotección se correlaciona con la presencia de grupos hidroxilos libres en el anillo de catecol en los análogos examinados. CAPA fue menos tóxico en HUVEC cuando fue comparados con CAPE, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en citoprotección entre los dos compuestos. Esto significa que CAPA conserva la actividad citoprotectora de CAPE, sin embargo es más estable en plasma.

En el 2004 en el Laboratorio de Química Medicinal de la FES-Cuautitlán se realizó un análisis de la molécula del CAPE y por diseño computarizado se obtuvo un grupo de derivados de éste, que hipotéticamente pueden tener la misma o mejor acción quimioprotectora. El N [2 clorobencil] cinamida (NA01) es uno de estos compuestos (figura 20). El estudio de este compuesto mediante SCGE demostró que el NA01 presenta ligera actividad genotóxica en cultivos de linfocitos humanos, sin embargo, este daño es mucho menor al que produce el MMS empleado como control positivo, por otra parte, en cuanto a la evaluación de la citotoxicidad, NA01 a dosis de 10 y 100 µg/mL no produjeron muerte celular mayor al 5 % (Paniagua, 2010).

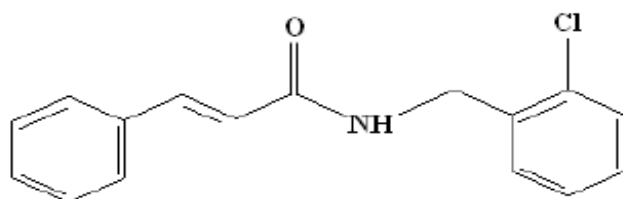


Figura 20. Estructura del derivado análogo del CAPE, NA01 (N-[2 clorobencil] cinamida), (Paniagua, 2010).

III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es una neoplasia común y letal, la cual representa la tercera causa de muerte por cáncer en hombres y la segunda en mujeres, diagnosticándose 1.2 millones de casos nuevos anualmente a nivel mundial y 608,700 muertes estimadas anualmente.

Los modelos animales aportan, medios adicionales para investigar algunas de las características biológicas de algunos tipos de cáncer como en el caso del CCR, estos modelos son una herramienta esencial en pruebas preclínicas que evalúan nuevas terapias *in vivo*.

Diversas evidencias experimentales sugieren que la carcinogénesis incluye una serie de cambios secuenciales celulares con diferentes propiedades biológicas, bioquímicas y morfológicas respecto a las células normales.

La carcinogénesis experimental usando 2,4-Dinitrofenilhidracina, es un modelo establecido que muestra paralelismos con la carcinogénesis colónica humana ya que permite observar los primeros cambios en el intestino grueso, que en este caso son los focos de criptas aberrantes (FCA), éstas constituyen lesiones caracterizadas por criptas morfológicamente anormales en la superficie de la mucosa colónica y desde su primera descripción en ratas, ha habido varias líneas de evidencia que sugieren que los FCA podrían constituir un precursor del CCR.

En el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán se ha diseñado computacionalmente y sintetizado una serie de compuestos análogos del CAPE, denominados compuestos CAPA, dichos compuestos muestran mejoras respecto a los costos ya que estos son menores y a la síntesis ya que resulta más rápida y todo esto manteniendo e incluso mejorando las propiedades farmacológicas de la molécula base.

Es por esta razón que se ha planteado estudiar sí el compuesto CAPA LQM 731 es capaz de inhibir lesiones preneoplásicas inducidas en colon de ratón de la cepa CD1 con 2,4-Dinitrofelhidrazina y así poder proponer dicho compuesto como agente quimiopreventivo del CCR.

IV. O B J E T I V O S

4.1 Objetivo general.

Evaluar la inhibición de lesiones preneoplásicas en colon de ratón CD1, mediante el uso del compuesto LQM 731, un derivado del CAPE y demostrar la capacidad anticarcinogénica de dicho compuesto.

4.2 Objetivos particulares.

1) Inducir en ratones CD1 la formación de lesiones precancerosas en colon, administrando bajo un esquema periódico, 2,4- Dinitrofenilhidrazina vía intraperitoneal.

2) Evaluar la formación de lesiones preneoplásicas en colon de ratones administrados con 2,4- Dinitrofenilhidrazina por vía intraperitoneal, examinando microscópicamente la aparición de focos de criptas aberrantes (FCA) mediante la tinción con azul de metileno.

3) Determinar la capacidad del compuesto LQM 731 a concentraciones de 20 y 40 mg/Kg, para revertir la aparición de FCA, en ratones con lesiones precancerosas.

V. M A T E R I A L E S

5.1 COMPUESTO DE PRUEBA.

* Compuesto CAPA LQM 731, sintetizado en el Laboratorio de Química Medicinal de la FESC Campo 1, por el Dr. Enrique Ángeles Anguiano.

5.2 MATERIAL BIOLÓGICO.

*40 Ratones jóvenes CD1 (Hembras 20-25 g), provenientes del Bioterio de la Escuela Superior de Medicina del IPN a cargo de M. en C. María Eugenia Aguilar Nájera.

5.3 EQUIPOS Y MATERIALES

* Cajas de policarbonato para animales con rejilla de acero inoxidable.

* Bebederos para roedor.

* Cama sanitaria estéril.

* Alimento para roedor (Nutricubos).

* Jeringas 1 mL.

* Microscopio óptico

* Agujas 16 mm x 25 g.

* Estuche de disección.

* Guantes.

* Cubrebocas.

* Cajas petri.

* Vasos de precipitados.

* Cubreobjetos 26 x 76 mm.

5.4 REACTIVOS.

* 2,4-Dinitrofenilhidrazina 400 mg/100 mL.

* PBS/Formaldehído 10 %.

* Solución Salina Fisiológica NaCl 0.9 %.

* Azul de metileno/Alcohol etílico 2:1.

*Aceite de maíz (SIGMA).

VI. M É T O D O S

6.1 Inducción de lesiones precancerosas.

Distribuir a los 40 ratones en 8 lotes de 5 animales cada uno, de la siguiente manera: lote 1 control positivo de inducción de lesiones preneoplásicas, usando el siguiente modelo: administrar por vía intraperitoneal 2,4-Dinitrofenilhidrazina con una dosis de 10 mg/Kg en un periodo de 4 días de inducción, descansar 3 días y nuevamente 4 días de inducción así hasta completar 28 días (figura 21), los lotes 2, 3, 4 y 5 también se administran para causar las lesiones preneoplásicas.

Al lote 5 administrar 2,4-Dinitrofenilhidrazina siguiendo el mismo modelo, pero en este caso hasta completar 56 días, esto para observar si después de causar las lesiones es posible que exista metástasis a otros órganos.

6.2 Administración del compuesto LQM 731.

Administrar a los lotes 2 y 3 vía oral una emulsión del compuesto LQM 731 en aceite de maíz, a una dosis de 20 y 40 mg/Kg respectivamente, hacer 2 administraciones con una semana de separación.

El lote 4 es el testigo de que el aceite de maíz no tiene influencia en la reducción de las lesiones precancerosas, por lo que este lote se le debe administrar aceite de maíz, vía oral, 2 administraciones de 0.9 mL con una semana de separación.

Los lotes 6, 7 y 8 no son inducidos con 2,4-Dinitrofenilhidrazina. A los lotes 6 y 7 administrar solo el compuesto LQM 731 en aceite de maíz con una dosis de 20 y 40 mg/Kg respectivamente por vía oral, las 2 administraciones con 1 semana de separación esto para demostrar que el compuesto LQM 731 no tiene algún efecto sobre el intestino grueso cuando este es administrado sin haber inducido las lesiones preneoplásicas.

El lote 8 es un control negativo, se mantiene sin administrar ningún compuesto pero viviendo en las mismas condiciones que los demás ratones.

6.3 Obtención, lavado y tinción de colon.

Transcurrido el tiempo para cada tratamiento se deben sacrificar a los ratones de cada lote por dislocación cervical, extraer el intestino grueso y obtener una porción de éste, enjuagar con solución salina fisiológica al 0.9 % hasta que el tejido esté limpio, después fijar con PBS/formaldehído 10 %, para después teñir con azul de metileno por 5 min, enjuagar con agua destilada y observar al microscopio a 10 X, evaluar 50 campos por lote, es decir, 10 campos por ratón.

6.4 Análisis estadístico.

Realizar un análisis estadístico de los datos obtenidos empleando el programa *Statgraphics*®, usando las pruebas de ANOVA y *Tuckey-Kramer* para determinar las diferencias estadísticas entre los lotes.

