

Efecto de bebidas a base de frutas tropicales colombianas sobre la cantidad de células inflamatorias, las mucinas intestinales y los cambios preneoplásicos y neoplásicos, en un modelo experimental de cáncer de colon

Trabajo de Investigación presentado como requisito parcial para optar al título de
Magíster en Ciencias Veterinarias

Por:

Clara Inés Gil Taborda

Médica Veterinaria, Esp.

Director

Berardo De Jesús Rodríguez

Médico Veterinario, Esp Patólogo, PhD

Maestría en Ciencias Veterinarias

Profundización en Patología Veterinaria

Universidad de Antioquia

2015

Agradecimientos

A mis **amores**, apoyo y razón.

A mi tía Lucía, ejemplo y oportunidad.

A mi tutor Berardo, maestro con todas sus letras.

A María C y María Elena, apoyo y fortaleza.

A mi jefe Hernán, andamio en lugar de obstáculo.

A mis estudiantes y pacientes principio y fin de mi aprendizaje.

Al grupo de Patología Veterinaria de la Universidad de Antioquia, generosa compañía.

Al alma mater, proa y timón.

A Dios, amor hecho todo...

Dedicatoria

Al amor más fiel e inagotable... a mi madre.

Tabla de contenido

	Página
1. Resumen	8
2. Abstract	10
3. Introducción	12
4. Objetivos	18
4.1. Objetivo general	18
4.2. Objetivos específicos	18
5. Marco teórico	20
5.1. Importancia desde la epidemiología	20
5.2. Definición de cáncer y sus factores predisponentes	21
5.3. Asociación entre enfermedad inflamatoria del intestino y cáncer de colon	23
5.4. Patogénesis molecular	25
5.5. Formación de focos de criptas aberrantes	32
5.6. Mucinas	35
5.7. Los Radicales libres y la quimiopreención en el CCR	41
5.8. Mango de azúcar, <i>Mangifera indica</i> y curuba larga <i>Passiflora molissima</i> , como agentes quimiopreventivos	49
5.9. El modelo animal	51
5.9.1. Vía K-ras	53
5.9.2. Vía de la β – catenina	54
5.9.3. Vía del Factor de crecimiento transformante – β TGF β	54

6.	Cuerpo del trabajo	56
6.1.	Artículo para publicación	56
7.	Conclusiones generales	91
8.	Referencias	94

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Efecto de las bebidas frutales de mango de azúcar, <i>Mangifera indica</i> y de la curuba larga <i>Passiflora molissima</i> , sobre la cantidad de leucocitos.	p 68
Figura 2. . Efecto de las bebidas frutales de mango de azúcar, <i>Mangifera indica</i> y de la curuba larga <i>Passiflora molissima</i> , sobre los Focos de criptas aberrantes (FCA). p	69
Figura 3. Microfotografía de colon, coloración HE FCA y colon normal.	p 70
Figura 4. Efecto de las bebidas frutales de mango de azúcar, <i>Mangifera indica</i> y de la curuba larga <i>Passiflora molissima</i> sobre la expresión de las células caliciformes con expresión de mucinas neutras, ácidas sulfatas y no sulfatadas.	p 72
Figura 5. Microfotografía de la coloración Histoquímica para clasificación y cuantificación de células caliciformes con expresión de mucinas neutras, y ácidas sulfatas y no sulfatadas en ratones que consumieron bebida frutal de mango de azúcar, <i>Mangifera indica</i> y los que no.	p 73
Figura 6. Efecto del consumo repetido de bebida frutal de mango de azúcar, <i>Mangifera indica</i> y de la curuba larga <i>Passiflora molissima</i> , sobre la Actividad celular proliferativa.	p 74

Tabla 1. Efecto del consumo repetido de extracto de mango de azúcar, *Mangifera indica*, sobre la expresión de los diferentes tipos de mucinas en ratones inducidos con AOM. p 73

Lista de abreviaturas

AA 1.0: Azul de Alcían pH 1.0.

AA 2.5: Azul de Alcían pH 2.5.

APC: Gen de la poliposis coli adenomatosa.

CC: Células caliciformes.

CCR: Cáncer Colorectal

EII: Enfermedad inflamatoria Intestinal

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FCA: Focos de criptas aberrantes.

TNF: Factor de Necrosis tumoral.

HE: Hematoxilina Eosina.

HNPCC: Cáncer colorectal hereditario no polipósico

ICAM: Molécula de adhesión intercelular.

IL: Interleucina.

IP: Intraperitoneal

MA: Mucinas ácidas.

MMR: Genes de reparación

MN: Mucinas neutras.

MSI: Inestabilidad de microsatélites

MUC: Gen asociado a mucina.

PAS: Periodic acid Schiff.

SI: Sistema Inmune.

1. Resumen

Introducción: El cáncer colorectal (CCR) constituye a nivel mundial, la segunda causa de muerte por cáncer en hombres y la tercera en mujeres. Numerosos estudios demuestran como su presentación aumenta debido a los hábitos alimenticios. Otros estudios han estimado que la transformación maligna tarda de 10 a 20 años, lo cual revela la enorme ventana terapéutica que existe para prevenir la enfermedad o retrasar su progreso. Sin embargo, la falta de un diagnóstico precoz y de medidas de quimioprevención lleva a que la enfermedad en el humano progrese de manera silenciosa. **Objetivo:** Determinar las propiedades quimiopreventivas y terapéuticas del mango de azúcar (*Mangifera indica*) y de la curuba larga (*Passiflora molissima*) sobre el cáncer de colon humano en un modelo murino. **Metodología:** Se diseñó un estudio dividido en cuatro experimentos, empleando 82 ratones (*Mus musculus*) de la cepa BALB/c. En los Experimentos 1 y 2 los animales recibieron tres tratamientos diferentes, que consistían en suministrar como líquido de bebida, concentraciones variables de extracto de curuba larga y mango de azúcar durante 10 semanas. Se realizó la inducción experimental de CCR usando inyecciones intraperitoneales (IP) de Azoximetano (AOM) en las semanas 4 y 5. Posteriormente los ratones fueron sacrificados para obtener las muestras de colon. En estas muestras se efectuaron cortes histológicos y se realizaron coloraciones rutinarias e histoquímicas para valorar las lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas, así como también para determinar la cantidad de células caliciformes con expresión de mucinas ácidas, neutras y sulfatadas, y la respuesta leucocitaria. A partir de estos experimentos se eligió una concentración de extracto efectiva. Los

Experimentos 3 y 4 se realizaron para observar el efecto de cada extracto de fruta para inhibir o retardar la aparición y/o transformación de las lesiones pre-neoplásicas. Un nuevo grupo de ratones, recibieron inyección IP de AOM una vez por semana durante dos semanas. Una semana después de la última inyección de AOM, los ratones fueron separados en tres grupos para recibir las concentraciones efectivas de mango de azúcar y curuba larga. Los ratones fueron posteriormente sacrificados y se colectaron muestras del colon, repitiendo la evaluación descrita para los experimentos iniciales. El análisis estadístico fue realizado usando un modelo de dos factores de efectos fijos con el programa estadístico SPSS® (versión 19, 2010). La prueba de Lambda-Wills fue usada para comparar las medias de los tratamientos ($p < 0.05$). **Resultados y Discusión:** El consumo de una bebida reconstituida de mango de azúcar inhibió la formación de Focos de criptas aberrantes (FCA) hiperplásicas. Se observó un aumento en la expresión de mucinas neutras y una disminución de mucinas sulfatadas, y de la infiltración leucocitaria. El consumo de curuba larga se vio relacionado con una disminución en el número de células mitóticas y de mucinas sulfatadas, a la vez que las mucinas neutras aumentaron. En el consumo repetido de ambas bebidas de frutas se observó bajo número de FCA displásicas. **Conclusión:** Este estudio muestra que el consumo repetido de mango de azúcar y curuba larga en ratones inducidos con AOM disminuye la expresión de lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas, modifica la producción de mucinas en el epitelio colónico, y disminuye la respuesta de las células inflamatorias en el tejido submucoso del colon.

2. Abstract

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is the second cause of death in men, and the third in women, worldwide. Many studies demonstrate its occurrence is increasing due to eating habits. Other studies have estimated that its malignant transformation takes 10 to 20 years, which reveals the enormous therapeutic window that exists to prevent the disease or to retard its progress. Nevertheless, the early diagnosis and chemoprevention lack takes to a silent development of the disease in humans. **Objective:** To determine the chemopreventive and therapeutic properties of the sugar mango de azucar (*Mangifera indica*) and the curuba larga (*Passiflora molissima*) over colon cancer in humans using a murine model. **Methods:** A study was designed and 4 experiments were done using 82 BALB/c strain mice (*Mus musculus*). In Experiments 1 and 2 the animals received three different drinking liquid treatments, compounded by variable concentrations of curuba larga and mango de azucar extracts during 10 weeks. The experimental induction of CRC was done using intraperitoneal (IP) injections of Azoximetane (AOM) at weeks 4 and 5. Later, mice were euthanized to obtain colon samples. Histological cuts, routine and histochemical colorations were applied to colon samples to examine the pre-neoplastic and neoplastic lesions, to determine the quantity of caliciform cells expressing acid, neutral, sulfated mucins, and leukocytes. An effective concentration of extract was chosen from these experiments. Experiments 3 and 4 were done to observe the inhibitory effect of each fruit extract in the appearance and transformation of the pre-neoplastic lesions. A new group of mice received IP injections of AOM once a week during 2 weeks. One week later after the last injection of AOM mice were separated in three group to

receive the effective concentrations of mango de azucar (*Passiflora molissima*) and curuba larga. (*Mangifera indica*). Mice belonging to these groups were euthanized and colon samples were collected, repeating the evaluations described for the initial experiments. The statistical analysis was done using a two-factor model of fixed effects with the SPSS® statistical program (version 19, 2010). The Lambda-Wills test was used to compare the measures of the treatments ($p < 0.05$). **Results and Discussion:** the consumption of sugar mango de azucar decrease the hyperplastic Aberrant Crypt Foci (ACF) production. An increasing of neutral mucins expression, a decreased of sulfated mucins and leukocyte infiltrations was observed. The consumption of curuba larga was related to a decreased of the mitotic cells and of the sulfated mucins and the increasing of neutral mucins and a low number of dysplastic FCA. **Conclusion:** This study reveals that the repeated consumption of mango de azucar and curuba larga in mice inducted by AOM influences the expression of pre-neoplastic and neoplastic lesions, the production of mucins in the colon epithelium, and the inflammatory cell response in the colonic submucosa tissue.

3. Introducción

Cada año son diagnosticados en todo el mundo más de 1 millón de nuevos casos de cáncer colorrectal en humanos (CCR), a pesar de los importantes avances en la detección, cirugía y quimioterapia que se han logrado hasta el momento, el CCR es la tercera neoplasia más frecuente y la cuarta causa más común de mortalidad por cáncer en todo el mundo. Sólo alrededor del 20% de los casos de CCR tienen una base familiar; mientras que la mayor parte de los casos se han relacionado con causas ambientales. Entre los factores de riesgo se incluyen mutágenos ambientales, algunos hábitos alimenticios, comensales intestinales específicos y la inflamación intestinal crónica (Terzic, 2010).

La mortalidad por CCR en humanos está directamente relacionada con el estadio tumoral al momento del diagnóstico. (Siegel R et al., 2014) Por tanto un diagnóstico precoz y el establecimiento de medidas de quimioprevención podrían aumentar las posibilidades de evitar la progresión de la enfermedad a una fase premaligna o maligna en la tumorigénesis.

El uso de modelos animales para el estudio del CCR humano, ha permitido una mejor comprensión de los mecanismos de su desarrollo y patogénesis, (Carmona, 2009). El modelo murino inducido por Azoximetano (AOM) permite replicar muchos aspectos del tumor desarrollado en el hombre, tales como la alteración genética, las mutaciones en el ADN, el comportamiento celular, los cambios morfológicos y en general, la biología del tumor, esto ha llevado a proponer el uso de este modelo clínico

experimental del cáncer en roedores como estrategia para evaluar la eficacia quimiopreventiva de agentes naturales en CCR. (Maldonado, 2011).

El modelo murino de carcinogénesis inducida con AOM permite replicar los cambios morfológicos tempranos que se desarrollan en la mucosa intestinal, estos se han denominado Focos de Criptas Aberrantes (FCA), y corresponden a anormalidades microscópicas en la superficie de la mucosa colónica, que constituyen la primera lesión preneoplásica identificable en este modelo. Los FCA pueden evolucionar a pólipos adenomatosos y posteriormente, a carcinoma, lo cual ocurre de forma concomitante a la acumulación de alteraciones bioquímicas y de mutaciones genéticas. (Jones et al., 2014)

Los FCA tienen características histológicas, anormalidades morfológicas y genéticas comunes con los adenomas y con el CCR, lo cual apoya la noción de que estas lesiones son el primer paso en la progresión del cáncer (Jones, 2014). Desde la primera detección de FCA en ratones tratados con carcinógeno, realizada por Bird en 1987, se maneja la hipótesis de que los FCA son los precursores más tempranos de CCR, por lo cual numerosos estudios se han centrado en esclarecer su origen y evolución. (Jones et al., 2014). Datos recientes indican que algunos FCA, no evolucionan a adenomas ni a CCR, lo que confiere mayor importancia a su detección precoz y a la comprensión de su patogenia, ya que esto podría dar indicios de como la progresión a CCR podría evitarse. (Jones et al., 2014).