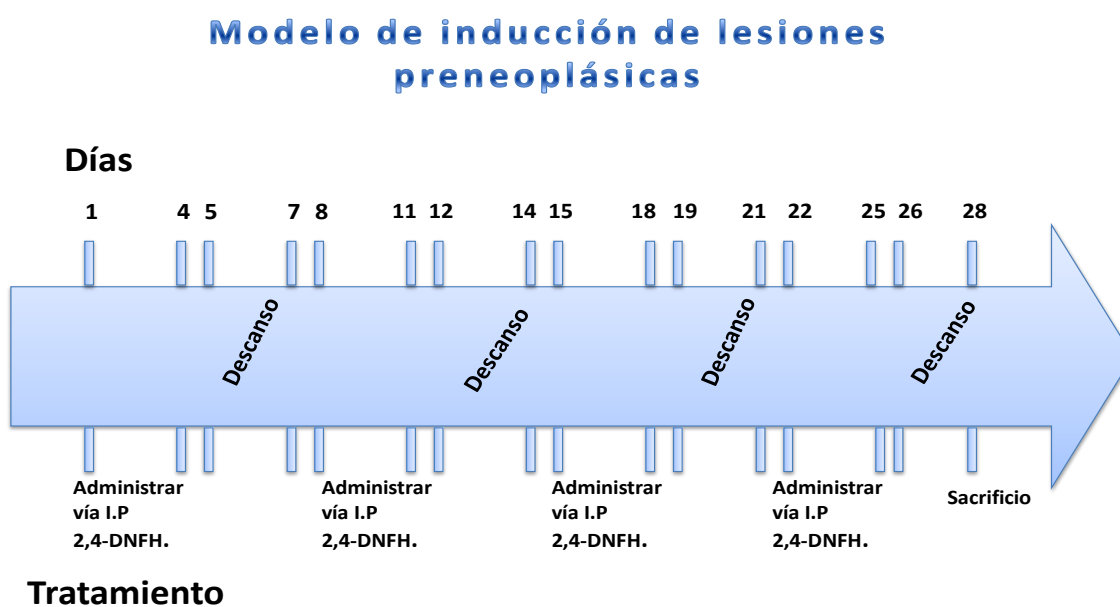
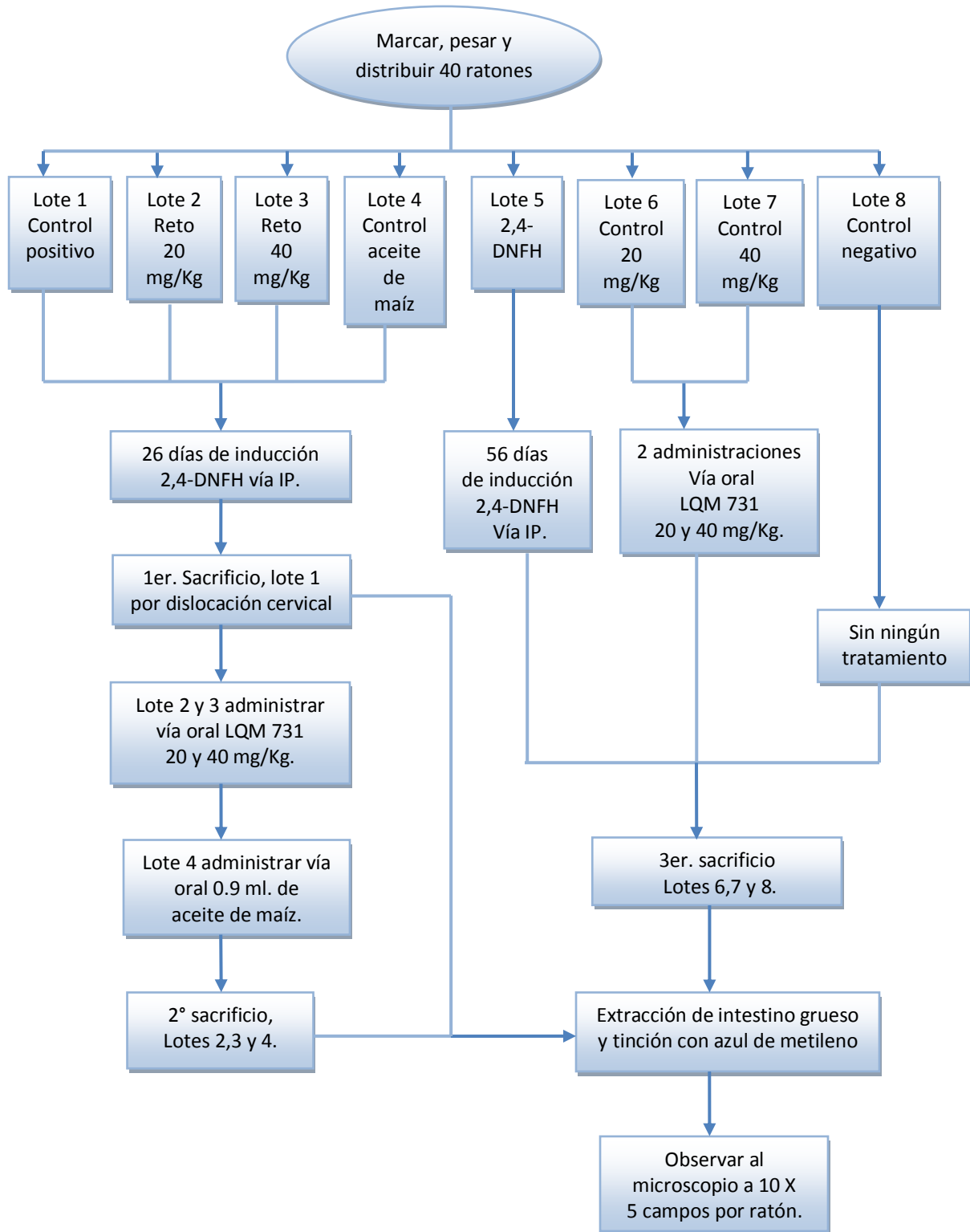


Figura 21. Esquema de inducción de lesiones precancerosas.

VII. DIAGRAMA EXPERIMENTAL



VIII. RESULTADOS

8.1 Focos de criptas aberrantes.

En la tabla 5 y en la figura 23 se muestra la cantidad de FCA en cada lote, ya que éste es el principal indicativo de presencia de lesiones preneoplásicas.

Tabla 5. Número de campos donde se observa FCA al revisar 10 campos por cada ratón, al microscopio a 10 X intestino grueso con una tinción de azul de metileno.

Lote	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4	Ratón 5	Total de campos
Control positivo (2,4-DNFH, 26 días)	10	8	8	9	7	42
2,4-DNFH + LQM 731 (20 mg/Kg)	0	0	0	0	0	0
2,4-DNFH + LQM 731 (40 mg/Kg)	4	3	5	2	3	17
2,4-DNFH + Aceite de maíz	10	7	8	7	8	40
2,4-DNFH (56 días)	9	10	10	9	8	46
LQM 731 (20 mg/Kg)	0	0	0	0	0	0
LQM 731 (40 mg/Kg)	0	0	0	0	0	0
Control negativo	0	0	0	0	0	0

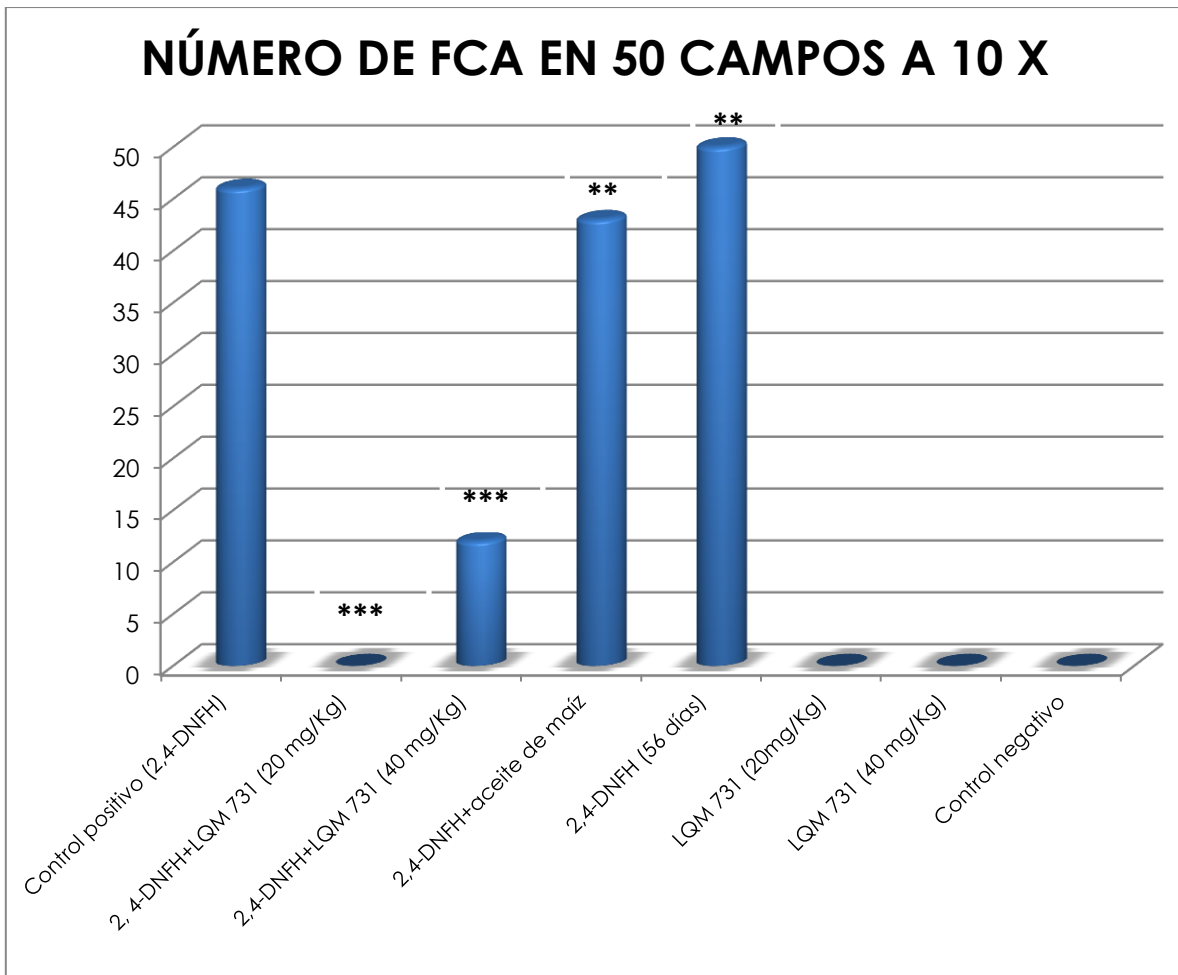


Figura 22. Número de FCA, al ser observados microscópicamente con una tinción de azul de metileno. *** Diferencias consideradas altamente significativas con respecto al control positivo (ANOVA, Tuckey-Kramer $P < 0.001$). ** Diferencias consideradas sin diferencia significativa en comparación con el control positivo ANOVA, Tuckey-Kramer $P < 0.001$).

8.2 TINCIÓN, RUPTURAS Y PÓLIPOS

En la tabla 6 y en las figuras 24 y 25 se presentan la comparación de tinción, presencia de rupturas y pólipos que también son indicativos de daño en el tejido.

Tabla 6. Resultados de la observación de intestino grueso teñido con azul de metileno observado al microscopio a 10 X.

	TINCIÓN	RUPTURAS	PÓLIPO
Control positivo 2,4-DNFH (28 días)	3	10	Sí
2,4-DNFH + LQM 731 (20 mg/Kg)	2	0	No
2,4-DNFH + LQM 731 (40 mg/Kg)	2	5	No
2,4-DNFH + aceite de maíz	3	10	Sí
2,4-DNFH (56 días)	3	10	Sí
LQM 731 (20 mg/Kg)	2	0	No
LQM 731 (40 mg/Kg)	2	0	No
Control negativo	2	0	No

Tinción: 3 excesiva, 2 normal, 1 baja.

Rupturas: 10 muchas, 5 pocas, 0 nulas.

Pólipo: sí, no.

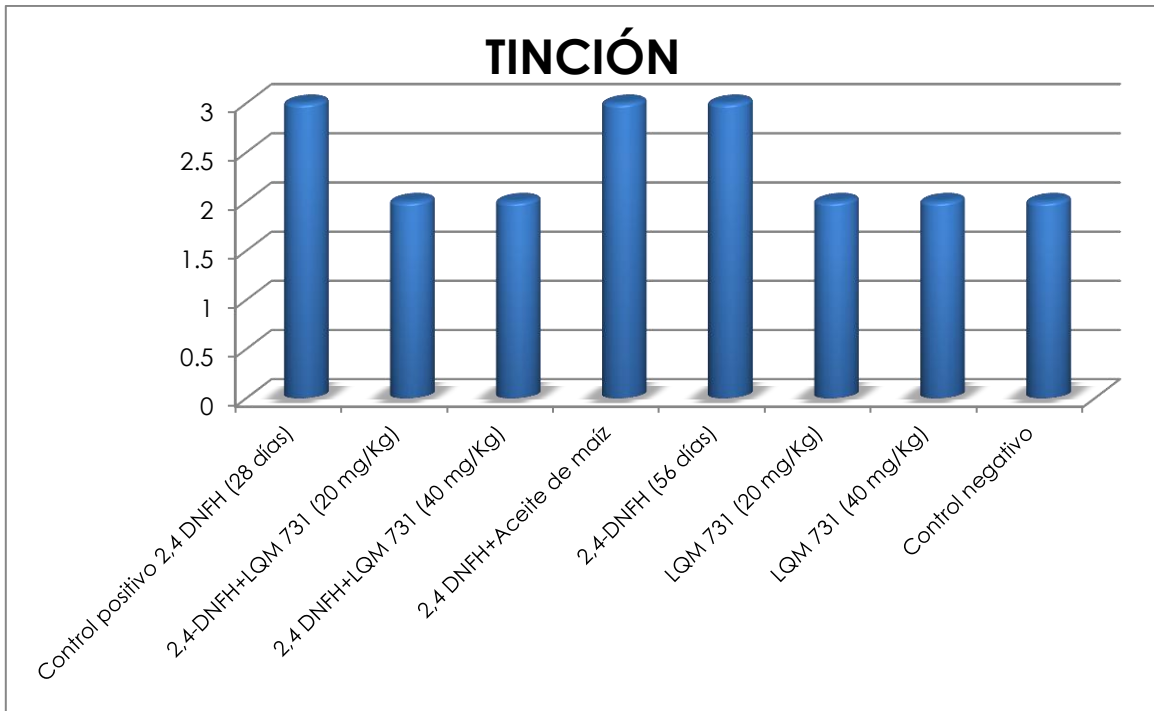


Figura 23. Representación del grado de tinción del intestino grueso, teñido con azul de metileno, tinción: 3 excesiva, 2 normal, 1 baja.

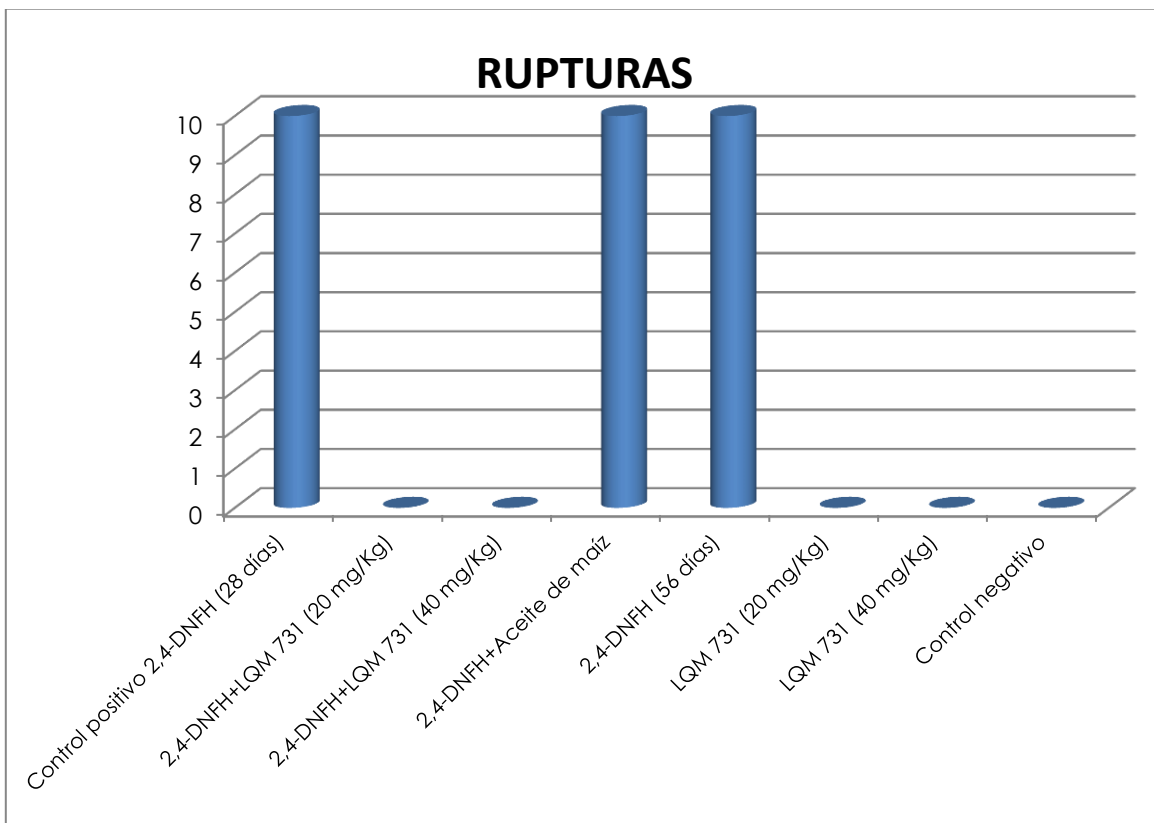


Figura 24. Representación del grado de ruptura en el tejido.

IX. RESULTADOS: IMÁGENES

9.1 Lote: control positivo 2,4-DNFH (26 Días).

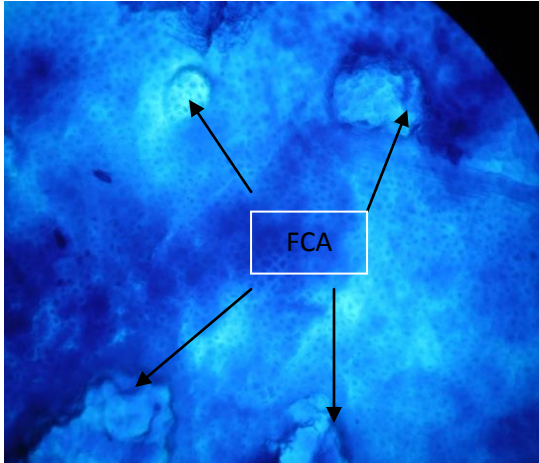


Figura 25.

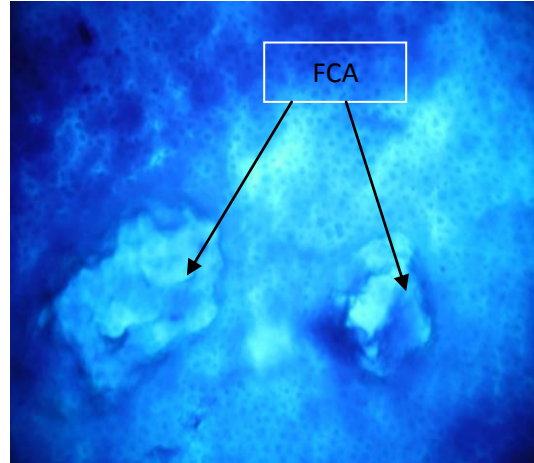


Figura 26.

En este lote se observa el tejido irregular es decir las vellosidades no se encuentran continuas a lo largo del tejido. En la mayoría de los campos como se puede observar en la figura 25 y 26, hay presencia de FCA. Además se aprecia una fuerte tinción con el azul de metileno en ciertas partes del tejido.

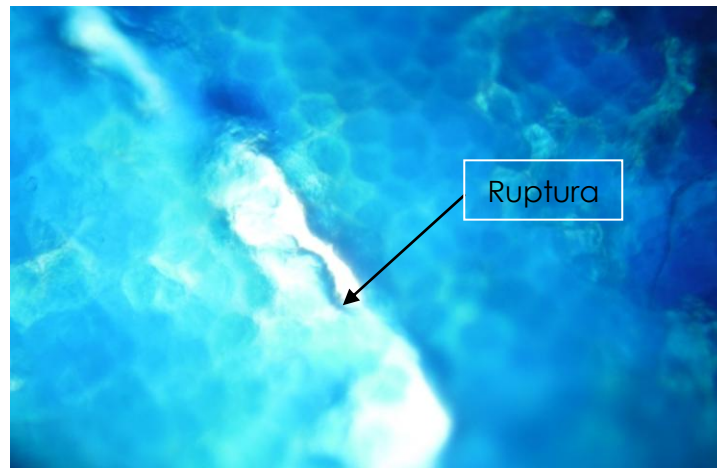


Figura 27.

También se puede apreciar que el tejido tiende a presentar rupturas (Figura 27) dado que se vuelve frágil después del tratamiento con la 2,4-DNFH.

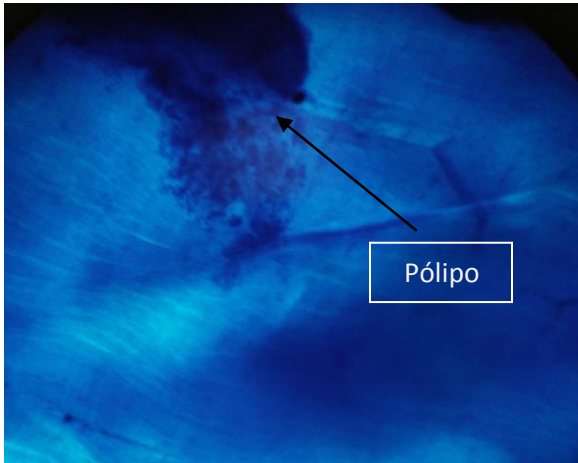


Figura 28.

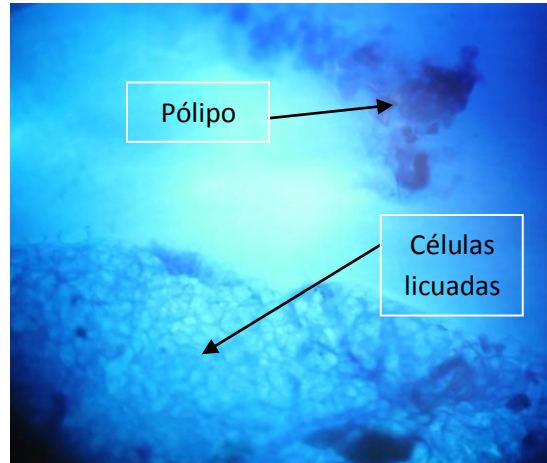


Figura 29.

En estas imágenes se puede apreciar cómo el tejido es irregular, además en la figura 28 se observan pólipos, que son reconocidos principalmente por teñirse fuertemente en comparación con resto del tejido.

También en algunas muestras de tejido, se presentaban una gran cantidad de FCA, que se unían formando una masa que abarcaba gran parte del tejido, así mismo se observaban partes con células licuadas (figura 29).