La patogenia del CCR indica que este surge a partir de un aumento en los niveles de radicales libres de oxígeno, que pueden causar daño genotóxico en las células precancerosas, lo que favorece la transformación progresiva del epitelio normal, a displásico y metaplásico con formación de FCA y formación consecuente de adenomas o adenocarcinomas con expresión disminuida o alterada de mucinas (MUCs) básicas, neutras o sulfatadas; esto sugiere que estos mecanismos primarios de defensa del tracto gastrointestinal pueden estar alterados en las fases tempranas de la carcinogénesis colorectal (Larsson et al., 2013). Lo anterior evidencia falta de investigaciones al respecto, la necesidad y la importancia de identificar los cambios tempranos en la producción y en la distribución de las mucinas intestinales durante la carcinogénesis del colon, que puedan utilizarse como biomarcadores de alteraciones preneoplásicas al inicio de la patogénesis tumoral.

En cuanto a la quimioprolifaxis, muchas frutas y vegetales contienen antioxidantes, vitaminas, minerales y otras sustancias como los carotenoides, flavonoides y retinoides capaces de neutralizar los radicales libres, responsables de la oxidación intrínseca y carcinogenicidad ocasionada por el daño al ADN. (Maldonado, 2011). Algunos estudios sugieren además, que los antioxidantes pueden inhibir la tumorigénesis mediante la estimulación del sistema inmune. (Ganga et al., 2014), (Slattery, 2012). La detección temprana de lesiones preneoplásicas y el esclarecimiento de las vías moleculares de la progresión del cáncer han despertado el creciente interés por la búsqueda de factores quimiopreventivos, que puedan prevenir, detener o retrasar la progresión de dichas lesiones preneoplásicas. Los

agentes quimiopreventivos pueden ser tanto biológicos como sintéticos, y han motivado la puesta en marcha de numerosos estudios para probar las propiedades quimiopreventivas de frutas y extractos vegetales, sin embargo en la actualidad se desconocen las propiedades antitumorales de un gran número de frutas.

Colombia es un país que dada su riqueza natural, es cultivador de gran variedad de frutas, de las que en su mayoría se desconoce su valor como potenciales productos quimiopreventivos; tal es el caso del mango de azúcar y de la curuba larga, de los cuales existen estudios previos en los que se ha demostrado su alto valor nutricional y su potencial como antioxidante, pero no existen estudios *in vivo* que evidencien que sus componentes puedan generar algún efecto sobre el comportamiento del cáncer en sus inicios y tener propiedades como quimiopreventivos, para ser potencialmente usados en el manejo del CCR.

Hasta el momento cinco extractos frutales se han patentado para el tratamiento CCR; uva, frambuesa, asai, jucara y noni (Hong JT, 2010). El mango de azúcar y la curuba larga han demostrado en estudios previos contener mayor poder antioxidante que muchas otras frutas y extractos vegetales (Corrales et al., 2014), (Chaparro et al., 2014). Además otros estudios *in vitro* que se han desarrollado con variedades norteamericanas de mango de azúcar, usando células de adenocarcinoma de colon SW480, han presentado resultados favorables, pero sin avanzar a estudios clínicos experimentales en modelos animales (Amin, 2009), (Maldonado, 2011). Respecto a la curuba larga no hay estudios reportados sobre quimioprevención, a pesar de que

ha sido demostrado su alto valor biológico, contenido de metabolitos secundarios con características polifenólicas, taninos y flavonoides, los cuales son determinantes en la actividad antioxidante de las frutas, siendo aún mayores que los reportados para la mayoría de los vegetales de muchas latitudes, incluidas diversas frutas, granos y legumbres (Rojano, 2012)

Nunca antes se había tenido tanta información sobre las vías de carcinogénesis y progresión del cáncer, sin embargo su cura y prevención siguen siendo un desafío para la Medicina moderna. En la actualidad uno de los métodos diagnósticos empleados en humanos es la visualización de focos de criptas aberrantes (FCA), mediante endoscopia rectal de magnificación y usando la coloración azul de metileno, otro método es la obtención de biopsias para estudio histopatológico; sin embargo no existe un modelo detallado que describa, la respuesta leucocitaria asociada a los FCA, la proliferación celular, el número y localización de las células caliciformes, así como tampoco existe una descripción de la distribución de las mucinas durante la carcinogénesis, teniendo en cuenta su clasificación química como mucinas neutras, acidas sulfatadas y no sulfatadas.

Dados los vacíos en el conocimiento mencionados anteriormente, se realizó un estudio en un modelo animal murino de CCR para caracterizar histológicamente las lesiones preneoplásicas y neoplásicas más frecuentes, la expresión de mucinas, su distribución en cuanto a naturaleza química, el número de células caliciformes y como se afectan al implementar en la dieta, el consumo repetido de mango de azúcar y

curuba larga como tratamiento quimioprolifático propuesto, ya que este efecto también se desconoce, para ello se propone la siguiente hipótesis:

El suministro de bebidas de mango de azúcar y curuba larga reconstituidos modifican modifica la aparición de células inflamatorias, lesiones preneoplásicas, neoplásicas y la expresión de mucinas en un modelo de cáncer murino.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Determinar las propiedades quimiopreventivas y terapéuticas del mango de azúcar, *Mangifera indica* y la curuba larga, *Passiflora molissima* sobre el cáncer de colon humano en un modelo murino.

4.2. Objetivos Específicos

- Determinar el efecto del consumo de una bebida reconstituida de curuba larga, *Passiflora molissima* y otra de mango de azúcar, *Mangifera indica*, sobre la respuesta leucocitaria en ratones inducidos y no inducidos con AOM.
- Determinar el efecto del consumo de una bebida reconstituida de curuba larga, *Passiflora molissima* y mango de azúcar, *Mangifera indica*, en la aparición de lesiones preneoplásicas y neoplásicas en ratones inducidos con el carcinógeno Azoximetano (AOM).
- Determinar el efecto una bebida reconstituida de cada fruta en el grado de severidad y distribución de las lesiones pre-neoplásicas en el colon de ratones cuando la bebida reconstituida se suministran antes y después de la inducción con AOM.
- Determinar el efecto del consumo de una bebida reconstituida de curuba larga, *Passiflora molissima* y otra de mango de azúcar, *Mangifera indica*, sobre la expresión de mucinas neutras y ácidas sulfatadas y no sulfatadas y el número de

células caliciformes, en las glándulas intestinales del colon en ratones inducidos y no inducidos con AOM.

- Determinar el efecto del consumo de una bebida reconstituida de curuba larga, *Passiflora molissima* y otra de mango de azúcar, *Mangifera indica*, sobre la actividad celular proliferativa en ratones inducidos con AOM.

5. Marco teórico

5. 1. Importancia epidemiológica del Cáncer de Colon

El cáncer colorectal (CCR) es la tercera causa más común de muerte por cáncer en el mundo en hombres y segunda en mujeres, según estudios publicados por la serie GLOBOCAN de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el cáncer, estimaron que en el año 2012 a nivel mundial, se presentaron 746.000 casos, 10,0% del total en hombres y 614.000 casos, 9,2% del total, en mujeres, en todo el mundo. Casi el 55% de los casos ocurren en las regiones más desarrolladas El 60% de los casos ocurrieron en las regiones desarrolladas, donde las tasas más altas de incidencia se estiman en Australia, Nueva Zelanda y Europa Occidental, y las más bajas en África (excepto Sudáfrica) y Asia, mientras que América Latina es considerada como de presentación intermedia (Ferlay J, 2010). En Colombia La incidencia es de 12,9 y la prevalencia es de 41,2 por 100.000 habitantes, según último informe de Globocan 2012 (INC, 2012).

En Antioquia para el periodo comprendido entre el 2007y el 2009, el cáncer de colon y de recto ocupó el quinto lugar entre todos los tipos de cáncer, esto se observó al analizar conjuntamente ambos sexos, como al analizarlos separadamente (hombres y mujeres). A diferencia de lo que ocurre en el mundo, en el departamento de Antioquia la incidencia observada fue mayor en mujeres que en hombres. (Secretaría de Salud, 2009). Y durante el año 2008, presentó una incidencia total de 10,6 por cada 100 mil personas, correspondiente a 4,107 casos nuevos. (Ferlay, 2010)

En la ciudad de Medellín se estimó para el año 2009, una tasa de mortalidad por CC de 8.98 por 100 mil habitantes. En la ciudad de Medellín se encuentran las siguientes neoplasias, enumeradas por su porcentaje de mortalidad; en primer lugar el cáncer maligno de pulmón, cáncer de próstata, de mama, de estómago y CCR, identificándose el CCR como uno de los 5 tipos de cáncer más mortales. (Secretaría de Salud, G. d. (2009).

El conocer el panorama mundial y local de la enfermedad motiva a establecer medidas de detección temprana y a formular acciones de control, partiendo de la posibilidad que tienen las enfermedades crónicas de ser prevenidas, entendiendo que el conocimiento de las causas de muchas enfermedades crónicas, y la eliminación de sus factores de riesgo podría prevenir al menos el 80% de los casos de algunas entidades como: cardiopatías, accidentes cerebrovasculares, diabetes tipo 2; y hasta más del 40% de los casos de cáncer. (OMS, 2005).

5.2. Definición de cáncer y sus factores predisponentes

Desde un punto de vista teórico, el cáncer puede ser definido como la combinación de daños y cambios que inducen a una célula normal a crecer en forma autónoma y desmedida, evadiendo los mecanismos de control del ciclo celular y generando la inactivación de las vías que inducen apoptosis, estas alteraciones suelen ser irreversibles en la maquinaria genética de la célula y serán trasladadas a las sucesivas generaciones de células hijas. Luego de un período de tiempo variable, las neoplasias evolucionan a formas capaces de evadir la respuesta inmune antitumoral, proveerse de

oxígeno y nutrientes a través de mecanismos de angiogénesis, infiltrar tejidos vecinos y producir metástasis a distancia (Rabassa, 2005), (Hanahan, Weinberg. 2011). La carcinogénesis del cáncer de colon se ha asociado a la acumulación de errores genéticos y además a factores ambientales. De los casos reportados se estima que el 85% corresponde a la forma esporádica del cáncer de colon, y alrededor del 70% de los casos están asociados a una dieta caracterizada por un alto consumo de alimentos ricos en grasas, azúcares refinados y una baja ingesta de fibra, frutas y verduras (Minker et al., 2014).

Muchos defectos genéticos asociados al cáncer ya han sido descritos, esto ha permitido identificar el papel fundamental que estos juegan en la carcinogénesis del CCR. Hahn y Weinberg (2002), afirmaron que una célula normal solo necesita adquirir un número limitado de fenotipos para convertirse en una célula neoplásica; en primer lugar, la desactivación de mecanismos de reparación del ADN, crea un estado de inestabilidad de los recursos genéticos, en el cual la célula puede acumular mutaciones suficientes para desarrollar malignidad. En segundo lugar otros fenotipos confieren a la neoplasia, resistencia para la inhibición del crecimiento, inmortalización, amplia capacidad mutogénica, angiogénica, capacidad de invadir, de crear metástasis a distancia y, la posibilidad de evasión de la apoptosis. (Gajewski et al., 2013), (Toshiya et al., 2012)

Los factores ambientales que pueden predisponer a la presentación de cáncer de colon, pueden estar determinados por los estilos de vida de las distintas zonas geográficas del mundo, tales como el consumo de tabaco y alcohol, la falta de actividad física y la

obesidad. La exposición a los productos derivados del tabaco de forma temprana, y el consumo excesivo de alcohol constituye factores de riesgo tanto en hombres como en mujeres. Un reciente análisis conjunto de 8 estudios de cohorte, que incluía medio millón de personas de 5 países distintos, demostró que el riesgo se aumentaba a partir de un consumo de 30 gramos de alcohol por día, y era independiente del tipo de bebida consumida (Riestra, 2007), (Cho et al., 2012). Otros estudios epidemiológicos han puesto en evidencia la existencia de una relación clara entre obesidad y el riesgo de cáncer de colon en hombres, en los cuales esta asociación fue aún más pronunciada en personas con escasa actividad física (Vucenik, Stains 2012).

5.3. Asociación entre enfermedad inflamatoria del intestino y cáncer de colon

La asociación entre la enfermedad inflamatoria Intestinal (EII) y CCR se ha reconocido desde 1925; sin embargo a pesar de que se ha identificado esta asociación, continúan en estudio los mecanismos moleculares, el papel de las células leucocitarias, de las citosinas y de otros mediadores inmunes en los diferentes pasos de la tumorigénesis, tales como iniciación, promoción, progresión y metástasis, así como los nuevos enfoques para la prevención y tratamiento (Dyson, 2012).

Se sugiere que el proceso inflamatorio que ocurren en los estadios iniciales sumado a las alteraciones genéticas, inician la cascada de la proliferación anormal del epitelio colónico. El hallazgo constante de infiltración leucocitaria y mediadores inflamatorios en asociación con tumores, hace que algunos estudios indiquen que las células inmunes son importantes en la promoción de la carcinogénesis (Danese S, 2010). Por otro lado se ha

descrito que los sitios donde hubo inflamación a nivel intestinal son los mismos donde con mayor frecuencia, se encuentran lesiones neoplásicas, dado que en las lesiones preneoplásicas se crea un ambiente proinflamatorio compuesto por citoquinas, factores de crecimiento, estroma activado, metaloproteínas que degradan la matriz extracelular y agentes como los radicales libres que inducen daño del ADN (Arthur, 2012).