9.2 Lote: control negativo

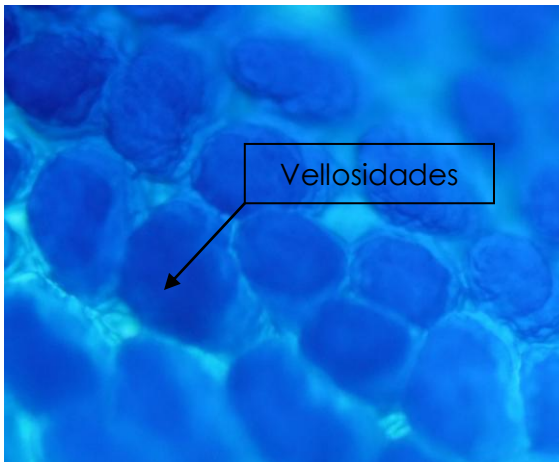


Figura 30.

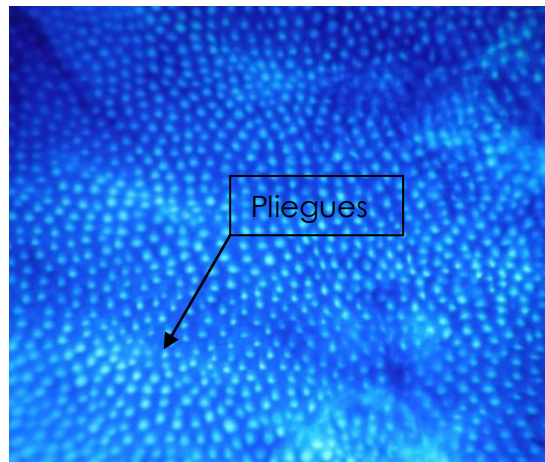


Figura 31.

En las imágenes 30 y 31 se pueden observar las características morfológicas normales del intestino grueso, como son las vellosidades, que en este caso se observan continuas y enteras a lo largo de todo el tejido.

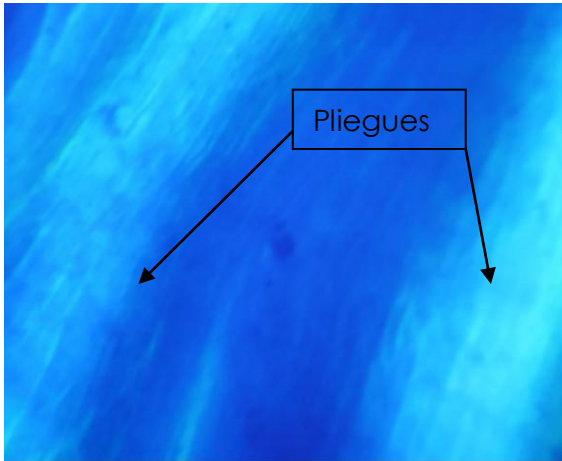


Figura 32.



Figura 33.

En las imágenes de la figura 32 y 33, no se aprecia ningún daño, es un tejido continuo, liso, que se tiñe uniformemente. No se observan rupturas a pesar de la manipulación, esto refleja el buen estado del tejido. Se distinguen los pliegues normales del tejido.

9.3 Lote: 2, 4-DNFH + LQM 731 (20 mg/Kg).

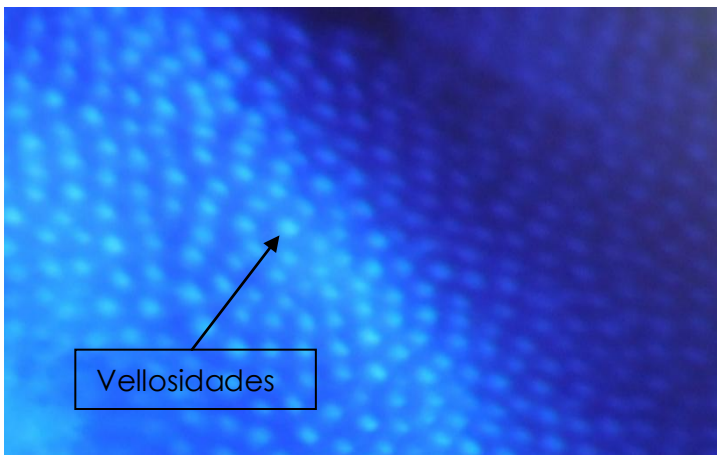


Figura 34.

En este lote se puede observar una gran mejoría en el tejido.

Con vellosidades continuas a lo largo de todo el tejido (figura 34), además de una tinción homogénea.



Figura 35.

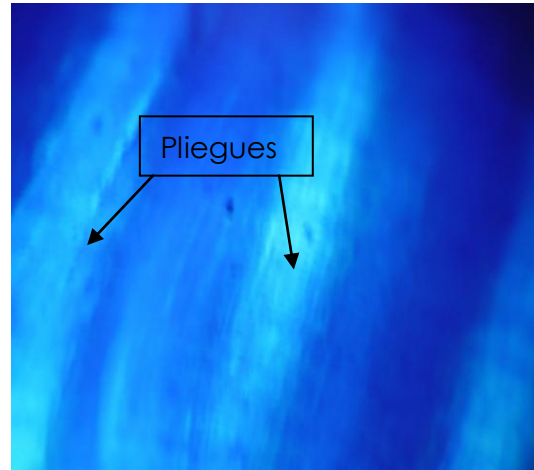


Figura 36.

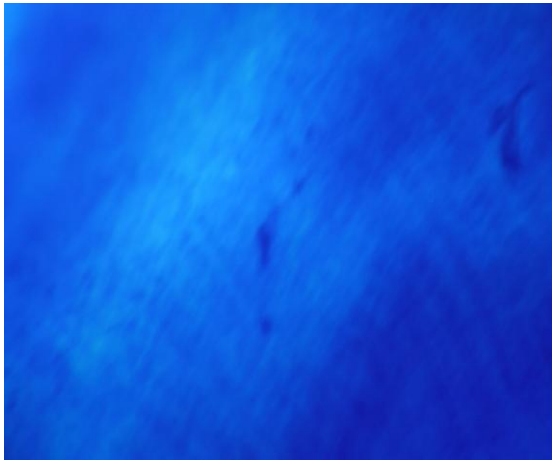


Figura 37.

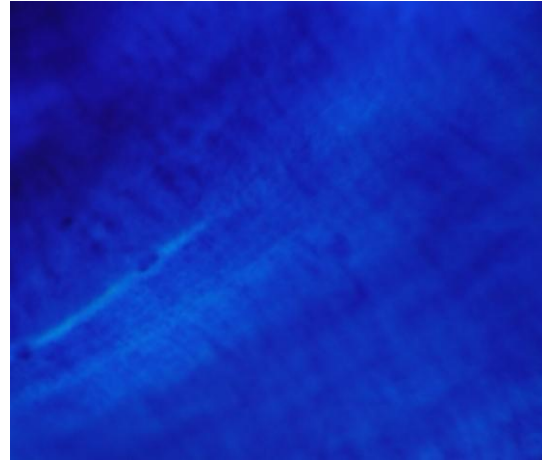


Figura 38.

En todo el lote se pudo observar cómo el tejido recuperaba sus características normales. En las figuras 35, 36, 37 y 38 se observa el tejido teñido uniformemente, sin presencia de pólipos, FCA, ni rupturas, además muestra pliegues normales.

9.4 Lote: 2, 4-DNFH + LQM 731 (40 mg/Kg).

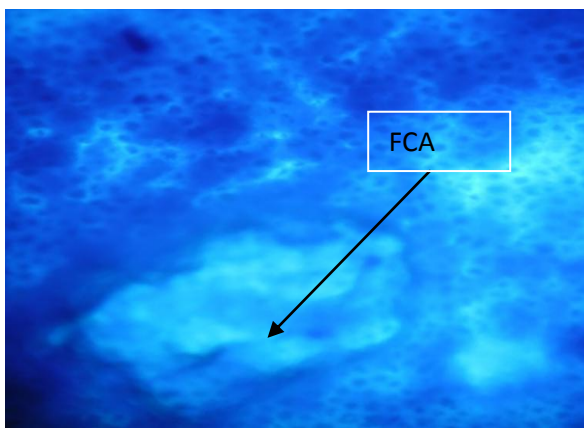


Figura 39.

Como lo muestra la figura 39 en este lote se observan FCA pero en menor proporción comparada con el lote control positivo.

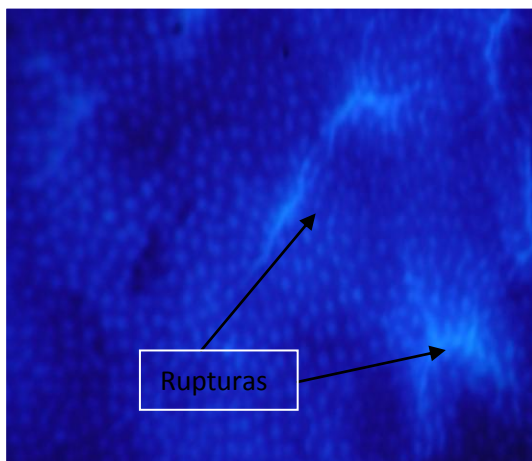


Figura 40.

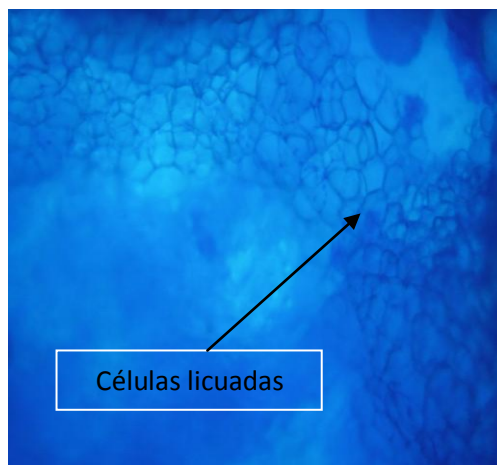


Figura 41.

En este lote, como se puede apreciar en la figura 40 el tejido presenta rupturas, pero éstas no son tan severas como las del lote control positivo, se observa mejoría en el tejido ya que se ve continuo.

También se observan zonas con células licuadas, esto nos indica la presencia de cierto daño en el tejido, pero no tan severo (figura 41).

9.5 Lote: 2,4-DNFH + Aceite de maíz

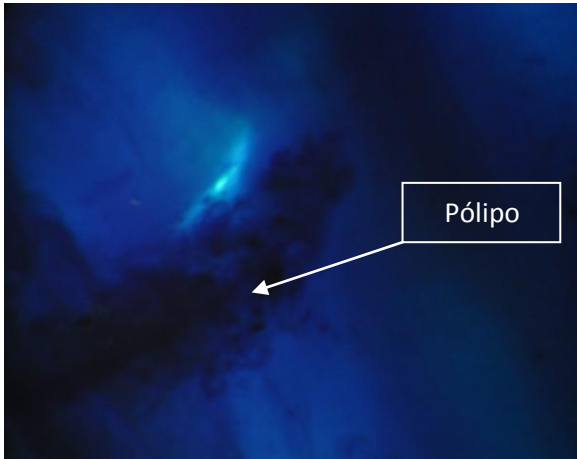


Figura 42

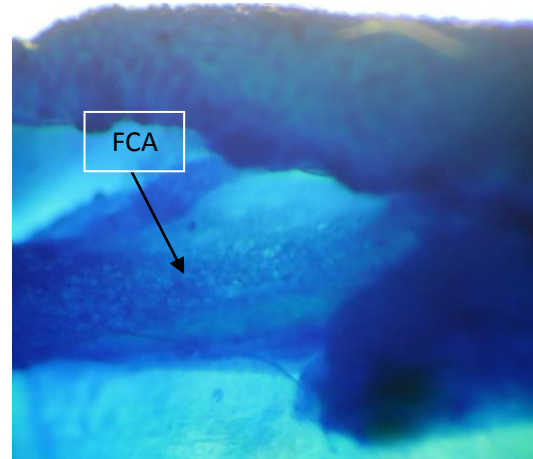


Figura 43

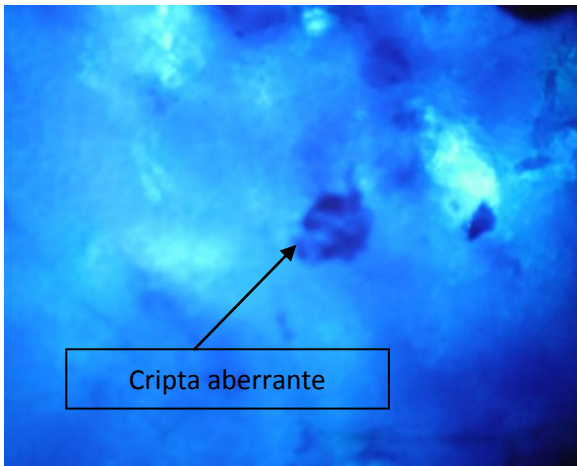


Figura 44.

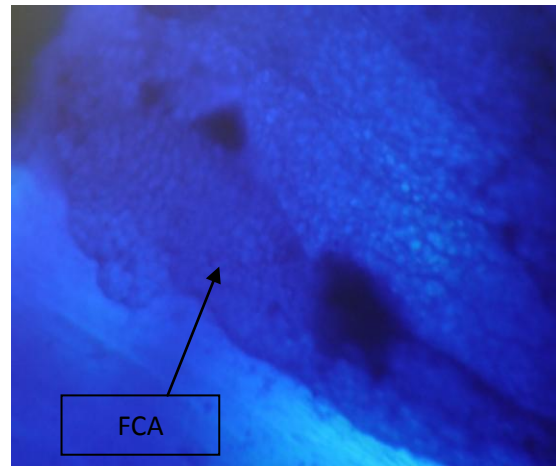


Figura 45.

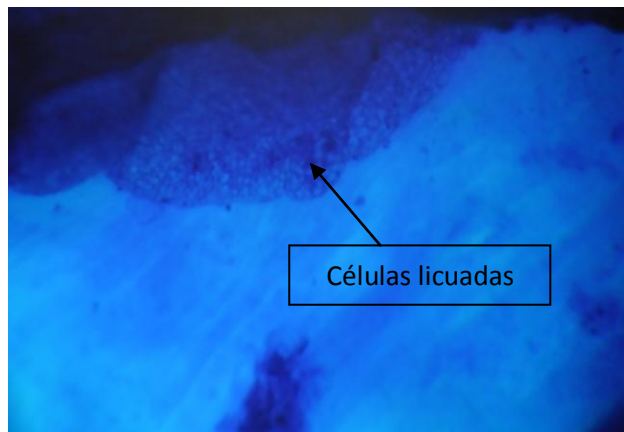


Figura 46.

En este lote, tratado con aceite de maíz, no se observa una mejoría en el tejido, se observan criptas aberrantes (figura 44), y en algunos casos el daño es tan severo que los FCA se unen unos con otros formando masas de tejido que se reconocen fácilmente (figura 43 y 45).

Así mismo se incrementa la cantidad de pólipos (figura 42).

9.6 Lote: 2,4-DNFH (56 días)

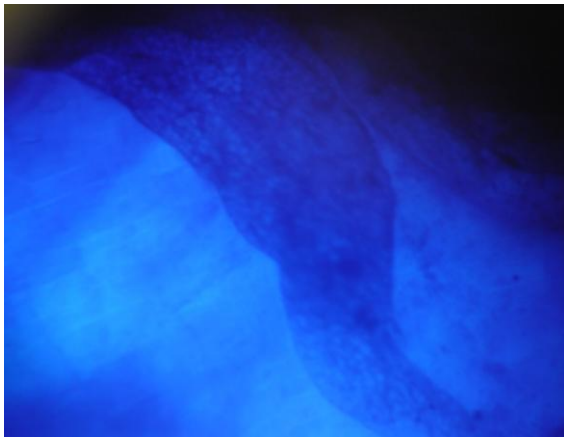


Figura 47.

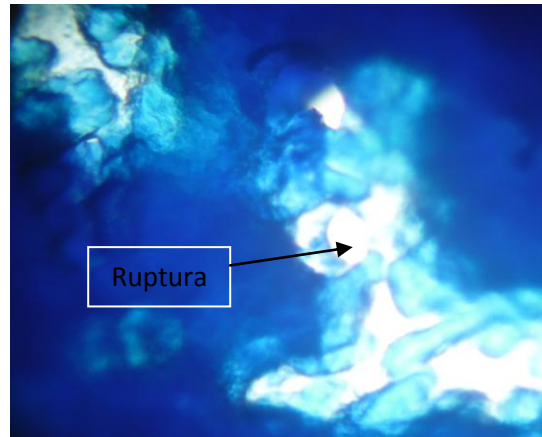


Figura 48.



Figura 49.

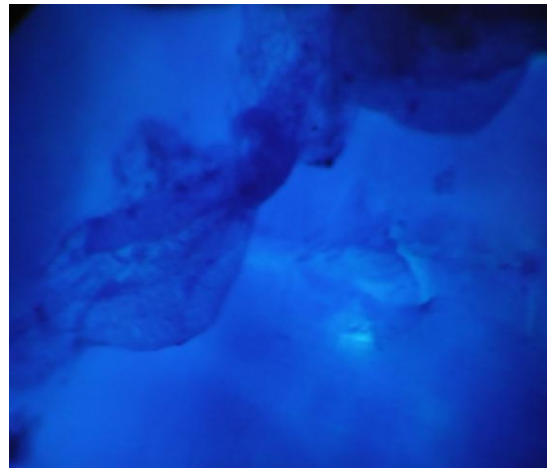


Figura 50.

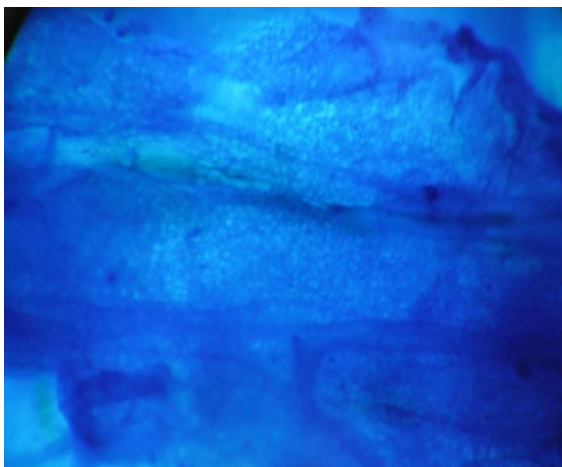


Figura 51.

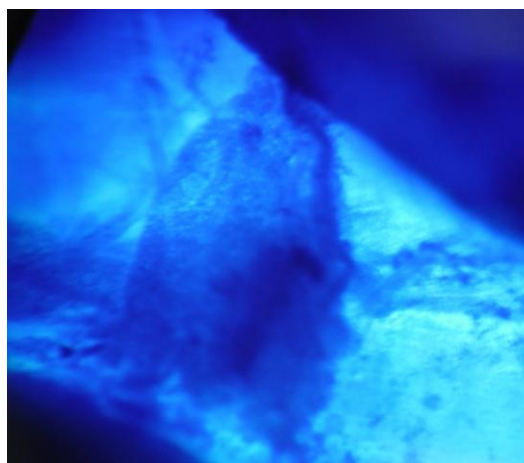


Figura 52.

Este lote, que recibió el tratamiento al doble de tiempo con la 2,4-DNFH, presentó un daño severo, los FCA están en gran cantidad y forman masas que abarcan todo el tejido, dichas masas se tiñen con mayor intensidad, en comparación con el resto del tejido (figura 47, 48, 49, 50, 51 y 52).

Todo el intestino grueso ha perdido ya su morfología normal, las vellosidades han perdido completamente el orden.

Se presentan gran cantidad de rupturas y de pólipos. Este tejido es difícil de manipular ya que su consistencia es muy suave (figura 48).

9.7 Lote: LQM 731 (20 mg/Kg)

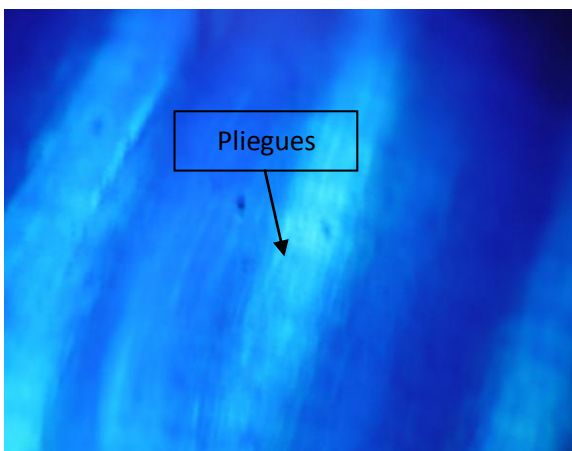


Figura 53.

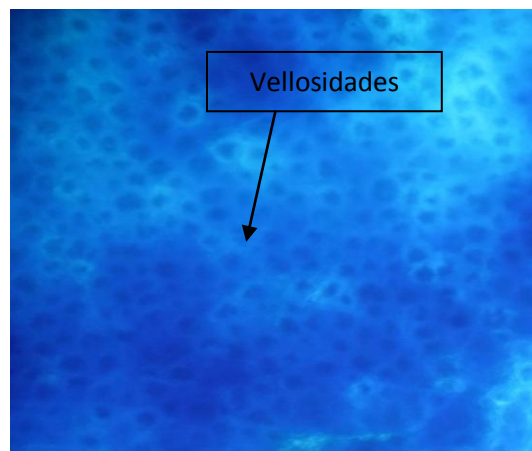


Figura 54.