La inflamación es un proceso crítico en la generación de tumores, ya que puede conllevar a inestabilidad genómica, lo cual permite que las células se transformen o adquieran características neoplásicas (Piña, 2015). Algunas observaciones epidemiológicas han demostrado la correlación existente entre la inflamación y el cáncer, tal como ocurre en las personas que padecen EII, las cuales tienen un alto riesgo de sufrir de CCR, y además dicho riesgo aumenta con la gravedad y la duración de la inflamación (Terzic, 2010). Estudios experimentales en modelos murinos, han aportado evidencia que corrobora lo anterior, al inducir la colonización por bacterias patógenas que producen toxinas específicas, promoviendo inflamación y el posterior desarrollo del CCR. Un segundo papel de la inflamación en el CCR es la interrupción de la barrera epitelial, lo cual permite que las bacterias intestinales puedan acceder a los focos de inflamación localizada, perpetuando el proceso y generando la formación de radicales libres de oxígeno, que a su vez inducen inestabilidad genética con daño del ADN de las células epiteliales y formación de un microambiente tumoral que perpetuará el proceso (Kozicky, 2013), este microambiente tumoral se compone de células inflamatorias y mediadores como la interleuquina (IL) 6, factor de necrosis tumoral α (TNF α), IL 23, y las especies reactivas de oxígeno (EROS) (Arthur, 2012).

Las observaciones realizadas en adenomas humanos tempranos, evidenciaron una correlación directa entre la alteración de las proteínas de unión estrecha en células epiteliales y la expresión de IL- 23 e IL -17, lo cual permite concluir que los procesos inflamatorios pueden conducir a la perturbación de la barrera epitelial y a la promoción del CCR (Tosolini, 2011).

Existen numerosos estudios sobre el papel de la inflamación en el desarrollo del CCR, los cuales han mostrado resultados controvertidos, por un lado algunos estudios epidemiológicos que incluyen modelos murinos, han validado la influencia de la inflamación en la carcinogénesis del CCR en humanos, en los cuales se sugiere que esta asociación es atribuible a la producción de ADN mutado por efecto de la formación de EROS y por la vigilancia tumoral mediada por linfocitos Th1 y que Th17 como amplificadores de la respuesta inflamatoria, esto magnifica el daño del ADN en las células epiteliales y genera disfunción en las proteínas de unión de las células epiteliales, favoreciendo la pérdida de la integridad de la barrera epitelial, creando así un "intestino permeable" que aumenta la asociación entre microorganismos inductores de inflamación y las células intestinales, perpetuando así la lesión tisular y el potencial genotóxico. (Kozicky, 2013).

5.4. Patogénesis molecular

La transformación de una célula normal en neoplásica, es un proceso complejo y multifactorial que ocurre en varias etapas y que lleva a la aparición de un clon de células que escapa al control normal de la proliferación. Este control está dado por el equilibrio entre la actividad de los oncogenes y de los genes supresores de tumores. El CCR representa un paradigma de tumorigénesis, relativamente bien caracterizado, en el cual se ha demostrado que puede haber activación de oncogenes y mutaciones de los genes supresores. Por lo tanto, el fenómeno neoplásico se puede entender básicamente como un trastorno del control genético de la proliferación en las células del epitelio intestinal, en el cual las mutaciones sucesivas en genes específicos, le conceden a las células neoplásicas ciertas ventajas para garantizar la supervivencia y la capacidad de expansión, estos genes se encuentran ampliamente esclarecidos, y pueden clasificarse en: Genes supresores tumorales, oncogenes y genes reparadores del ADN (Sinicropo et al., 2012).

Los genes supresores tumorales se han identificado como un grupo de genes que codifican proteínas capaces de inhibir y regular la proliferación celular al bloquear la actividad de oncogenes y de los productos de oncogenes. Sin embargo estos genes se consideran recesivos ya que la inactivación de un solo alelo no es suficiente para generar la neoplasia, para esto debe ocurrir la ausencia completa del gen supresor tumoral. Los oncogenes son genes anormales o activados que proceden de la mutación de al menos un alelo de un gen normal llamado protooncogén; los oncogenes estimulan el crecimiento celular y cuando mutan el crecimiento celular se hace de manera incontrolada, siendo

los responsables de la transformación de una célula normal en una célula neoplásica (Tanaka, 2009). Los genes reparadores del ADN no contribuyen directamente al crecimiento ni a la proliferación de las células, sino que actúan de manera indirecta, corrigiendo los errores que se producen espontáneamente en el ADN durante la división celular, o que son consecuencia de la exposición a productos químicos mutagénicos o a la radiación, cuando estos genes funcionan de manera inadecuada se afectan vías moleculares que conducen a la acumulación de oncogenes que favorecen la progresión del cáncer (Cancer Genome Atlas Network. , 2012).

La mutación más temprana en la progresión en el CCR es en el gen de la poliposis coli adenomatosa (APC), este es un gen supresor tumoral que normalmente se liga a la β -catenina, una proteína que promueve la proliferación celular, para marcarla y generar su degradación. Cuando el APC muta no se liga a la β -catenina, esta aumenta sus niveles intranucleares, se une al ADN y activa la transcripción de genes; el resultado de esto será la inhibición de la apoptosis y la proliferación celular conllevando a la formación de adenomas, sin embargo estos cambios se detectan de manera notable en las células de la parte superior de la cripta, al formarse un clon de células mutadas, el cual progresa hasta un pólipo visible (Pancione, 2012), (Smith, 2002).

Al menos 80% de los adenomas comienzan con una mutación del gen APC como el primer paso en la patogénesis del cáncer de colon; este gen fue descubierto como el responsable de la poliposis adenomatosa familiar (FAP), en esta condición, los individuos afectados nacen con una copia del gen APC mutada, y así, cuando la segunda

copia del gen APC muta o se inactiva por un evento somático, se desarrollan los pólipos. Para la formación de un adenoma esporádico (no hereditario), es necesario que se produzcan cambios en ambas copias del gen APC, siendo así menor la probabilidad de desarrollar adenomas (Sinicrope et al., 2012).

Después que el gen APC, pierde su función, otros genes mutan progresivamente, entre ellos el K-ras, el p53, el DCC y los genes reparadores de la alteración en el acople del ADN (Mismatch Repair-MMR), los cuales son supresores tumorales excepto el K-ras, que es un oncogén (Sánchez, 2005). La proteína K-ras inactiva está unida a GDP y, al ser estimulado, el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) favorece la formación de GTP-ras, el cual es la forma activa, posteriormente el GTP es hidrolizado a GDP y por la actividad GTP asa intrínseca de la proteína RAS es inactivado, cuando hay mutaciones en K-ras la actividad GTP asa queda bloqueada, la proteína RAS queda constitutivamente activada y unida a GTP (Javier Hernández-Losaa, 2012). Entonces dicha activación promueve su unión en el citoplasma con RAF1, la cual se trasloca a la membrana citoplasmática donde se activa por mecanismos aun no completamente esclarecidos, esta señal activa a su vez a la proteína quinasa extracelular señal regulada, activada por mitógenos quinasa, promoviendo la proliferación y la diferenciación celular (Tanaka, 2009).

El gen K-ras está normalmente involucrado en la señal de transducción de crecimiento intracelular, cuando una copia del K-ras muta, la señal de crecimiento es constante e incontrolada favoreciendo la formación de adenomas (Juang, 2009). Las mutaciones en

los genes K-ras se han identificado en una gran variedad de neoplasias humanas y es uno de los primeros eventos en la progresión de las neoplasias colorrectales, siendo detectables en epitelios histológicamente normales o cuando existen FCA previos al cáncer (Bendardaf, 2004), esto se observa en el 9 % de los adenomas de menos de 1 cm de tamaño, en el 58 % de los adenomas mayores a 1 cm, y en el 47% de los carcinomas, por lo tanto, la mutación del gen K-ras se produce durante la etapa inicial de la carcinogénesis y está relacionada con el aumento del tamaño del tumor (Tanaka, 2009). Histopatológicamente la mutación del K-ras revela dos cambios importantes: Mayor tamaño de los FCA y mayor intensidad de la displasia (Catalán, 2009). La importancia clínica de las mutaciones K-ras es controvertida, aunque algunos estudios han demostrado que la mediana de supervivencia es más baja en los pacientes con tumores de mutación-positivos a este gen (Bendardaf, 2004), (Douillard et al., 2014).

Cuando se presentan mutaciones del ADN en cualquiera de los cromosomas el gen p53, conocido como “el guardián del genoma” induce que el ciclo celular se detenga en G1, esto con el fin de dar tiempo a que la mutación sea reparada o en caso contrario se induce la muerte celular por apoptosis, (muerte celular programada), de esta manera, p53 actúa como un gen supresor de tumores al interrumpir el crecimiento de células potencialmente malignas. Los daños en el gen p53 hacen que las mutaciones en el genoma persistan y se acumulen, lo que confiere el fenotipo de inmortalización celular del adenoma tardío y constituye el evento transformador hacia adenocarcinoma; para que esto ocurra el gen debe tener mutados ambos alelos por ser una condición recesiva. El valor pronóstico predictivo de la mutación del gen p53 varía de unos autores a otros, al igual que su

porcentaje de presentación en los casos de CCR humano, sin embargo todos coinciden en que es superior al 50% (Sinicrope et al., 2012), (Catalán, 2009), (López, 2011).

Existen otros genes específicos asociados al desarrollo del carcinoma de colon, uno de ellos, es el eliminador en cáncer de colon (DCC), el cual es un gen supresor de tumores, que tiene una función de adhesión celular y se ha encontrado principalmente asociado a los tumores hereditarios que son relativamente raros y a la detección de mutaciones de la línea germinal, que predisponen a CCR. La inactivación del gen DCC situado en el cromosoma 18 está asociada con la tumorigénesis y metástasis; una disminución en la expresión de DCC puede desempeñar un papel importante en la progresión del CCR y puede constituir un marcador biológico de importancia en el pronóstico. (Cancer Genome Atlas Network. , 2012).

La inestabilidad de microsatélites (MSI) se debe a las mutaciones en uno o más genes de reparación (MMR), que lleva al desarrollo de síndrome de cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC), Los genes MMR son responsables de reparar los errores en la replicación del ADN de uno o varios nucleótidos cuando ocurren durante la división celular normal, constituyendo un sistema de chequeo; hay seis genes identificados que participan en este proceso en humanos: hMLH1, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 y hPMS2. Cuando uno de estos genes es inactivado por mutaciones (de ambos alelos), el MMR no funciona, resultando en errores persistentes en la replicación del ADN. Las mutaciones en hMLH1 y hMSH2 son responsables de más del 95% de las mutaciones encontradas en el sistema MMR humano. La inactivación de los procesos del

MMR es otra vía de acumulación de mutaciones en la patogénesis del CCR, y en las mutaciones germinales de los genes MMR en el HNPCC. Se cree que las mutaciones de gen MMR pueden afectar muchos otros genes reguladores, acelerando la secuencia adenoma-carcinoma. Comparados con los adenomas esporádicos, los adenomas en personas con HNPCC ocurren en personas más jóvenes, tienden a ser más grandes y tienen un estado histológico más avanzado. En HNPCC se desarrollan sólo unos pocos adenomas porque no hay mutaciones germinales en el APC; las mutaciones en la vía del MMR pueden explicar que algunos adenomas esporádicos aparezcan y progresen más rápidamente. La secuencia displasia-carcinoma en enfermedad inflamatoria intestinal comparte algunas de estas mismas alteraciones moleculares. De estas mutaciones descritas, las mutaciones en el APC marcan el inicio de adenomas esporádicos y ocurren más tardíamente en las neoplasias asociadas a colitis y las mutaciones del p53, son eventos tardíos, sin embargo en los adenomas ocurren antes de que se reconozcan la displasia histológica. (Sánchez, 2005) (Goel, 2010) (López, 2011).

Estos hallazgos sugieren una vía molecular alternativa para la carcinogénesis en la inflamación crónica del colon, siendo la displasia el denominador final común. (Piña, 2015). Las alteraciones genéticas descritas son , de hecho, sólo una pieza de un rompecabezas más complejo; del cual hacen parte además las variaciones epigenéticas en otros genes relacionados con cáncer, ARN no codificantes que contribuyen también a la malignización neoplásica, en resumen, la y combinación de eventos genéticos y epigenéticos confieren a las células cancerosas una ventaja selectiva que resulta a su vez en la activación de distintas vías, que incluyen la inestabilidad genómica y la

repetición de microsatélites (MSI) dejando en claro la naturaleza molecular heterogénea del CCR (Pancione, 2012).

5.5. Formación de focos de criptas aberrantes (FCA)

Las criptas colónicas normales contienen células madre regenerativas que se encuentran en su base, las cuales a través de una serie de mecanismos dinámicos, sustituyen las células de la cripta normal, aproximadamente cada cinco días. La zona proliferativa normal, se encuentra en los dos tercios inferiores de la cripta, tanto en criptas normales como aberrantes y surgen a partir de una sola célula madre. La replicación de criptas normales y aberrantes se produce a través de un proceso llamado "fisión" que implica gemación basal, ramificación y finalmente la separación. Cuando fallan los mecanismos de control de la multiplicidad de la cripta si inicia la formación de FCA (Sanchez 2012) (Alrawi, 2006).

Los FCA, son una anomalía microscópica en la superficie de la mucosa colónica, identificadas por primera vez en roedores tratados con carcinógenos y subsecuentemente en el humano mediante el uso de colorantes y endoscopia con magnificación; Son la primera lesión neoplásica identificable en el modelo de carcinogénesis del colon, en el cual se da la progresión de FCA a pólipos adenomatosos y, posteriormente, a carcinoma, lo cual ocurre de forma paralela a la acumulación de alteraciones bioquímicas y de mutaciones genéticas y epigenéticas (Ghafar, 2012).

Las características histológicas de los os FCA tienen, anormalidades morfológicas y genéticas comunes a los adenomas y al CCR, lo cual apoya la noción de que estas lesiones son el primer paso en la progresión del cáncer (Alrawi, 2006). Desde la primera detección de FCA en ratones tratados con carcinógeno, la cual fue hecha por Bird en 1987, se maneja la hipótesis de que los FCA son los precursores más tempranos de CCR, por lo cual numerosos estudios se han centrado en esclarecer su origen y evolución. (Alrawi, 2006). Datos recientes indican que, algunos FCA, no evolucionan a adenomas, lo que confiere mayor importancia a su detección precoz y a la comprensión de su patogenia, lo cual da indicios de que se podría evitar la progresión de esta enfermedad. (Sánchez, 2012).