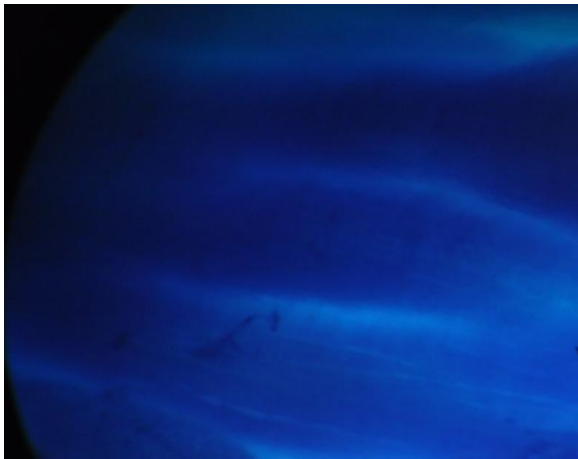


Figura 55.



Figura 56.

Estas imágenes permiten ver que a esta dosis el LQM 731 no tiene ningún efecto en el tejido, ya que éste muestra las características normales. Se observa lo mismo que en el lote control negativo como son, pliegues normales (figura 53), el tejido liso intacto (figura 55 y 56), las vellosidades ordenadas (figura 54), sin presencia de pólipos ni rupturas y tinción uniforme.

9.8 Lote: LQM 731 (40 mg/Kg).

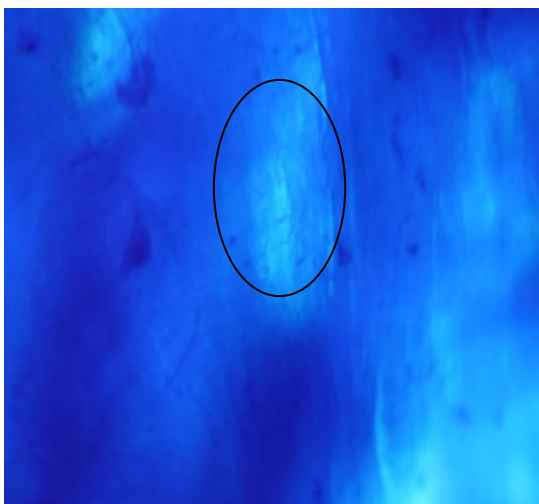


Figura 57.

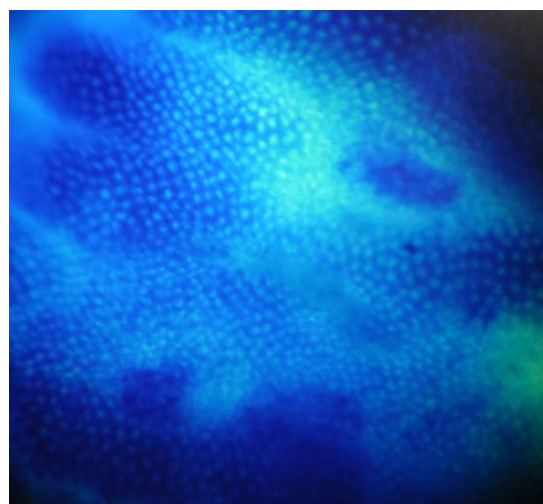


Figura 58.



Figura 59.

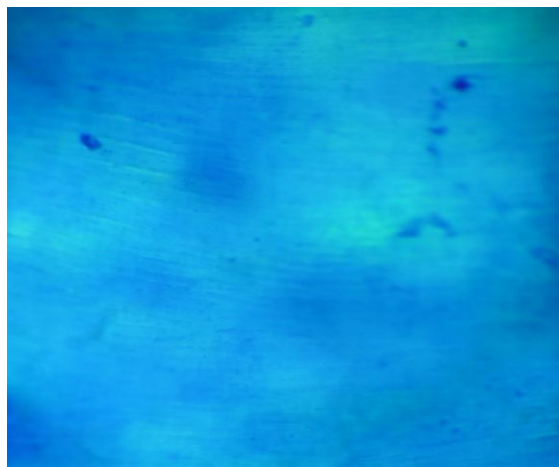


Figura 60.

En este lote se observaron ciertos cambios en la morfología normal del tejido, en las figuras 57 y 59 en la zona señalada parece presentar inflamación, pero en realidad no se hicieron las pruebas necesarios para poder asegurar este dato, solo en 3 animales del lote se observaron dichos cambios, en el resto de los animales se presentaba morfología normal.

X. DISCUSIÓN

El cáncer colorrectal constituye una de las neoplasias más diagnosticadas en los países occidentales. En nuestro país, su incidencia es de 31 casos por cada 100,000 hombres y 21 por cada 100,000 mujeres, lo cual hace que sea considerada la segunda neoplasia más común en ambos sexos.

La participación específica de los factores ambientales en la aparición del cáncer colorrectal no está bien definida aún. En sentido general, numerosos estudios señalan la intervención de diversos factores dietéticos, especialmente grasas de origen animal y alcohol.

El estudio sobre los compuestos CAPA, que son análogos amídicos del CAPE es reciente y son pocos los autores que han hecho estudios sobre estas modificaciones, tal es el caso del Dr. Yang, el grupo de investigación del Dr. Saúl Villa Treviño y el grupo de investigación del Dr. Enrique Ángeles Anguiano.

El compuesto LQM 731 es un análogo amídico halogenado del CAPE al que se le han retirado los sustituyentes hidroxilo del anillo del catecol, su fórmula condensada es $C_6H_{12}ONCl_4$, presenta un peso molecular de 375.08 gr/mol (datos no publicados, Dr. Enrique Ángeles Anguiano) y cuya estructura ha sido definida por los métodos espectroscópicos adecuados pero debido al proceso de patente no se ha mostrado en este trabajo.

Es de suma importancia que este compuesto, al ser de reciente síntesis, cuente con estudios sobre genotoxicidad, ya que éste es un parámetro muy importante con el que se debe cumplir, sí es que pretende perfilar como nuevo fármaco y claro, evaluar su capacidad anticarcinogénica.

La importancia de los modelos de inducción de lesiones preneoplásicas radica en encontrar la elaboración de tratamientos preventivos y terapéuticos que permiten detener el desarrollo o ayudar a los procesos de recuperación en el cáncer, para poder ofrecer una mejor calidad de vida a los pacientes.

Zamorano *et. al.* y Piñols realizaron estudios *in vivo* de inducción de CCR en roedores con AOM y 1,2-DMH respectivamente, para medir el daño ocasionado por estas sustancias, el parámetro utilizado fueron los FCA, ya que son considerados como lesiones preneoplásicas en ratones y en seres humanos, corresponden con lo que patólogos han diagnosticado preferentemente como hiperplasia focal y existe suficiente evidencia que sugieren que los FCA son

precursores del CCR. Zamorano *et. al* las cuantifica mediante la tinción con azul de metileno.

Los FCA son lesiones hiperproliferativas encontradas en el colon de animales tratados previamente con algún carcinógeno como el azoximetano, la dimetilhidrazina, el dimetilbenzoantraceno y la N-metil-N-nitrosourea (Bird, 1987). De tal manera que los FCA se han propuesto como lesiones precancerosas caracterizadas por el incremento en el diámetro con algunas irregularidades y tortuosidades con ocasionales evaginaciones de la capa epitelial de la mitad superior de la cripta (Bird, 1995).

En contraste, la disminución de FCA en los animales tratados con algún carcinógeno previamente, se ha empleado para identificar y evaluar compuestos con actividad anticarcinogénica.

En 2011, Del Monte y Sánchez establecieron un modelo de inducción de lesiones precancerosas con 2,4-DNHF a una concentración de 10 mg/Kg, que consistía en administrar a ratones de la cepa Balb-C, vía intraperitoneal de manera periódica con 4 días de inducción y 3 días de descanso, así hasta completar 15 días.

En este trabajo se utilizó el mismo compuesto a la misma concentración pero se le hicieron modificaciones al modelo, ya que en este caso se trabajó con ratones de la cepa CD1, además que se pretendía que la cantidad de FCA observadas fuera significativa, de esta manera el modelo quedó de la siguiente manera: se administró por vía intraperitoneal 2,4-DNFH a una dosis de 10 mg/Kg en un periodo de 4 días de inducción, 3 días de descanso y nuevamente 4 días de inducción así hasta completar 28 días.

Al momento del sacrificio se evaluó si realmente estaban presentes las lesiones precancerosas al teñir el intestino grueso con azul de metileno y observarlo al microscopio, el parámetro utilizado para decidir si el modelo animal muestra los signos previos al cáncer de colon fue la presencia de FCA (figuras 25 y 26) , este fenómeno representa la etapa más temprana del proceso neoplásico que precede a la aparición de los FCA y finalmente se presenta la formación de pólipos, esto en base a la secuencia adenoma-carcinoma, por ello, estas lesiones son precursoras del CCR.

Una vez que se aseguró que las lesiones preneoplásicas estaban presentes en el intestino grueso se llevó a cabo el reto de evaluar la capacidad anticarcinogénica del compuesto LQM 731 a dos dosis, 20 y 40 mg/Kg con los resultados: en el lote 2 en el que se probó la dosis de 20 mg/Kg, al observar el tejido, se aprecia las características morfológicas normales del intestino grueso, es decir, las lesiones preneoplásicas fueron revertidas totalmente, el tejido

presentaba sus vellosidades intactas, pliegues normales, no había acumulación de células y tampoco inflamación (figuras 34, 35, 36, 37 y 38).

En el lote 3 donde se evaluó la dosis de 40 mg/Kg, se pudo observar que sí hubo reversión del daño, pero en algunos animales aún había presencia de FCA e incluso presencia de pólipos, así como inflamación (figuras 39, 40 y 41), estos datos se discutirán más adelante ya que en el lote 7 también se trabajó a esta concentración del compuesto LQM 731.

Al comparar estadísticamente ($P < 0.001$) estos dos lotes con el control positivo, se puede decir que si existe diferencia significativa entre los lotes y el control positivo, en el caso de la dosis 20 mg/Kg, hay mayor diferencia con el lote control positivo, esto aunado a lo que se observó microscópicamente, se puede decir que el compuesto LQM 731 a una dosis de 20 mg/Kg presenta propiedades anticarcinogénicas.

En el lote 4 en el que se administró aceite de maíz, después de inducir las lesiones precancerosas, se observaron microscópicamente las mismas características que en el control positivo, se observó presencia de FCA, pólipos y rupturas (figuras 42, 43, 44, 45 y 46).

La estadística muestra ($P < 0.001$) que los lotes control positivo y el lote 4, no presentan diferencia significativa, por lo que se asegura que el aceite de maíz no tiene potencial anticarcinogénico, con esto se demuestra que el vehículo en el que se administra el compuesto LQM 731, no interfiere con los resultados.