Los FCA en la mucosa colónica, pueden ser detectados mediante la aplicación de azul de metileno en la superficie epitelial. Morfológicamente son criptas anormales, elevadas por encima de la mucosa circundante, que se caracterizan por presentar un aumento del diámetro glandular, apertura luminal mayor o con forma de enmallado y espacio pericriptal aumentado, tienen el epitelio engrosado; hipercelular y con alteraciones en la mucina citoplasmática. Se han considerado lesiones preneoplásicas, pero microscópicamente su aspecto es heterogéneo y la mayoría son hiperplásicos y no asociados con displasia. (Won, 2012).

Los FCA son considerados como biomarcadores confiables en la evolución del CCR, y se han usado en numerosos ensayos, su valoración ofrece ventajas como un período de observación corto que permite evaluar el efecto de diferentes tratamientos, sin necesidad

de realizar ensayos a largo plazo, los cuales requieren grandes esfuerzos y puede exponer a los participantes en el estudio, a un mayor riesgo de desarrollo de carcinomas. Además, los FCA se pueden estimar cuantitativamente lo cual facilita llevar a cabo estudios preliminares en ensayos de quimioprevención (Higurashi, 2012).

Los modelos animales experimentales que emplean carcinógenos para inducir cáncer de colon, pueden inducir tipos de patrones de crecimiento de FCA altamente heterogéneos en número y multiplicidad de criptas, con características topográficas y número diferente. Para su estudio los FCA se clasifican en: hiperplásico (FCA-H), displásico (FCA-D) y no hiperplásico ni displásico (FCA-ND-NH). Las criptas displásicas, FCA-D, o microadenoma tienen una maduración heterogénea, albergando en toda la cripta células proliferativas que han perdido la polaridad nuclear, con núcleos alargados en forma de “cigarro”, hipercromáticos y estratificados, presentan disminución del número de células caliciformes, en la expresión de mucina y la actividad mitótica se realiza en toda la cripta. Las criptas hiperplásicas, (FCA-H), no presentan displasia, tienen 1.5 veces el tamaño de una cripta normal, presentan un ligero crecimiento y elongación del núcleo pero no estratificación ni depleción de mucina y una actividad mitótica limitada a las zonas más bajas de la cripta, tal y como sucede en el tejido normal. Las criptas ni displásicas, ni hiperplásicas, (FCA-ND-NH), corresponden a criptas normales, en las cuales no se presentan focos hiperplásicos o displásicos. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) simplifica la clasificación a dos categorías: FCA-H ó FCA-D. (Cossío, 2007) (Menéndez, 2012).

Genéticamente, los FCA-H tienen una mayor frecuencia de mutaciones en el proto-oncogen ras, y los FCA-D están asociadas a la mutación del gen APC, sin embargo, los FCA-D, son denominados microadenomas por la similitud histológica y genética que tienen con respecto a los pólipos adenomatosos y se considera que, la aparición de alteraciones genéticas y epigenéticas en los FCA-H, hace que evolucionen a FCA-D, y que de estas sólo una pequeña proporción desarrolle una lesión cancerígena (Menéndez, 2012), de esta manera las vías en ambos tipos de la clasificación llegan a cruzarse en algún momento de la carcinogénesis. Los cambios genéticos y epigenéticos secuenciales en los FCA durante la carcinogénesis, han sido ampliamente debatidos y muchos marcadores genéticos incluyendo oncogenes como K-ras y β - catenina se han utilizado para demostrar que los FCA son precursores de cáncer de colon, además de la medición de proteínas como las mucinas que también han sido empleados como buenos marcadores de lesiones preneoplásicas (Ali et al., 2012) La observación de la secuencia morfológica de los FCA, permite determinar su valor pronóstico y predictivo como indicador de progresión a la malignidad neoplásica (Greenspan, 2006).

5.6. Generalidades sobre las mucinas y su participación en el cáncer de colon.

Las mucinas (MUCs) son glicoproteínas de muy alto peso molecular compuestas principalmente por carbohidratos, que están presentes en el epitelio colónico y en los demás tejidos epiteliales glandulares o de revestimiento; participan en procesos de protección a factores ambientales al proveer lubricación al tejido, manteniendo la capa epitelial hidratada, lo cual constituye una barrera para agentes patogénicos y tóxicos, además se ha propuesto su participación en la renovación y diferenciación epitelial y en

la adhesión y señalización celular. (Larsson et al., 2013). Existen también otro tipo de MUCs, llamadas glicoproteínas similares a las MUCs (o en inglés *mucin like glycoproteins*) que están presentes en el endotelio vascular y otras que hacen parte de las MUCs propiamente epiteliales, presentes en linfocitos y células dendríticas. (Gajewski et al., 2013).

Las MUCs poseen variadas repeticiones en tándem de secuencias ricas en serina, treonina y prolina, llamadas dominio mucínico. Los grupos hidroxilo de treonina y serina proporcionan los sitios para la O- glicosilación extensiva de las mucinas maduras. Los oligosacáridos de estas glicoproteínas proporcionan entre 50-90% de su masa molecular, dependiendo del tipo de mucina y del patrón de las glicosiltransferasas expresadas en la célula de origen. Poseen una estructura en forma de brocha que es característica de estas proteínas ligadas a membrana, la cual está formada por cadenas laterales de carbohidratos, combinadas a los dominios en tándem de las repeticiones mucínicas, que en ocasiones se proyectan desde la superficie celular. El gran tamaño y su extensiva glicosilación tienen incidencia en su función (Romero, 2010).

La secreción de las MUCs es realizada desde la superficie apical de células epiteliales columnares especializadas, llamadas células caliciformes. Existen varios factores que participan en la liberación de las MUCs como hormonas, neuropéptidos, y mediadores inflamatorios, entre ellos citocinas y lípidos. En el humano, la capa de moco puede llegar hasta los 450 μm en el estómago y en el colon aumenta gradualmente hasta alcanzar hasta 285 μm en el recto (Gajewski et al., 2013).

Las MUCs se pueden dividir en dos subfamilias según su localización: MUCs gelificantes (secretadas), las cuales son enteramente extracelulares, carecen de un dominio transmembranal y se ubican en los espacios extracelulares, como son: MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8 y MUC19. Y las MUCs superficiales: Las cuales están asociadas a la membrana celular mediante un dominio transmembranal. Dentro de este grupo están la: MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 y MUC20 (Martínez D. C.-F., 2006).

Las MUCs también se pueden clasificar según su naturaleza química en: neutras, ácidas sulfatadas y ácidas no sulfatadas. Las MUCs neutras contienen unidades de hexosamina y hexosa, se expresan predominantemente en la mucosa gástrica, las MUCs ácidas, contienen unidades de hexosamina asociadas con ácido glucurónico, idurónico o siálico; se expresan en todo el epitelio intestinal y predominantemente en el intestino grueso las sulfatas tienen radicales sulfato, los cuales pueden ser detectados por métodos inmunohistoquímicos. Sin embargo la relevancia fisiológica de los subtipos de MUCs distintos no es bien entendida. Se sugiere que las MUCs ácidas protegen contra la translocación bacteriana, especialmente las sulfatadas (Ali, 2012).

En un estudio realizado por Martínez y colaboradores en 1994, para valorar la distribución espacial de las MUCs en ratones hembra en el primer año de vida, reveló: que en los primeros 28 días, se observaron MUCs neutras, ácidas y una mezcla de ambas en las células caliciformes de las vellosidades y criptas y en las siguientes edades se observaron

MUCs ácidas y mezcla de mucinas en las mismas estructuras, mientras que las MUCs neutras se restringieron a la base de las criptas al año de edad (Martínez L. R., 1994).

Para diferenciar los tipos de MUCs se han empleado técnicas de histoquímica, basándose en la afinidad química por ciertos colorantes, como el ácido periódico-de Schiff (PAS), el cual es usado para detectar hidroxilos contiguos, mucopolisacáridos neutros, el Azul Alcían (AB) pH 2.5, para demostrar grupos ácidos y mucopolisacáridos ácidos no sulfatados, el AB pH 1.0 para determinar mucopolisacáridos ácidos sulfatados y el AB-PAS usado para identificar grupos ácidos e hidroxilos contiguos, mucopolisacáridos ácidos y neutros (Zapata, 2013).

La composición de las MUCs secretadas, puede ser modificada por factores como edad, hábitos nutricionales, enfermedades bacterianas, parasitarias y enfermedades neoplásicas, inclusive algunos estudios han detectado que ciertas MUCs transmembrana son suficientes para inducir transformación tumoral en modelos animales, y por lo tanto representan dianas altamente atractivas para el tratamiento contra el cáncer, demostrando como paradójicamente, un mecanismo de protección para las células epiteliales, al expresarse de forma aberrante puede contribuir a la carcinogénesis (Imai Y, 2013).

La carcinogénesis es consecuencia de las señales químicas, físicas y biológicas que reciben las células, las cuales provocan modificaciones moleculares y estructurales que alteran el proceso vital de la célula (Sheu, 2008), por ejemplo los patrones de glicosilación

de las MUCs, corresponden a cambios en las estructuras glicosiladas o en el sector peptídico, siendo uno de los responsables de la evasión de la respuesta inmune antitumoral o bien del comportamiento invasivo de las células, asociado a la progresión neoplásica. Los nuevos fenotipos de las MUCs formadas por las modificaciones en los carbohidratos, pueden ser utilizados como marcadores moleculares usados en el diagnóstico temprano del CCR. Otro ejemplo es la mucina tipo 1 (MUC1), la cual en casos de cáncer puede presentar una forma hiperglicosilada, o también existe el caso donde la biosíntesis está incompleta dejando expuesto el antígeno Tn o el SLx, presentes en más del 90% de los carcinomas. (Martínez D. C.-F., 2006). Sin embargo la consecuencia biológica para la transformación de cada subtipo de MUCs es diferente (Romero, 2010), (Imai, 2013).

Varias líneas de investigación han demostrado otro tipo de modificaciones en las MUCs con incidencia en la carcinogénesis colónica, como son las alteraciones en las cantidades de sialomucinas y sulfomucinas, la disminución de la O-acetilación de ácidos siálicos y las alteraciones en la expresión de antígenos de grupos sanguíneos. Además se ha evidenciado que las MUCs juegan un papel importante en los procesos de progresión, invasión y metástasis tumoral y también en la supervivencia y la protección contra la respuesta inmune de las células tumorales, el aumento en la producción de mucina se produce en muchos adenocarcinomas, incluyendo cáncer de páncreas, pulmón, mama, ovario, colon y otros tejidos (Rabassa, 2005), (Corfield, 2000).

Las diferencias cuantitativas y cualitativas observadas mediante técnicas histoquímicas, en la distribución de las MUCs en los procesos neoplásicos del colon, han generado interés en trazar un mapa de esta distribución, el cual ayude a diferenciar de manera temprana, los procesos neoplásicos de las lesiones colorrectales. En tumores malignos, como los adenocarcinomas, por lo general se observa la pérdida de las células caliciformes, además de presentar cantidades variables de material mucoso, en el lumen de las estructuras neoformadas, las cuales cuando son más diferenciadas son bastante similares a glándulas normales. Adicionalmente, el producto de secreción es principalmente MUCs neutras mezcladas con algunas no sulfatadas y MUCs sulfatadas en muy poca cantidad. En los tumores benignos epiteliales, como los pólipos metaplásicos, la distribución de las MUCs cualitativamente es similar a la de la mucosa normal, MUCs sulfatadas en la parte inferior de la cripta y no sulfatadas y neutras en la parte superior de la cripta y en el epitelio de revestimiento), mientras que en los pólipos adenomatosos las MUCs producidas son heterogéneas tanto cualitativa como cuantitativamente en todas las zonas de la cripta.

En los tumores papilares, la parte superior de la papila muestra menos material secretorio que la zona media y en la zona inferior las MUCs son variables con predominio muy débil de MUCs sulfatadas. En resumen se podría afirmar que a medida que la transformación maligna progresa se evidencian escasas MUCs mixtas con predominio de MUCs sulfatadas y neutras, las cuales van disminuyendo hasta parecer granulaciones finas, llamadas "anillos" (Usman, 2012) (Corfield, 2000).

El conocimiento sobre el comportamiento de las MUCs que se ha logrado obtener hasta el momento, permite pensar la posibilidad de que éstas sean consideradas objetivos farmacológicos y que la modificación de su presentación podría mejorar el pronóstico en el cáncer (Imai Y, 2013).

5.7. Los Radicales libres y la quimiopreención en el CCR

Se cree que el equilibrio entre la oxidación y antioxidación es crítico en el mantenimiento de los sistemas biológicos sanos. Los procesos de oxidación hacen parte de la maquinaria celular y sus procesos metabólicos, en los cuales se forman los radicales libres. Los radicales libres forman distintas ERO en el interior de las células, en un proceso aleatorio que no supera normalmente el 3-5% de las transformaciones de oxígeno en la cadena respiratoria. La mayoría de las especies reactivas de oxígeno cumplen un papel fundamental en la síntesis de ATP y en otras reacciones fisiológicas, pero su exceso, resulta altamente perjudicial para las células. Por eso, cada especie reactiva de oxígeno cuenta con uno varios sistemas de eliminación fisiológicos, que al alterarse pueden generar estrés oxidativo (Bouayed, 2012).