Se eligió al aceite de maíz como vehículo ya que, el compuesto LQM 731 no es soluble en agua y al ponerlo con el aceite de maíz solo bastan 30 minutos de sonicación para obtener una emulsión, además no existe evidencia que el aceite de maíz presente capacidad anticarcinogénica.

En el lote 5 se utilizó un tiempo de administración más largo de 2,4-DNFH, hasta completar 56 días siguiendo el mismo modelo que en el control positivo, esto para observar sí después de causar las lesiones es posible que exista metástasis a otros órganos. Al observar microscópicamente este lote se observa un daño severo en todo el tejido ya que se perdieron completamente las características morfológicas, se observan protuberancias, rupturas y ya no se observan definidas las vellosidades (figuras 47, 48, 49 y 50). Sin embargo, en este trabajo no se evaluó si existía metástasis hacía otros órganos, ya que este es objetivo de otro trabajo de investigación.

Al revisar el lote control negativo microscópicamente, se observan las características morfológicas normales del intestino grueso, es decir, las vellosidades se observan continuas y enteras a lo largo de todo el tejido, es un

tejido continuo, liso, que se tiñe uniformemente. No se observan rupturas a pesar de la manipulación, esto refleja el buen estado del tejido. Se distinguen los pliegues normales del tejido (figuras 30, 31, 32 y 33).

Si comparamos al lote control positivo con el lote control negativo la diferencia entre éstos es muy evidente, ya que el lote negativo no presenta ninguna alteración morfológica en el tejido, no así el lote positivo que muestra severos daños en toda la estructura. Otro punto importante en la comparación es el grado de tinción, en el caso del lote inducido con 2,4-DNFH es más intensa, esto se debe a que el colorante utilizado que es el azul de metileno es una sal básica, que tiene afinidad por las sustancias ácidas, tomando en cuenta que el pH normal del intestino grueso es de 8, siendo éste un pH básico, esto nos podría indicar que las estructuras sufrieron una modificación, de tal forma que presentan un medio ácido, y esto es lo que provoque que el colorante sea más afín al tejido y por esta razón se tiña más fuertemente, esto provocado por el agente inductor que es la 2,4-DNFH.

La formación de las lesiones preneoplásicas, como es la aparición excesiva de FCA es debido a las mutaciones en los genes K-ras, APC y p53.

Los FCA posteriormente evolucionan en adenomas y pólipos que son una tumoración o protuberancia circunscrita visible macroscópicamente, estas lesiones se proyectaron en la superficie de la mucosa del lote control positivo.

La mutación del gen K-ras es predominante en el momento en que los FCA llegan a ser adenomas, la mutación en el gen APC es frecuente en pólipos y respecto a las mutaciones en el gen p-53 se piensa que es un evento tardío en el proceso de carcinogénesis.

Las alteraciones en estos genes nos llevan al aumento de la beta-catenina en su expresión citoplasmática, es un evento precoz en la génesis tumoral y que su posterior aumento en el ámbito nuclear marca la conversión de adenoma a carcinoma (Zamorano et. al., 2008)

En el lote 6, donde se administró LQM 731 a una dosis de 20 mg/Kg, al revisarse microscópicamente no presentó ninguna alteración morfológica (figuras 53, 54, 55 y 56), al compararse con el control negativo se puede observar que no existe diferencia, esto indica que a esta dosis el compuesto CAPA LQM 731, no es tóxico junto con esta evidencia y la del lote 2 donde a esta misma dosis fue capaz de revertir la presencia de lesiones preneoplásicas se puede decir que ésta es la dosis efectiva en la que el compuesto muestra su capacidad anticarcinogénica.

En el lote 7 donde se esperaba observar qué efecto tendría el compuesto a una dosis de 40 mg/Kg, al microscopio se observaron ciertos cambios en la morfología normal del tejido en ciertas zonas, lo que llevó a pensar que podía tratarse de

inflamación (figura 57, 58, 59y 60), pero no se realizaron los estudios pertinentes para poder asegurar este dato por lo que se sugiere realizar histología para poder indicar si se trata de inflamación y conocer qué tipo de células están involucradas en este cambio morfológico. Aún así se puede predecir por qué ocurren estos cambios en el tejido, en el 2013, Hernández C. M; realizó un trabajo de investigación donde el objetivo fue evaluar la capacidad antigenotóxica del compuesto LQM 731 en un modelo *in vivo* mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa) como parte de los estudios preclínicos que permitían perfilarlo como un agente quimioprotector, se demostró que el compuesto LQM 731 causa poco daño genotóxico y a su vez presenta propiedades quimioprotectoras en células de hígado y riñón, ya que disminuyó significativamente el daño al DNA causado por mitomicina C.

También se concluyó que a una dosis de 40 mg/Kg del compuesto LQM 731 es tóxico, este comportamiento se atribuyó a que al ser una mayor cantidad de compuesto y prácticamente insoluble en agua, la absorción es más lenta y esto hace que se llegue a una dosis tóxica que afecta por igual a los 2 órganos estudiados.

Con base a los resultados obtenidos se puede decir que el compuesto LQM 731, análogo amídico halogenado de CAPE, posee actividad anticarcinogénica esto al inhibir la presencia de lesiones precancerosas en intestino grueso de ratones CD1, previamente inducidos con el mutágeno 2,4-DNFH, esta capacidad se presentó a una dosis de 20 mg/Kg, por lo que finalmente se puede decir que esta es la dosis efectiva a la que el LQM 731 es posible perfilarlo como fármaco quimioprotector. El compuesto LQM 731 puede mejorar o igualar la capacidad quimioprotectora de CAPE, ya que éste al ser un derivado amídico lo hace más estable en plasma y al poseer sustituyentes halogenuros contribuyen a retardar la degradación metabólica del compuesto (Yang et. al., 2010).

Se recomienda ampliar estudios de toxicidad y seguridad de dosis con tiempos prolongados, a fin de evidenciar las propiedades del LQM 731 con potencial quimioprotector en el CCR.

XI. CONCLUSIONES

- Se demostró que el modelo de inducción de lesiones precancerosas que utiliza 2, 4-DNFH a una concentración de 10mg/Kg, es inductor de lesiones precancerosas en colon de ratones CD1, esto al ser administrando bajo un esquema periódico de 28 días, vía intraperitoneal.
- Se logró evaluar la formación de lesiones preneoplásicas en colon de ratones administrados con 2,4-DNFH, vía intraperitoneal, al examinar microscópicamente la aparición de FCA usando una tinción con azul de metileno.
- Se determinó que el compuesto LQM 731 presenta actividad anticarcinogénica a una concentración de 20 mg/Kg, ya que fue capaz de revertir totalmente la aparición de FCA, en ratones con lesiones precancerosas.
- Se estableció que la dosis a la que el compuesto LQM 731 inhibe las lesiones preneoplásicas corresponde a la de 20 mg/Kg, mientras que la dosis de 40 mg/Kg no fue efectiva, mostrando un efecto citotóxico.

XII. P E R S P E C T I V A S

- ✓ Se apoya la idea de seguir realizando estudios sobre las propiedades farmacológicas de los compuestos CAPA, en especial con el compuesto LQM 731.

- ✓ Continuar con los estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, para demostrar la capacidad antigenotóxica y anticarcinogénica del compuesto LQM 731.

- ✓ Comprobar la capacidad anticarcinogénica del LQM 731 en diferentes líneas celulares cancerosas.

- ✓ Es importante realizar las pruebas pertinentes para determinar la DL₅₀ del compuesto LQM 731.

- ✓ Tratar de elucidar el posible mecanismo de acción del LQM 731.

- ✓ Es recomendable realizar estudios de histología para determinar el tipo de células que participan en los cambios morfológicos de las lesiones precancerosas observados en este trabajo.

XIII. R E F E R E N C I A S

1. Almagiá F. A; Lizana A. P. (2009). Anatomía del aparato digestivo. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile, pp. 14-19.
2. Alrawi J; Schiff M; Carroll E; Dayton M; Gibbs F; Kulavlat M; Tan D; Berman K; Stoler L; Anderson R. (2006). Aberrant crypt foci. *Anticancer Research*, no. 26, pp. 107-120.
3. Anatomía y fisiología del aparato digestivo. <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/5392/Capitulo2.pdf> . Fecha consulta enero 2014.
4. Andrew S. B; Morin J. P; Vogelstein B. (1998). Mutational analysis of the APC/ β -Catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Research*, no. 58, pp. 1130-1134.
5. Beltrán R. O., Hernández M.J., Adolfo Sierra S. A., Villa. T. S. (2006). Mecanismo de quimiopreención del Éster Fenético del Ácido Caféico (CAPE) en la iniciación de un modelo de hepatocarcinogénesis: alteración de los CYP450. Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, México.
6. Bird R. P (1995). Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Letters*, no. 93, pp. 55-71.
7. Bird R. P; Good C. K. (2000). The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicology Letters*, no. 15, pp. 395-402.
8. Burdock G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, no. 36, pp. 347-363.

9. Carrasco L. C. (2006). A Single Dose of Caffeic Acid Phenetyl Ester Prevents Initiation in a Medium-Term Rat Hepatocarcinogenesis Model. *World Journal of Gastroenterology*, no. 12, pp. 6779-6785.
10. Castaldo S., Capasso F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, no. 73, Suppl. 1, S1-S6.
11. Catalán V., Honorato B., García F., Bandrés E., Zabalegui N., Zárate R., Salgado E; García J. (2003). Carcinogénesis colónica: proceso de transformación. *Revista Médica de la Universidad de Navarra*, no. 47, vol. 1, pp. 15-19.
12. Dausch A., Moraes C; Fort P; Park Y. (2008). Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. *Evidence-based complementary and alternative Medicine*, vol. 4, pp. 435-441.
13. Davies R. J; Sandle G. I; Thompson S. M. (1991). Inhibition of the Na⁺ K⁺ (+) ATPase pump during induction of experimental colon cancer. *Cancer Biochem Biophys*, no. 12, pp. 81-94.
14. Dávila C. A. (2012). Efecto quimiopreventivo de los fructanos de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick sobre el cáncer de colon. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Ciencias Químicas, Ingeniería y Medicina.
15. Del Monte A. J; Sánchez A. L. (2011). Inhibición de lesiones precancerosas de colon por medio de un extracto proteico de *Vicia Faba*. Tesis para obtener la el título de Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
16. Dolaro P., Caderni G., Lancioni L., Giannini A., Anastasi A., Fazi M., Castiglione G. (1997). Aberrant crypt foci in human colon carcinogenesis. *Cancer Detect*, no. 21, pp.135-140.