Los radicales libres que contienen el elemento oxígeno, son el tipo más común de radicales libres y son llamados especies reactivas de oxígeno (ERO), e incluyen los aniones superóxido (O_2^-), los grupos hidroxilo, los radicales (OH^-), los radicales alcoxilo (RO^-) y los peroxiradicales (ROO^-). La producción de ERO puede verse aumentada por toxinas ambientales, o por exposición a radiaciones ionizantes. Las ERO a altas

concentraciones pueden ser peligrosos y dañar componentes celulares, incluyendo proteínas, membranas celulares y el ADN. El daño a las células causado por los radicales libres, especialmente el daño al ADN, puede desempeñar un importante papel en el desarrollo del cáncer y otras condiciones patológicas, razón por la cual existe una demanda continúa de antioxidantes exógenos para prevenir el estrés oxidativo, el cual representa un estado de desequilibrio a favor de la oxidación. El estrés oxidativo está implicado en el proceso de envejecimiento, así como en una amplia gama de condiciones patológicas, como la aterosclerosis, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares (ECV), las enfermedades neuropsiquiátricas, las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer (Bohn, 2010), (Bouayed, 2012).

Los antioxidantes son sustancias químicas que interactúan con las ERO cediendo sus electrones a los radicales libres neutralizándolos y evitando así que causen daños. Por esta razón Los antioxidantes también se conocen como "eliminadores de radicales libres". Algunos antioxidantes son producidos de manera endógena, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), el glutatión peroxidasa (GPx), el glutatión (GSH), entre otros y otros que son obtenidos de fuentes exógenas y pueden estar incluidos en la dieta, contenidos en Frutas, verduras y granos o en suplementos dietéticos, tales como El β - caroteno, el licopeno, los polifenoles, las vitaminas A, C y E (alfa- tocoferol) y el selenio. Diversos estudios *in vivo* han demostrado que los antioxidantes exógenos, pueden ayudar a prevenir el daño ocasionado por las ERO asociado al desarrollo del cáncer, sin embargo los estudios en humanos no han demostrado de manera convincente

que el tomar suplementos de antioxidantes pueda ayudar a reducir el riesgo de cáncer (Bohn, 2010).

El desarrollo del cáncer en los seres humanos es un proceso complejo que incluye cambios celulares y moleculares mediados por diversos estímulos endógenos y exógenos. Es bien establecido que el daño oxidativo del ADN es uno de los responsables en el desarrollo del cáncer. La Iniciación y promoción del cáncer se asocian con defectos cromosómicos y activación de oncogenes inducida entre otros, por los radicales libres. Una forma común de daño es la formación de bases hidroxiladas en el ADN, esta formación de bases erradas interfiere con el crecimiento normal de las células dando origen a mutaciones genéticas al producir la alteración de la transcripción de genes normales. El daño oxidativo del ADN es causado por una multiplicidad de modificaciones en su estructura incluyendo lesiones en las bases y azúcares, la ruptura de las cadenas de ADN, genera la producción de bases libres que más tarde darán origen a mutaciones (Pham, 2008) (Kundu, 2014).

En la génesis del cáncer participan dos factores; la existencia de células con alteraciones genéticas y su interrelación con el ambiente que las sostiene, de allí surge la primicia de que al cambiar las condiciones del ambiente celular se pueden modificar aspectos del comportamiento neoplásico tales como el crecimiento, invasión y metástasis. Se ha reconocido que el desarrollo del cáncer de colon ocurre en etapas secuenciales de pólipos a adenocarcinoma, lo cual puede tomar mucho tiempo, se estima que esto ocurre entre 10 a 17 años. Este descubrimiento revela la enorme oportunidad que existe, a la

cual se le denomina ventana terapéutica, para prevenir la enfermedad o retrasar su progreso. De hecho, se ha demostrado que el cáncer de colon es el único cáncer que puede ser prevenido mediante la selección adecuada de la dieta y llevando un estilo de vida adecuado. El tratamiento más eficaz para el cáncer de colon es todavía la extirpación quirúrgica, sólo aquellos pacientes cuyo tumor no se puede extirpar deben ser tratados con quimioterapia y radioterapia, pero infortunadamente, la tasa de supervivencia para el cáncer de colon metastásico está por debajo del 10%. Todo esto hace que sea necesario entender cada vez mejor la biología del cáncer de colon, con miras a desarrollar estrategias terapéuticas y quimiopreventivas eficaces (Menéndez, 2012).

La quimiopreención del cáncer puede definirse como la inhibición, retraso o inversión del proceso carcinogénico, mediante recursos químicos (Toshiya et al., 2012). La mayoría de ensayos se centran en la prevención de la carcinogénesis en un estadio pre maligno o en una fase inicial de malignidad, lo cual se conoce como quimiopreención “primaria” o “secundaria”, dependiendo si implica individuos normales o de alto riesgo. El tratamiento con agentes quimiopreventivos de pacientes que han sido tratados con éxito, contra una enfermedad neoplásica primaria, pero que tienen un riesgo incrementado de padecer una segunda neoplasia, se denomina quimiopreención “terciaria”. La definición original del término quimiopreención abarca también la inhibición del crecimiento y el retraso de la progresión del cáncer. El concepto de quimiopreención no es nuevo, durante muchas décadas, han sido utilizados agentes químicos para prevenir diferentes patologías, en el caso del cáncer, se han realizado numerosos estudios y han sido

identificados algunos agentes eficaces para prevenir o retardar la progresión de la enfermedad neoplásica (Sharma, 2011).

Los primeros argumentos para la quimioprevención en CCR se basaron en la aparición de estudios epidemiológicos y observacionales que indicaban que el tratamiento a largo plazo con aspirina, un inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa (COX), podría reducir la mortalidad por CCR. También algunos estudios epidemiológicos han indicado que factores ambientales, especialmente dietéticos, parecen influir en los riesgos de los individuos de desarrollar CCR, tales como las dietas pobres en vegetales y folatos, y ricas en grasas, las carnes rojas y el alcohol, las cuales parecen incrementar al doble el riesgo relativo de presentar CCR. Por ejemplo, la ingesta de carne roja puede doblar el riesgo de presentar de CCR, por el contrario algunos estudios prospectivos de cohortes, han confirmado el papel protector de altas dosis de folato, pero han fracasado en comprobar otros efectos de la alimentación en la evolución del CCR, como lo es el posible beneficio de la fibra dietética (Riestra, 2007), (Sharma, 2011).

Otros estudios de casos y controles han demostrado que la ingesta de frutas, vegetales y fibra en general podrían generar una disminución del riesgo de CCR, se han descrito algunas evidencias epidemiológicas, como una menor incidencia de CCR en sociedades subdesarrolladas, en las cuales hay una importante ingesta de fibra, además hay teorías basadas en que esto se debe a que el estímulo de un tránsito intestinal acelerado podría impedir el contacto de los carcinógenos con la mucosa del colon, sin embargo, otros

estudios han mostrado resultados discordantes (efecto beneficioso en unos y ningún efecto en otros (Hu, 2011).

La mayoría de las frutas y verduras contienen antioxidantes vitaminas y minerales, además carotenoides (precursores de la vitamina A), retinoides (Vitamina A), ácido ascórbico, tocoferol (vitamina E), y selenio que pueden neutralizar los radicales libres, reduciendo así el estrés oxidativo intrínseco y cancerígeno, que inducen agresión al ADN. Algunos estudios sugieren que los antioxidantes pueden inhibir la tumorigénesis mediante la estimulación de la respuesta inmune (Hawk, 2004).

La fibra es otro de los componentes importantes de los alimentos, que ha demostrado influir en la carcinogénesis del CCR; la cual se define como la fracción crudamente dietética, que es resistente a la digestión y la absorción humana. Aunque no es estrictamente un agente quimiopreventivo se considera que puede ayudar a reducir el desarrollo de CCR por diferentes mecanismos, como aumentar la masa fecal y estimular el tránsito intestinal, reduciendo de este modo la exposición del epitelio intraluminal a carcinógenos. La fibra dietética también reduce pro carcinogénicos secundarios a ácidos biliares y aumenta la concentración de los ácidos grasos de cadena corta . Sin embargo a pesar de la evidencia donde se ha determinado que la suplementación con fibra proporciona otros beneficios para la salud (por ejemplo, la reducción de enfermedad cardiovascular y un mejor control de la glicemia), la fibra por si sola parece tener poco o ningún beneficio consistente en reducir el riesgo de CCR (Murphy et al., 2012) (Riestra, 2007).

Adicionalmente, los compuestos fenólicos antioxidantes, al eliminar los radicales libres, pueden formar radicales fenoxilo menos reactivos. Está bien establecido que uno de los mecanismos quimiopreventivos de los polifenoles (contenidos en frutas y verduras) contra el desarrollo del cáncer, es la inhibición de la iniciación; El primer paso de la carcinogénesis después del daño oxidativo del ADN que da lugar a la mutagénesis. En una revisión reciente, se demostró como la actividad antioxidante de los polifenoles y su capacidad para inducir la disfunción mitocondrial y por lo tanto la apoptosis ha sido sugerido como un mecanismo posible contra el cáncer (Bohn, 2010).

Algunos estudios sobre cáncer de estómago han evidenciado algunos efectos benéficos de la vitamina C como quimiopreventivo (Jenab 2006). Se ha demostrado por ejemplo su capacidad para modular la cinética del crecimiento celular, efecto antimicrobiano contra el *Helicobacter Pylori*, y la inhibición de la formación de carcinógenos, como compuestos nitrogenados (Bouayed, 2012).

Por su parte, investigaciones sustentan que los polifenoles también son capaces de ejercer efectos moduladores en las células, dependiendo de las vías carcinogénicas activadas, por ejemplo, mediante la interacción con las cascadas de señalización intracelular, en las que interviene el factor nuclear kappa B (NFkB) y con la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)) o mediante la unión a los sitios de unión a ATP de un gran número de proteínas, incluyendo, ATPasa mitocondrial, calcio ATPasa de la membrana plasmática, la proteína quinasa A, proteína quinasa C y la

topoisomerasa. También se ha puesto de manifiesto que algunos antioxidantes, como la, la quercetina y la naringenina son capaces de inhibir ciertas enzimas del citocromo P450, la CYP1A1 y la CYP3A4, respectivamente, las cuales están involucradas en la bioactivación de carcinógenos químicos, lo que constituye otro mecanismo quimiopreventivo (Bohn, 2010).

En resumen, los efectos ventajosos de las propiedades antioxidantes de los alimentos (fitoquímicos y nutrientes) sobre la salud humana, se producen debido a su capacidad para inhibir la peroxidación de lípidos y la oxidación de otros biocomponentes celulares sensibles, incluyendo ADN y proteínas. Varios estudios *in vitro* han mostrado el efecto antimutagénico y anticarcinogénico de los antioxidantes, en diferentes niveles de desarrollo del cáncer, es decir, la iniciación, la promoción y la progresión; Por ejemplo, la galato de epigallocatequina (EGCG) tiene la capacidad de inhibir la activación de procarcinógenos por medio de enzimas de fase I y también puede inducir la desintoxicación de cancerígenos por medio de enzimas de fase II, lo que facilita su excreción tras su conjugación (Dufresne y Farnworth 2001). Curiosamente, el ácido rosmarínico, un polifenol dietético, ha expuesto otro mecanismo de protección contra daños oxidativos del ADN *in vitro*, mediante la mejora de la reparación del ADN y los polifenoles del té, también han demostrado tener cierto efecto benéfico en la prevención e la progresión del cáncer (Silva, 2008).

Se cree que los hábitos, que muestran una "occidentalización" de la dieta (por ejemplo, alto consumo de calorías y grasas y limitada ingesta de alimentos de origen vegetal) ha

llevado a un rápido aumento de la mortalidad debido a la presentación de diferentes tipos de cáncer en una década (1990-1999), incluyendo cáncer de pulmón (por 53 %), de mama (37 %), páncreas (63 %), próstata (200 %) y el colon (75 %). Estos tipos de cáncer son menos fatales cuando se consumen dietas basadas en vegetales, destacando así el efecto preventivo de los alimentos vegetales contra el desarrollo del cáncer (Bouayed, 2012).

5.8. Mango de azúcar, *Mangifera indica* y curuba larga *passiflora molissima*, como agentes quimiopreventivos

El mango de azúcar contiene numerosos compuestos que han demostrado tener propiedades antioxidantes. Estos compuestos, en su mayoría polifenoles y galatoninos, están ligados a una actividad anticancerígena y antiinflamatoria. Los galatoninos son compuestos de alto peso molecular que están compuestos de unidades de ácido gálico unido a glucosa por medio de un enlace glicosídico. (Talcott, 2009). La presencia de un alto contenido de compuestos polifenólicos, galatoninos y carotenoides, así como las evidencias antineoplásicas de extractos *Mangifera indica*, sugieren que es un potencial candidato quimiopreventivo (Maldonado, 2011), tal como se evidenció en estudios previos para otras especies de mango de azúcar tales como *Kent*, *Francis* y *Tommy Atkins* y *Ataulf*, los cuales inhibieron *in vitro* el crecimiento de células de CCR hasta en un 72% sin afectar el crecimiento de las células normales del colon y promoviendo la apoptosis de las células alteradas (Baker, 2010).

Con respecto a *Passiflora molissima*, no se tienen evidencias de su potencial antitumoral, sin embargo, su alto contenido de antioxidantes comparado con otras frutas tropicales como la mora, la fresa, la piña, el mango de azúcar, la guayaba, el melón, el tomate de árbol, entre otras, sugieren que esta fruta podría tener propiedades quimiopreventivas. Los metabolitos secundarios con características polifenólicas, son determinantes en la actividad antioxidante de las frutas y la cantidad encontrada para los extractos acuosos de la curuba larga, son mucho mayores que los reportados para la mayoría de los vegetales de muchas latitudes reportadas, incluidas diversas frutas, granos y legumbres.

Los taninos condensados hallados en la curuba larga fueron muy superiores a los reportados para cacao, té, algunos arándanos y otras frutas. Los flavonoides de la curuba larga, también se encontró que son muy superiores, comparados con diversos extractos de plantas y frutas. En conclusión, la curuba larga es una fruta que tiene una alta capacidad para atrapar los radicales libres peroxilos ($\text{ROO}\bullet$), hidroxilos ($\text{OH}\bullet$), superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$) y en general las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS). Una ingesta de 100 ml de jugo de curuba larga aporta la cantidad suficientes para mantener un buen equilibrio oxidativo (Rojano, 2012). Por lo tanto, obtener evidencias de efectividad contra el cáncer de colon, podrá contribuir a promover un mayor consumo de esta fruta en la población general (Maldonado, 2011).

5.9. El modelo animal

La elección de un modelo experimental se hace con base a la pregunta de investigación que se plantee, esta puede estar orientada a dilucidar diferentes tópicos sobre el CCR, tales como: la historia natural de la enfermedad, el efecto de quimioterápicos, la influencia de dietas, la quimioprevención, y los métodos quirúrgicos. El modelo de CCR inducido con AOM en roedores, es ampliamente usado para estudiar y predecir la eficacia quimiopreventiva en humanos, ya que este modelo reproduce en pocos meses todas las etapas de la carcinogénesis esporádica del colon que se desarrolla en el hombre, el cual representa el 80% del cáncer de colon en humanos (Maldonado, 2011).

El modelo animal de inducción de CCR con AOM es simple, reproducible y ampliamente utilizado, comparte muchas características histológicas con las lesiones encontradas en humanos, pero tiene una historia natural diferente al del CCR en humanos y no es adecuado para estudiar la formación de metástasis, ya que éstas tardan mucho en desarrollarse y probablemente el animal muere antes de que la metástasis ocurra o se dan con muy poca frecuencia, sin embargo, este modelo es ideal para estudiar algunos aspectos, tales como la influencia de la dieta en el desarrollo tumoral y los modelos terapéuticos (Hernández, 2015), (Carmona, 2009).

El AOM puede ser administrado tanto vía subcutánea como IP mediante inyecciones semanales de 7 a 15 mg/kg de peso, durante 10 a 12 semanas en ratas o ratones de varias edades. La inducción IP provoca tumores específicamente en el colon distal, replicando la patogénesis del CCR en humanos. El carcinogénico induce mutaciones en

el ADN; promoviendo el intercambio en los nucleótidos de Guanina (G), Citocina (C), Adenina (A), Timina (T), y baja MSI. (Zamorano-E, 2008). Las lesiones epiteliales inducidas inician con la aparición de los FCA, observados también en el CCR humano. En los ratones Los FCA se transforman en pólipos adenomatosos al cabo de diez a catorce semanas, y seis meses después en adenocarcinomas, esto producto de la acumulación sucesiva de alteraciones genéticas, las cuales llevan a la progresión de la neoplasia a carcinoma en la región más distal, con una distribución similar a la ocurrida en el hombre (Hernández, 2015).

El AOM no interacciona directamente con el ADN; tiene que ser activado *in vivo* para el desarrollo de la carcinogénesis, para lo cual debe ser metabolizado por el citocromo P450, específicamente la isoforma CYP2E1. El primer paso es la hidroxilación del grupo metilo del AOM para formar metilazoximetanol (MAM), este a continuación, se descompone en formaldehído y un grupo alquilante altamente reactivo; La metildiazona, que a su vez es responsable de causar la alquilación del ADN, metilando la guanina y la tiamina. Estas mutaciones pueden iniciar la tumorigénesis, activando varias vías de señalización intracelular (Carmona, 2009).

Existen varias vías de activación para explicar el mecanismo de cáncer de colon inducido por AOM, ya que hasta ahora no hay un mecanismo unificado que explique este modelo, las vías más ampliamente dilucidadas son: K -ras, β - catenina y Vía del Factor de crecimiento transformante – β (TGF β). (Carmona, 2009).

5.9.1. Vía K-ras. El AOM causa la transversión de G: C a A: T, esta mutación provoca la activación de la proteína K-ras, la cual es una pequeña proteína que regula las vías de señalización intracelular de MAPK y PI3K/Akt, que, a su vez, regulan el crecimiento celular, proliferación y metabolismo de la glucosa. Ambas vías juegan un papel importante en la carcinogénesis de muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de colon (Sinicrope FA et al., 2012).

La activación de PI3K/Akt puede aumentar vías de supervivencia celular a través de fosforilación de otras proteínas como son el factor NFkB y Bcl - xl. PI3K /Akt también bloquea el gen p53 para disminuir la apoptosis. En la vía del ciclo celular, PI3K/Akt desactiva el glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) y promueve la ciclina D1 y Myc para aumentar la proliferación celular. En la vía del crecimiento celular, PI3K/Akt activa la rapamicina (mTOR), para aumentar el tamaño de las células. La vía PI3K/Akt, COX2 también se ha demostrado estar involucrados en la carcinogénesis inducida por AOM. Por otro lado el Ras activado estimula la serina / treonina proteína – selectiva quinasa: (Raf quinasa), que es un oncogén. La proteína codificada tiene dominios reguladores y quinasa. Ras se une a CR1 en el dominio regulador y fosforila CR2, que es rico en serina /treonina. Esto conduce a la activación de CR3 en la región quinasa .A continuación, se activa MAPK y ERK quinasa (MEK), este complejo activa la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y ERK. MAPK ERK y promueven la carcinogénesis a través de las proteínas diana: c - Myc, CREB, RSK, MCL1, p16, Rb y ciclinas. La sobre-expresión de los promotores del ciclo celular, ciclina D1, participan en las etapas tempranas de carcinogénesis en el modelo AOM (Smith et al, .2002).

5.9.2. Vía de la β - catenina: La β - catenina desempeña un papel importante en la adhesión celular y también es una proteína oncogénica. Se asocia con una cadherina - catenina para mantener el citoesqueleto de actina. También es un coactivador transcripcional de genes en la vía de señales Wnt .En la forma libre, se asocia con las proteínas de andamiaje, axin y APC, y es fosforilada por GSK- 3β , lo que genera la degradación por el proteosoma. En la mayoría de casos del cáncer (el 80 % de los pacientes con cáncer de colon esporádico), los pacientes presentan mutaciones en el gen APC y un APC mutado no se pueden unir a la β - catenina para el normal funcionamiento. El extremo N-terminal de la β – catenina también puede estar mutado en algunos casos, de modo que β - catenina no puede formar el complejo para ser degradado por el proteosoma. Lo cual genera que la β – catenina libre se incremente y se una con el factor potenciador linfocitario de células T factor potenciador TCF / LEF para formar un complejo que activa la transcripción de genes y proliferación celular. El Azoximetano también puede causar mutaciones en la β - catenina lo que conlleva a su acumulación para contribuir en la carcinogénesis. (Smith et al, .2002), (Sinicrope FA et al., 2012).

5.9.3. Vía del Factor de crecimiento transformante – β TGF β : Los defectos en la señalización de TGF β se han encontrado en el 20-30 % de los casos de cáncer de colon. La TGF - β induce la apoptosis a través de varias vías de señalización. En primer lugar, la forma TGF β dimérica se une a un receptor estos asociados en un complejo y fosforilan su receptor tipo 1, quien a su vez fosforila el receptor regulado SMAD (R- Smad) para

causar apoptosis. Además activa a su receptor tipo 2 que se une a la proteína asociada a la muerte 6, para inducir apoptosis (Smith G et al, .2002), (Sinicrope FA et al, . 2012).

El modelo experimental con AOM tiene algunas limitaciones, ya que algunos cambios en la carcinogénesis del cáncer de colon humano no son imitados fielmente, tal como la mutación de p53, y los cambios en las vías de señalización, como GSK y mTOR, que deben ser mejor caracterizados. A pesar de esto y debido a que en el desarrollo CCR deben pasar cerca de 10 a 17 años, desde la aparición de los primeros cambios preneoplásicos hasta el carcinoma, esto genera que exista una gran oportunidad, de prevenir esta enfermedad mortal. Numerosos estudios han revelado que existen muchos agentes quimiopreventivos que han demostrado tener un efecto positivo en la prevención y disminución de las lesiones en el CCR, por eso el modelo AOM adquiere un valor significativo aun mayor para el estudio de compuestos potencialmente útiles (Huang, 2009).

6. Cuerpo del trabajo

6.1. Artículo para publicación

De la presente investigación se derivó un artículo para publicación que incluye los resultados finales del trabajo, además contiene todos los aspectos metodológicos, discusión y conclusiones para dar cumplimiento a todos los objetivos de la investigación. A continuación se presenta dicho artículo:

Efecto de *Mangifera indica* y *Passiflora molissima* sobre los cambios preneoplásicos en un modelo experimental de cáncer de colon

Effect of *Mangifera indica* and *Passiflora molissima* on preneoplastic changes in an experimental model of colon cancer

Clara Inés Gil¹, Berardo de Jesús Rodríguez¹, María Consuelo. Ramírez¹, María Elena Maldonado²

*Grupo de Investigación en Patobiología Quirón Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia*¹ *Grupo Impacto en Componente de los Alimentos en la salud, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia*².

Resumen

Introducción: Se desconoce el efecto del consumo del mango de azúcar (*Mangifera indica*) y de curuba larga (*Passiflora molissima*) sobre la cantidad de las células inflamatorias, las mucinas intestinales y los Focos de Criptas Aberrantes en modelos *in vivo* de carcinogénesis colorectal. **Objetivo:** Determinar las propiedades quimiopreventivas de *M. indica* y *P. molissima*. **Materiales y métodos:** Se emplearon ratones inducidos y no inducidos con el carcinógeno Azoximetano (AOM) en este estudio. Se les suministró concentraciones variables de *M. indica* y *P. molissima* como líquido de bebida, antes o después de la inducción con Azoximetano. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados para obtener muestras del colon. Los tejidos fueron coloreados con Hematoxilina-Eosina y tinciones histoquímicas para la observación de mucinas. Se realizó un análisis histomorfométrico y se determinó la cantidad de Focos de Criptas Aberrantes, leucocitos, células caliciformes (con mucinas neutras y ácidas, sulfatadas y no sulfatadas) y número de mitosis. **Resultados:** El consumo regular de *M. indica* disminuyó la producción de focos de criptas aberrantes hiperplásicas, la cantidad de neutrófilos y linfocitos, la expresión de mucinas ácidas y el número de mitosis, además, generó un aumento en el número de mucinas neutras ($p > 0,05$). No se observaron efectos significativos con el consumo de *P. molissima*. **Conclusiones:** Este estudio evidencia el efecto preventivo y terapéutico de *M. indica* sobre la inducción de lesiones pre-neoplásicas en colon en modelo murino de carcinogénesis inducida con Azoximetano.

Palabras clave: Antioxidantes, cáncer, células caliciformes, histoquímica, quimioprevención.

Summary

Introduction: The effect of the ingestion of sugar mango (*Mangifera indica*) and long curuba (*Passiflora molissima*) over the quantity of inflammatory cells, intestinal mucins, and the Aberrant Crypt Foci (ACF) in *in vivo* models of colorectal carcinogenesis, is unknown. Objective: To determine the chemopreventive properties of *M. indica* and *P. molissima*. **Materials and methods:** Carcinogenic azoximetane (AOM)-induced and non-induced mice were used in this study. Variable concentrations of *M. indica* and *P. molissima* were supplied as beverage liquid, before or after the induction with AOM. Later, mice were euthanized to obtain colon samples. Tissues were colored using Hematoxylin-Eosin (HE) and histochemical staining for mucins observation. A histomorphometric analysis was done to determine the quantity of ACF, leukocytes, caliciform cells (with neutral and acid, sulfated and non-sulfated), and mitosis number. **Results:** The regular consumption of *M. indica* decreased the production of hyperplastic ACF, the quantity of neutrophils and lymphocytes, the expression of acid mucins, and the number of mitosis, it also promoted the number of neutral mucins ($p>0.05$). No significant effects were observed with the consumption of *P. molissima*. **Conclusions:** A preventive and therapeutic effect of *M. indica* over the induction of pre-neoplastic lesions in colon in a murine model of carcinogenesis AOM-induced AOM.

Keywords: *antioxidants, cancer, caliciform cells, histochemistry, chemoprevention.*

Introducción

El cáncer colorectal humano (CCR), causa cada año en el mundo más de 1 millón de nuevos casos, siendo esta la tercera neoplasia más frecuente y la cuarta causa más común de mortalidad por cáncer en todo el mundo (1). Entre los factores de riesgo para el CCR, se incluyen mutágenos ambientales, hábitos alimenticios, comensales intestinales específicos y la inflamación intestinal crónica. (2).

Los FCA constituyen una anormalidad microscópica en la mucosa colónica y son la primera lesión preneoplásica identificable tanto en el modelo murino de carcinogénesis del colon como en las lesiones en humanos (3). Esta lesión se caracteriza porque morfológicamente son criptas anormales, elevadas por encima de la mucosa circundante, presentan aumento del diámetro glandular, apertura luminal mayor o con forma de enmallado y espacio pericriptal aumentado, tienen el epitelio engrosado; hiper celular y con alteraciones en la mucina citoplasmática (4). Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) simplifica la clasificación en dos categorías: FCA hiperplásicas y FCA displásicas (5, 6). El uso de modelos animales en el estudio del CCR, ha permitido obtener una mejor comprensión sobre sus mecanismos de desarrollo y patogénesis (7)

El modelo experimental de inducción de CCR con AOM genera un aumento en los niveles de radicales libres de oxígeno, que pueden causar daño genotóxico en las células colónicas, lo cual lleva a la transformación progresiva del epitelio normal, y a la expresión alterada de mucinas (MUCs) (7). Las técnicas de histoquímica permiten establecer mapas de distribución de las MUCs, lo cual podría contribuir en la diferenciación de alteraciones preneoplásicas, que puedan ser detectadas desde el inicio de la patogénesis tumoral (8).