17. Domínguez R. M. (2008). Efecto del éster fenético del ácido cafeico (CAPE) sobre la proliferación y apoptosis en varias líneas celulares *in vitro*. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. Instituto Politécnico Nacional.
18. Farré R., Frasquet I; Sánchez A. (2004). Propolis and human health. *Ars Pharmaceutica*, no. 45, pp. 21-43
19. Fenoglio P., Noffsinger A. (1999) Aberrant Crypt Foci. *Toxicologic Pathology*, vol. 27, no.6, pp. 632-642.
20. Ficha de seguridad 2, 4-DINITROFENILHIDRAZINA. (2001). Resumen de Datos de Seguridad y Factores de Riesgo en el Manejo de Sustancias Químicas N° CAS: 119-26 6 <http://www.qb.uson.mx/PISSA/frames/hojas/2,4-DNFH.pdf>. Fecha consulta febrero 2014.
21. García L. R. (2009). Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia. Tesis de Maestría en Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.
22. Gerónimo R. K. (2011). Síntesis Orgánica de compuestos derivados del éster fenético del ácido caféico pertenecientes a la serie LQM con posible actividad biológica. Tesis para obtener el título de Química Industrial. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
23. Granados S; Quiles J; Gil A; Ramírez C. (2006). Lípidos de la dieta y cáncer. *Nutrición Hospitalaria*, no. 21, supl. 2, pp. 44-54.
24. Hechavarría B. P; Meriño H. T; Fernández M. Y; Pérez P. A. (2003). Características clínicas del cáncer de colon. Estudio de 57 pacientes. *MEDISAN*, vol. 3, no. 7, pp. 4-9.

25. Hernández C. M. (2013). Evaluación del efecto antigenotóxico del compuesto LQM 731, análogo del éster fenético del ácido cafeico (CAPE), mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa). Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
26. Hsing-Chun K., Wu-Hsien K., Yean-Jang L. , Chau-Jong W, Tsui-Hwa T. (2006). Enhancement of caffeic acid phenethyl ester on all-trans retinoic acid-induced differentiation in human leukemia HL-60 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 216, pp. 80–88.
27. Huang M; Ma W; Yen P; Xie J; Han J; Frenkel K; Grunberger D; Conney A. (1996) Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa cells. *Carcinogenesis*, vol. 17, no.4, pp. 761-765.
28. Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI (2013). Estadísticas de mortalidad
http://www.inegi.org.mx/lib/olap/general_ver4/MDXQueryDatos.asp?#Regreso&c=11144. Fecha consulta, octubre de 2013.
29. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. "Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer 2010, datos nacionales".
http://www.uicc.org/index.php?option=com_content&task=view&id=13&Itemid=113. Fecha consulta, octubre de 2013.
30. Instituto Nacional del Cáncer (2013).
<http://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal>. Fecha consulta, enero 2014.
31. Jacobo V. H. (2013). Factores de riesgo asociados a menor sobrevida en pacientes sometidos a resección hepática en cáncer de colon y recto metastásico a hígado. Tesis para obtener la Especialidad de Cirugía Oncológica. UNAM. México.

32. Jensen B. C. (2001). Cáncer de colon y recto. Revista de Colegio Chileno de Proctología, vol. 18, no. 8, pp. 426-428.
33. Kathleen R; Bert V. (1992). Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. Cancer Supplement, vol. 70, no. 6, pp. 1727-1731.
34. Langley L. L. (1987). Anatomía y fisiología. Editorial Interamericana. México, pp. 482-490.
35. León M. V; Roque S. F. (2007). Focos de criptas aberrantes, el comienzo de la historia. Gastroenterology Latinoamerican, vol. 18, no. 4, pp. 383-389.
36. Lichtenstein R. G; Wu D. G. (2005). Los requisitos en Gastroenterología: Intestino grueso y delgado. Elsevier. Madrid, España, pp: 141-165.
37. Llor X; Jacoby R. F; Teng B. B; Davidson N. O; Sitrin M. D; Brasitus T. A. (1991). K-ras mutations 1, 2- dimethylhydrazine induced colonic tumors effects of supplemental dietary calcium and vitamin D deficiency. Cancer Research, vol. 32, pp. 305-4309.
38. Marcucci M. C. (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie, vol. 26, pp.83-99.
39. Márquez J. R. (2002). Cáncer de colon. Revista Nacional de cirugía, vol. 123, pp. 125-133.
40. Monges J. J. (2011). Incidencia de mutación de K-RAZ en cáncer de colon en la unidad de tumores mixtos del servicio de oncología del Hospital General de México. Tesis para obtener el Diploma como Cirujano Oncólogo. UNAM. México.

41. Montenegro M. A; Sánchez N. M; Lértora W. J; Catuogno M. S. (2003). Focos de criptas displásicas inducidas con 1,2-dimetilhidrazina en intestino grueso de ratas tratadas con molibdeno y tungsteno. *Revista Veterinaria*, no. 14, pp. 15-19.
42. Montoro P. A. (2006). Evaluación citogenética del efecto radioprotector del extracto etanólico de propóleos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Ingeniería Química y Nuclear.
43. Morgan V. G; Silva U. A; Sat M. D. (2008). Factores de riesgo para cáncer colorrectal. *Gaceta Mexicana de Oncología*, vol. 7, Supl. 4, pp. 12-15.
44. Mori H; Yamada Y; Kuno T; Hirose Y. (2004). Aberrant crypt foci and β -catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal Carcinogenesis. *Mutation Research*, vol. 566, pp. 191-208.
45. Nang W. C. (2001). *Genetic Toxicology and Cancer, Risk Assessment*. Marcel Dekker, EUA, pp. 29-35.
46. Navarro M. O. (2009). Estudio de la expresión del gen CD200R en células epiteliales del intestino: regulación transcripcional por Anioikis. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España. Facultad de Farmacia.
47. Nishisho I., Nakamura Y., Miyoshi Y. (1991). Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, vol. 253, pp. 665-669.
48. Organización Mundial de la Salud (OMS). Cáncer. Nota descriptiva No 259. En <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>. Fecha consulta, diciembre 2013.
49. Paniagua L. (2010). Evaluación de la capacidad genotóxica del compuesto NA01 polifenólico derivado del CAPE mediante el ensayo de

SCGE in vitro. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.

50. Piñols F. C. (2010). Estudio de los cambios en la mucosa colónica de rata y cinética celular durante la carcinogénesis experimental inducida con 1,2-dimetilhidracina. Servei de publicació Universitat de Lleida. Salamanca España, pp. 38- 45.
51. Reddy B; Rao C; Seibert K. (1996). Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. *Cancer Research*, vol. 56, pp. 4566-4569.
52. Riestra S; Rodrigo L. (2007). Dieta y cáncer de colon. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, vol. 99, no. 3, pp. 183-189.
53. Roncucci L; Medline A; Bruce W. (1991). Classification of aberrant crypt foci and microadenomas in human colon. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, vol.1, pp.57-60.
54. Rosenberg D., Giardinai C; Takuji T. (2009). Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, vol.30, no.2, pp.183–196.
55. Saenz F. R; Gobelet R. J; Jara M. C. (2009). Genética y prevención en el cáncer colorrectal. *Acta Médica*, no.3, pp. 25-30.
56. Saiz M., Lobo C., Serrano J. (2001). Conferencia Actividad Antitumoral del propóleo Natura Medicatrix, pp. 56-57.
57. Saravana K. J; Mahitosh M. (2009). Antiproliferative Effects of Honey and of its Polyphenols: A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2009, pp. 1-13.

58. Su Z; Lin J; Prewett M; Goldstein N; Fisher P. (1995). Apoptosis mediates selective toxicity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) toward oncogene-transformed rat embryo fibroblast cells. *Anticancer Research*, no 15, pp. 1841-1848.
59. Sustitución nucleofílica aromática obtención de 2,4 Dinitrofenilhidrazina <http://organica1.org/1405/practica2.pdf>. Fecha consulta febrero 2014.
60. Takayama T; Miyanishi K., Hayashi T., Kukitsu T. (2005). Aberrant crypt foci: detection, gene abnormalities and clinical usefulness. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, no. 3, pp. S42-S45.
61. Tortora G. J; Reynolds G. S. (2002). *Principios de anatomía y fisiología*. Novena edición. Ed. Oxford. Reino Unido, pp. 864-870.
62. Tirado G. L; Mohar B. A. (2008). Epidemiología del cáncer de colon y recto. *Gaceta Mexicana de Oncología*, vol. 7, Supl. 4, pp. 3-11.
63. Tsao A. S; Kim E. S; Hong W. K. (2004). Chemoprevention of cancer. *Cancer Journal for Clinicians*, vol. 5, no. 3, pp. 150-180.
64. Wang D., Xiang D., He Y., Li Z., Wu X., Mou J, Xiao H., Zhang Q. (2005). Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells in vitro. *World Gastroenterology*, vol. 26), pp. 4008-4012.
65. Weinberg R.A. (1996). How Cancer Arises. *Scientific American*, vol. 275, no. 3, pp. 62-70.
66. Wu J; Omene C; Karkoszka J; Bosland M; Eckard J; Klein C; Frenkel K. (2011). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer Letters Journal*, vol. 308, pp. 43-53.
67. Yang J; Marriner G; Wang X; Bowman P; Kerwin S; Stavchansky S. (2010). Synthesis of a series of caffeic acid phenethyl amide (CAPA) fluorinated

derivatives: comparison of cytoprotective effects to caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 18, pp. 5032-5038.

68. Ya-Ting L; Ming-Jaw D; Pei-Shih H; Yuh-Chiang S; Yin-Shen L; Kuo-Wei C; Chieh-Fu C; Li-Kang H. (2005). Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. *Cancer Letters*, vol. 223, pp. 19–25.

69. Zamorano P. E; Lagos M.P; Rivera C. P; Fernández R.J. (2008). Un modelo experimental inducible en ratón para conducir estudios en quimioprevención y anticarcinogénesis. *Theoria*, vol.17, no. 1, pp. 71-78.

A P É N D I C E

- **Preparación de 2,4-Dinitrofenilhidrazina:**

La 2,4-dinitrofenilhidrazina se prepara como una solución que contenga 400 mg de 2,4-dinitrofenilhidrazina disuelta en 100 ml de agua destilada estéril, agregar 37 mg de EDTA como agente estabilizador. Mantener dicha solución a pH de 6.5, con hidróxido de sodio.

- **Preparación azul de metileno:**

Para llevar a cabo la tinción de los órganos previamente se conservan en una solución de formol 10 % y PBS. Hacer una preparación de azul de metileno y alcohol etílico al 70 %, 2:1 respectivamente y colocar el órgano directamente durante 7 min, para después observar al microscopio.

- **Preparación de PBS/Formaldehído:**

Para preparar un 1 Lt. Disolver un sobre de la preparación ya estandarizada de PBS. Y agregar 10 ml de formaldehído concentrado.

- **Preparación de la emulsión LQM 731/aceite de maíz (20 y 40 mg/Kg)**

Pesar 0.010 y 0.021 gr para del compuesto LQM 731 para la dosis de 20 y 40 mg/Kg, respectivamente. Agregar 20 ml de aceite de maíz (SIGMA). Sonicar la mezcla durante 30 min.