Se ha demostrado que algunas frutas y vegetales contienen antioxidantes, vitaminas, minerales y otras sustancias como los carotenoides, flavonoides y retinoides capaces de neutralizar los radicales libres (9). Algunos estudios sugieren, que los antioxidantes pueden inhibir la tumorigénesis mediante la estimulación del sistema inmune (10). Colombia es un país tropical con gran variedad de frutas, ricas en antioxidantes (11), entre ellas *M. indica* y *P. Molissima*, para las cuales estudios previos han demostrado su potencial como antioxidante (12,13). Pero no existen estudios *in vivo* que evidencien que los componentes de estas dos frutas puedan generar algún efecto sobre el comportamiento del CCR.

En este estudio se usó un modelo murino de carcinogénesis con AOM para evaluar el efecto preventivo y terapéutico de *M. indica* y *P. molissima* sobre la inducción de lesiones preneoplásicas en el colon.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las frutas utilizadas pertenecen a la variedad mango de azúcar, *Mangifera indica* proveniente de la costa Caribe colombiana y a la familia *Passifloraceae*, variedad curuba larga, *Passiflora mollissima*, del municipio de Sonsón, Colombia. Se seleccionaron las frutas maduras por inspección visual según la norma técnica colombiana NTC 5139 para *M. indica* y NTC-1262 para *P. mollissima*; estas se lavaron, desinfectaron (hipoclorito de sodio 100ppm). Luego por medio del colorímetro Color Analyzer Probe, LT Lutron RGB – 1002 se obtuvo las coordenadas según el sistema RGB (Red, Green, Blue); estos valores fueron convertidos a escala CIELAB en un convertidor de color en la web: www.workwithcolor.com/color-converter-01.htm. Las frutas maduras fueron seleccionadas, escaldadas y despulpadas. La pulpa se almacenó a -18°C y se deshidrató por liofilización. Se evaluó su calidad microbiológica mediante conteo total de bacterias mesofílicas aerobias, hongos y levaduras, cuenta de Coliformes totales y fecales, según NTC 4458 de 1998; y *Salmonella* sp, para evaluar *Salmonella* según NTC 4574; y no se obtuvo crecimiento microbiano en el producto final. Se preparó diariamente el extracto en agua como líquido de bebida para los animales.

Consideraciones éticas

El protocolo de experimentación utilizado, fue aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia (Acta No. 69/ Junio-11).

Tipo de estudio

Se hizo un estudio experimental, con cuatro experimentos, con concentraciones variables de extracto de *M. indica* y *P. molissima* y la inducción de cáncer de colon con AOM en ratones tipo BALB/c.

Animales y condiciones de alojamiento

Para los experimentos uno y dos se emplearon 64 ratones BALB/c, hembras, de 6 semanas de edad, cuyo peso osciló entre 16 y 24 gr, resistentes a la aparición de cáncer de colon esporádico. Para los experimentos tres y cuatro, se emplearon 18 ratones con las mismas especificaciones. Los animales fueron obtenidos del Bioterio de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) y mantenidos conforme a Ley 84 de 1989, Res No. 8430 de 1993 en Colombia y a la legislación internacional (Consejo de las Comunidades Europeas y Canadian Council on Animal Care, 1998) para la manipulación de animales de experimentación. Los ratones se alojaron en cajas, a una temperatura de 22-25°C con un ciclo de 12 horas luz/oscuridad con acceso a agua o a la bebida reconstituida de fruta y alimento concentrado (*ad libitum*).

Experimentos 1 y 2, Determinación de la concentración efectiva de las bebidas de fruta reconstituidas: Se consideró concentración de bebida reconstituida efectiva; a aquella capaz de reducir o inhibir la aparición de lesiones precancerosas (FCA) sin producir reacciones adversas en los animales.

El experimento 1 se realizó para determinar si el suministro de la bebida reconstituida de mango de *M. indica*, incide en el número de células inflamatorias, la aparición de lesiones, preneoplásicas, neoplásicas y en el número de células secretoras de mucinas

colónicas en ratones BALB/c, tratados y no con AOM. En el experimento 2 se determinaron las mismas variables descritas con el consumo de extracto de *P. molissima*. En ambos experimentos se conformaron ocho grupos, compuestos por cuatro ratones cada uno, seleccionados al azar, a cada grupo se suministró una concentración (C) diferente de bebida reconstituida de fruta (C1: 0% = agua destilada (grupo control), C2: 0.3%, C3: 0.6%, C4: 1.25%) *ad libitum*, como único líquido de bebida, durante tres semanas.

Luego, cada grupo de los mencionados anteriormente se separó de manera aleatoria en dos grupos, así la mitad de los ratones de cada concentración de bebida de fruta recibió inyecciones intraperitoneales (IP) de AOM (5mg/Kg) y la otra mitad recibió inyecciones IP de buffer fosfato salino PBS, (grupo control), una vez por semana, durante dos semanas consecutivas, después de esto, se continuó la administración de la bebida reconstituida de fruta o agua destilada respectivamente.

La concentración efectiva de bebida de fruta reconstituida obtenida, fue la concentración al 0.3 % para *M. indica* y al 0.6 % para, *P. molissima*; estas concentraciones demostraron reducir o inhibir la aparición de lesiones precancerosas (FCA) sin producir reacciones adversas en los animales, de acuerdo a lo comunicado por Correa et al, 2014 y Chaparro et al., 2014 en estudios alternos.

Experimentos 3 y 4: Determinación de la capacidad de inhibición en la progresión de FCA con el consumo regular de las bebidas cuando se suministran después de la inducción con AOM. Un nuevo grupo de 18 ratones recibió inyección IP de AOM (5 mg/Kg) una vez por semana durante dos semanas. Una semana después de la última

inyección de AOM, los ratones se separaron aleatoriamente en tres grupos; un grupo de 6 individuos recibió la bebida reconstituida de *M. indica* a la concentración efectiva, como único líquido de bebida, otro grupo de seis individuos, recibió la bebida reconstituida de *P. molissima* a la concentración efectiva y otros seis animales recibieron agua, este último grupo constituyó el grupo control.

Evaluación Anatomopatológica

Los animales fueron sedados con una mezcla de xilazina (20mg/ml) y ketamina (50mg/kg 1,5 ml totales, vía intramuscular; una vez insensibilizados, se sacrificaron mediante luxación cervical, luego se realizó la disección e inspección macroscópica de todos los órganos y obtención del colón y realizar el estudio histopatológico. El sacrificio de los animales de los experimentos 1 y 2 se realizó cinco semanas después de la última aplicación de AOM o BPS y el de animales del experimento 3 y 4, se realizó 8 semanas después de la última inyección de AOM o PBS. El estudio histopatológico se realizó en un segmento de 4 cm de longitud correspondiente a la parte posterior del colon, este se abrió, se lavó con *Buffer Fosfato Salino* (PBS), y se fijó con formalina-PBS al 10%. Posteriormente se realizó el proceso de inclusión en parafina y la obtención de cortes seriados de 4 µm de espesor, para montar cuatro láminas por fragmento de colon de cada individuo, este procedimiento se realizó en los cuatro experimentos.

Evaluación histopatológica

Se realizó la coloración con Hematoxilina- Eosina y las secciones se observaron bajo un microscopio óptico, para identificar los FCA, la evaluación histológica de FCA se basó en los criterios de la Organización Mundial de la Salud (Jass, 1993) clasificándolas en FCA hiperplásicos o displásicos, y se valoró y se cuantificó la infiltración leucocitaria.

Coloraciones histoquímicas

Se efectuaron coloraciones histoquímicas para determinar la presencia de mucinas, con los siguientes métodos: Acido periódico-de Schiff (PAS) para detectar mucinas neutras, Azul de Alcian (AB), a pH 2.5 para colorear las mucinas ácidas no sulfatadas y AB pH 1.0; para determinar mucinas ácidas sulfatadas (14). La coloración de las secciones tisulares de todos los grupos experimentales, se realizó al mismo tiempo, para evitar diferencias en el patrón de coloración atribuibles a la manipulación.

Análisis morfométrico:

Los cortes histológicos fueron analizados de manera semicuantitativa mediante un procesamiento de imágenes digitales computarizadas, con el uso de un microscopio óptico Leica DMLB (Meyer Instruments, Houston, TX, USA) en el cual se seleccionaron aleatoriamente los campos para la toma de microfotografías. Estas imágenes fueron capturadas con una cámara para microscopía digital instantánea Leica EC3 (Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland) con resolución de tres megapíxeles, 400 y 1000 aumentos, después las imágenes se analizaron con el software ZEN® 2011. Por cada lámina, se eligieron tres campos 30.000 μm^2 tomados al azar, en ellas se realizó el recuento de células caliciformes en la glándula intestinal (# cell/ μm^2), y se identificaron y

contabilizaron las mucinas coloreadas con las tinciones histoquímicas descritas previamente, también se contabilizó el número de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, plasmocitos, macrófagos, número de mitosis y FCA hiperplásicos y displásicos.

Análisis estadístico

El experimento fue realizado con un Modelo de dos Factores de Efectos Fijos con el programa estadístico SPSS® (versión 19, 2010). La prueba de Lambda Wills fue usada para comparar las medias de los tratamientos. ($p < 0.05$).

Resultados

Durante el experimento los ratones ganaron peso y no presentaron signos clínicos de enfermedad.

Efecto de las bebidas frutales sobre la cantidad de leucocitos

En los ratones inducidos con el carcinógeno AOM, se encontró que la infiltración por neutrófilos y linfocitos, fue significativamente menor en los ratones que consumieron *M. indica*, que en los ratones del grupo control ($p < 0,05$) con respuesta dosis dependiente (figura 1). Sin embargo, no hubo diferencia cuando la bebida se suministró antes o después de la inoculación con AOM. Se observó ausencia de células plasmáticas en todos los tejidos evaluados y los recuentos de leucocitos globulares y eosinófilos, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados ($p > 0,05$) (figura 1). En los ratones que consumieron *P. molissima* tampoco se observaron diferencias significativas en la cantidad de leucocitos.

Efecto de las bebidas frutales sobre FCA

En este estudio se encontró que la aparición de FCA hiperplásicas, fue significativamente menor en el grupo de individuos que consumió *M. indica*, con respecto al grupo control ($p < 0,05$); se evidenció un efecto dosis dependiente, a mayor concentración de bebida frutal, la expresión de FCA hiperplásicas fue menor (figura 2). Al consumir esta bebida antes y después de la inducción con el AOM, se observó una disminución en las lesiones, sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el suministro antes y después de la inducción. En los ratones no inducidos con AOM no se observaron FCA displásicas (figura 2), y en su expresión no se encontró diferencias significativas entre consumir la bebida frutal y no consumirla ($p < 0,05$). El consumo de *P. molissima*, no disminuyó la presentación de FCA ni hiperplásicas ni displásicas ($p > 0,05$) (figura 2).

Efecto de las bebidas frutales sobre la expresión de mucinas

En los ratones que bebieron *M indica*, hubo un aumento significativo en la expresión de mucinas neutras y una disminución en las mucinas ácidas sulfatadas ($p < 0,05$). En los ratones que ingirieron *P. molissima*, se observó un comportamiento similar aunque sin significancia estadística y no hubo diferencia estadística en dicha expresión cuando el consumo de la bebida frutal se hizo antes o después de la inoculación del AOM, con ninguna de las bebidas frutales ($p > 0,05$); se observó que el efecto fue el mismo para la prevención y para la progresión de la carcinogénesis (figura 4 y 5).

Actividad celular proliferativa

Los animales que consumieron *M. indica* presentaron un menor número de mitosis por unidad de área, respecto al grupo control ($p < 0,05$), no hubo diferencia significativa en la cantidad de mitosis cuando se suministró previa a la inducción con el carcinógeno AOM o después. Al analizar el consumo de *P. molissima*, no se observó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en el suministro antes o después de la inducción con el carcinógeno (figura 6).

Discusión

El consumo regular de la bebida reconstituida de *M. indica*, redujo la producción de FCA hiperplásicas; mostrando una disminución cuando se suministró antes y después de la inducción con el carcinogénico AOM, lo que sugiere un efecto tanto preventivo como terapéutico. Con respecto a la progresión de las lesiones se observó un efecto benéfico, ya que el número de FCA displásicas encontradas fue muy bajo, lo anterior es concordante con lo observado por Corrales et al. 2014 (12), quienes evidenciaron in vitro una inhibición de más del 60% en el crecimiento celular en los animales que recibieron extracto de *M. indica*. Otros estudios en un modelo murino utilizando *Allium fistulosum*, mostraron que Taninos, polifenoles y B carotenos inducen apoptosis, disminución de proliferación celular y atrapamiento de radicales libres (15, 16), los cuales también se encuentran en *M. indica*. En otro estudio en ratones alimentados con *Linum Usitatissimum*, se observó un aumento de los reguladores de la proliferación celular P53, P21, caspasa3 y Bax y disminución de Bcl, esto relacionado con su acción antioxidante (17). También en ratones suplementados con Monoterpenos, se evidenció disminución en el tamaño de tumores de colon (18), *M. indica* contiene monoterpenos que aportan el

aroma propio de la fruta, lo comunicado en estos estudios podría explicar los resultados obtenidos en la presente investigación.

El consumo de *M. indica* disminuyó la infiltración leucocitaria por neutrófilos y linfocitos en todos los individuos tratados; este resultado coincide con lo encontrado en varios estudios de suplementación en humanos con frutas y verduras que contienen antioxidantes naturales como taninos y polifenoles, en los que se evidenció una disminución en los índices de inflamación (19, 20, 21), lo cual podría deberse al alto contenido de antioxidantes como taninos y polifenoles contenidos en el mango (11). El hallazgo constante de infiltración leucocitaria y mediadores inflamatorios en asociación con tumores, indica que las células inmunes son importantes en la promoción del cáncer, ya que aumentan el riesgo de daño genético, al inducir desregulación de los mecanismos de apoptosis, crecimiento celular y activación de la angiogénesis (22). En modelos murinos de inducción de enfermedad intestinal inflamatoria y de CCR en los que se empleó AOM, se puso de manifiesto la sobreexpresión de mediadores de la inflamación como COX2, INOS, NF- κ B, VCAM-1 y β -catenina, los cuales promueven la respuesta inflamatoria, la migración y adhesión celular, entre otras; también se informó que su desregulación o mutación puede contribuir al CCR en roedores y humanos (19, 21, 23). En otro modelo murino con AOM, se encontró altos niveles de COX2 en células colónicas (24), la COX2 promueve vasodilatación e inflamación y quimiotaxis para eosinófilos, basófilos y linfocitos (25), además se ha comunicado que los neutrófilos juegan un rol importante en el establecimiento y progresión del microambiente neoplásico, a través de la producción de citoquinas y especies reactivas de oxígeno (26). La presencia de

infiltración leucocitaria se asoció también, en otros estudios en murinos, a cambios displásicos en el colon (27). Lo que permitiría presumir que la disminución de dicho ambiente inflamatorio conlleva a la disminución del riesgo de cáncer, al restaurar la función inmune y la homeostasis (28), por lo tanto la disminución de algunas células inflamatorias como los neutrófilos y linfocitos, podría disminuir el riesgo de formación de FCA tal como se observó en el presente estudio.

En los ratones que no recibieron inducción con el carcinógeno AOM y que consumieron *M. indica* y *P. molissima*, no se observaron infiltraciones leucocitarias, lo cual puede ser indicador de la inocuidad de los jugos.

El aumento en el número de células caliciformes que expresaron mucinas neutras y la disminución de mucinas ácidas en ratones que consumieron *M. indica*, es comparable con resultados obtenidos por otros autores, quienes comunicaron que en condiciones basales las mucinas en el colon de ratones jóvenes, son en su mayoría neutras (29), mientras que en ratones y humanos con CCR, aumentan las mucinas ácidas y disminuyen las mucinas neutras, lo que sugiere un pronóstico desfavorable (30, 31), asociado con mutaciones genéticas que llevan a la activación de la carcinogénesis por la vía WNT y a la expresión disminuida o aberrante de mucinas (32).

La disminución en el número de mitosis, podría explicarse por el efecto de los taninos y polifenoles, al neutralizar los radicales libres, al interferir en la activación de procarcinógenos, y evitar la unión de carcinógenos al ADN inhibiendo aberraciones

cromosómicas, reduciendo la replicación celular e incluso generando la regresión de lesiones premalignas (12, 33).

Los efectos quimiopreventivos del consumo repetido de *P. molissima*, no fueron detectados en este estudio, sin embargo no se puede descartar su existencia, las razones de este hallazgo podrían considerarse objeto de estudios futuros. Una explicación para este resultado podría ser la existencia de sinergismo, antagonismo o modificaciones en la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los antioxidantes de la fruta (16), al interactuar sus compuestos antioxidantes, con otros componentes de la dieta, como lo han expresado algunos estudios de revisión (33).

Conclusión

Los resultados de este estudio demostraron que el consumo regular de bebida reconstituida de mango de azúcar, *M. indica*, disminuyó la aparición de neutrófilos y linfocitos, el número de FCA hiperplásicas y displásicas y adicionalmente disminuyó la expresión de mucinas ácidas y aumentó la expresión de mucinas neutras por las células caliciformes del epitelio colónico en ratones inoculados con el carcinógeno AOM. Estos resultados no se obtuvieron con la curuba, *P. Molissima*. Esta información contribuye a la verificación de las propiedades quimiopreventivas de *M. indica*.

Agradecimientos

Los autores agradecen, al grupo técnico del laboratorio de patología, a los miembros del grupo de estudio en Patobiología Quirón y del Grupo Impacto en Componentes de los

Alimentos en la salud, de la Escuela de Nutrición y dietética de la Universidad de Antioquia, que participaron en el montaje y realización del experimento

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existen conflictos de intereses para la publicación de este trabajo.

Financiación

Este estudio se llevó a cabo en su totalidad con el apoyo económico del Comité para el Desarrollo de la Investigación y a la estrategia de sostenibilidad 2014-2015 de la Universidad de Antioquia y el Grupo de Patobiología Quirón, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Colombia.

Referencias

1. **International Agency for Reseach on Cancer. GLOBOCAN.** Breast Cancer Incidence and Mortality Wordwilde in 2012. Fecha de consulta: Mayo 3 de 2015. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/breast.asp>.
2. **Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin, M.** Inflammation and colon cancer. *Gastroenterol.* 2012;138(6):2101-2114. [http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(10\)00176-9/fulltext](http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(10)00176-9/fulltext)
3. **Jones R, Scobey M, Cheng J.** The Risk of Colon Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *J Gastroint Dig Syst.* 2014; 4(164):2. <http://www.omicsonline.org/open->

access/the-risk-of-colon-cancer-in-inflammatory-bowel-disease-2161-069X-4-164.pdf

4. **Won HS, Maeng LS, Chae HS, Kim HK, Cho YS, Kang JH, Ryu MR.** Sequential Changes in Aberrant Crypt Foci and Lectin Expression in the Early and Late Stages of DMH-Induced Colon Carcinogenesis in Rats. *Gut liver.* 2012;6(2):229-234. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3343162/>
5. **Menéndez P, Villarejo P, Padilla D, Menéndez JM, Rodríguez Montes JA.** Colorectal cancer carcinogenesis. *Sp J Surgical Res.* 2012;15(1):27-34 <http://www.reiq.es/ING/pdf/REIQ15.1.2012%20.pdf#page=31>
6. **Takkouche B, Regueira-C, Etmnan M.** Breast cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(20):1439-1447. <http://jnci.oxfordjournals.org/content/100/20/1439.short>
7. **Carmona FR.** Cáncer de colon experimental: caracterización del modelo mediante marcadores tumorales y moléculas de adhesión. [Tesis Doctoral]. Salamanca, España: Univesidad de Salamanca; 2009.
8. **Vangaveti VN, Jansen H, Kennedy RL, Malabu UH.** Hydroxyoctadecadienoic acids: Oxidised derivatives of linoleic acid and their role in inflammation associated with metabolic syndrome and cancer. *Eur J. Pharmacol.* 2015. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299915004604>
9. **Weidner C, Rousseau M, Plauth A, Wowro SJ, Fischer C, Abdel AH, Sauer S.** Melissa officinalis extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through formation of reactive oxygen species. *Phytomedicine.,*

2015;22(2):262-270.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711314004097>

10. **Slattery ML, Herrick JS, Bondurant KL, Wolff RK.** Toll-like receptor genes and their association with colon and rectal cancer development and prognosis. *Int. J. Cancer.* 2012;130(12):2974-2980.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.26314/full>

11. **Rojano BA, Zapata Acosta K, Cortes C, Correa FB.** Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba larga). *RCPM.* 2012;17(4):408-419. http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol17_4_12/pla12412.htm

12. **Corrales-A, Amparo UL, Rojano B, Maldonado ME.** In vitro and in vivo effects of mango pulp (*Mangifera indica* cv. Azúcar) in colon carcinogénesis. *Arch. Latinoam. Nutr.* 2014;64(1):16-23. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0004-06222014000100003&script=sci_arttext

13. **Chaparro DC, Maldonado ME, Urango LA, Rojano BA.** Propiedades quimiopreventivas de *Passiflora mollissima* (Kunth) LH Bailey (curuba larga) contra cáncer colorrectal. *RCPM.* 2015;20(1):62-74.

<http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/185>

14. **Prophet EB.** AFIP, Armed Forces Institute Pathology Laboratory. *Methods in Histotechnology.* Primera edición. Michigan. Editorial: American Registry of pathology. 1994:279

15. **Arulselvan P, Wen CC, Lan CW, Chen YH, Wei WC, Yang NS.** Dietary administration of scallion extract effectively inhibits colorectal tumor growth: cellular

- and molecular mechanisms in mice. PLOS one. 2012; 7(9):1-14.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3443092/>
16. **Bouayed J, Bohn T.** Dietary derived antioxidants: Implications on health. En: Bouayed J, Bohn T Nutrition, Well-being and health. Publisher. Open acces. 2012.
<http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/29973.pdf>
17. **Hernández M, Guevara RG, Cruz A, A. Guevara L, Bello LA, Castaño E, Loarca G.** Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) and its total non-digestible fraction influence the expression of genes involved in azoxymethane-induced colon cancer in rats. Plant foods Hum Nutr. 2013;68(3):259-267.
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11130-013-0372>
18. **Lokeshkumar B, Sathishkumar V, Nandakumar N, Rengarajan T, Madankumar A, Balasubramanian MP.** Anti-Oxidative Effect of Myrtenal in Prevention and Treatment of Colon Cancer Induced by 1, 2-Dimethyl Hydrazine (DMH) in Experimental Animals. Biomolecules & therapeutics. Biomol Ther (Seoul). 2015; 23(5):471. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4556208/>
19. **Banerjee N, Kim H, Talcott S, Mertens-Talcott S.** Pomegranate polyphenolics suppressed azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci and inflammation: possible role of miR-126/VCAM-1 and miR-126/PI3K/AKT/mTOR. Carcinogenesis. 2013;34(12):2814-2822.
<http://carcin.oxfordjournals.org/content/34/12/2814.long>
20. **Chen J y Huang XF.** The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. Cancer Biol Ther. 2009;8(14):1313-1317.

http://www.researchgate.net/publication/26272767_The_signal_pathways_in_azoxymethane-induced_colon_cancer_and_preventive_implications

21. **Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, Takada Y, Sand D y Heber D.** Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54(3):980-985.
http://www.researchgate.net/publication/7326220_Pomegranate_Juice_Total_Pomegranate_Ellagitannins_and_Punicalagin_Suppress_Inflammatory_Cell_Signaling_in_Colon_Cancer_Cells
22. **Danese S, Malesci A, Vetrano S.** Colitis-associated cancer: the dark side of inflammatory bowel disease. *Gut.* 2012;60:1609-1610.
<http://gut.bmj.com/content/60/12/1609.extract>
23. **Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Kawai N, Yasumaru m, Hori M.** Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Int J Cancer Res.* 2002;62(5):1567-1572. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/62/5/1567.full>
24. **Rúa KAP, Ceballos H, Rodríguez EA., Jiménez LFI, Peña CMM.** Caracterización molecular del gen supresor de tumores TP53 en el cáncer colorrectal. *Rev Col de Gastroenterol.* 2013;28(4):294-300.
<http://www.scielo.org.co/pdf/rcg/v28n4/v28n4a04.pdf>
25. **Rahman M, Selvarajan K, Hasan MR Chan AP, Jin C, Kim J, Tai IT.** Inhibition of COX-2 in colon cancer modulates tumor growth and MDR-1 expression to

enhance tumor regression in therapy-refractory cancers in vivo. 2012. *Neoplasia*. 2012;14(7):624–633. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3421958/>

26. **Beatty PL, Narayanan S, Gariépy J, Ranganathan S y Finn OJ.** Vaccine against MUC1 antigen expressed in inflammatory bowel disease and cancer lessens colonic inflammation and prevents progression to colitis-associated colon cancer. *Cancer Prev Res* 2010; 3: 438- 446.

<http://cancerpreventionresearch.aacrjournals.org/content/3/4/438.long>

27. **Múzes, G., Molnár, B., & Sipos, F.** (2012). Regulatory T cells in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2012;18(40): 5688-5694. <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v18/i40/5688.htm>

28. **Martínez LR, Maciel AG y Cravioto j.** Características histoquímicas de la mucosa intestinal de la rata hembra durante el primer año de vida. *Vet. Méx* 1994;25(1):31-40. <http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-1994/vm941g.pdf>

29. **Larsson JMH, Thomsson KA, Rodríguez AM, Karlsson H y Hansson GC.** Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. III. Gastrointestinal Muc5ac and Muc2 mucin O-glycan patterns reveal a regiospecific distribution. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013;301:357–363.

<http://ajpgi.physiology.org/content/305/5/G357.long>

30. **Hadi NL, Shakoor KA, Waseem B.** Is mucin content a prognostic indicator in colorectal carcinoma? *JSP*. 2009;14:7-10

<http://www.jsp.org.pk/Issues/JSP%2014-1%20Jan%20-%20March%202009/Naila%20Irum%20Hadi.pdf>

31. **Femia AP, Dolara P, Giannini A, Salvadori M, Biggeri A, Caderni G.** Frequent mutation of Apc gene in rat colon tumors and mucin-depleted foci, preneoplastic lesions in experimental colon carcinogenesis. *Cancer Res* 2012;67(2):445-449. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/2/445.long>
32. **Boffetta P, Couto E, Wichmann J, Ferrari P, Trichopoulos D, Bueno HB, Norat T.** Fruit and vegetable intake and overall cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *JNCI*. 2010;102(8):529-537. <http://jnci.oxfordjournals.org/content/102/8/529.full.pdf+html>
33. **Jones M, Verghese LT, Walker L, Shackelford CB, Chawan.** Grape Products Reduce Colon Cancer in Azoxymethane-induced Aberrant Crypt Foci in Fisher 344 Rats. *Int J Can Res*. 2014;10:46-53. <http://docsdrive.com/pdfs/academicjournals/ijcr/2014/46-53.pdf>

Figuras

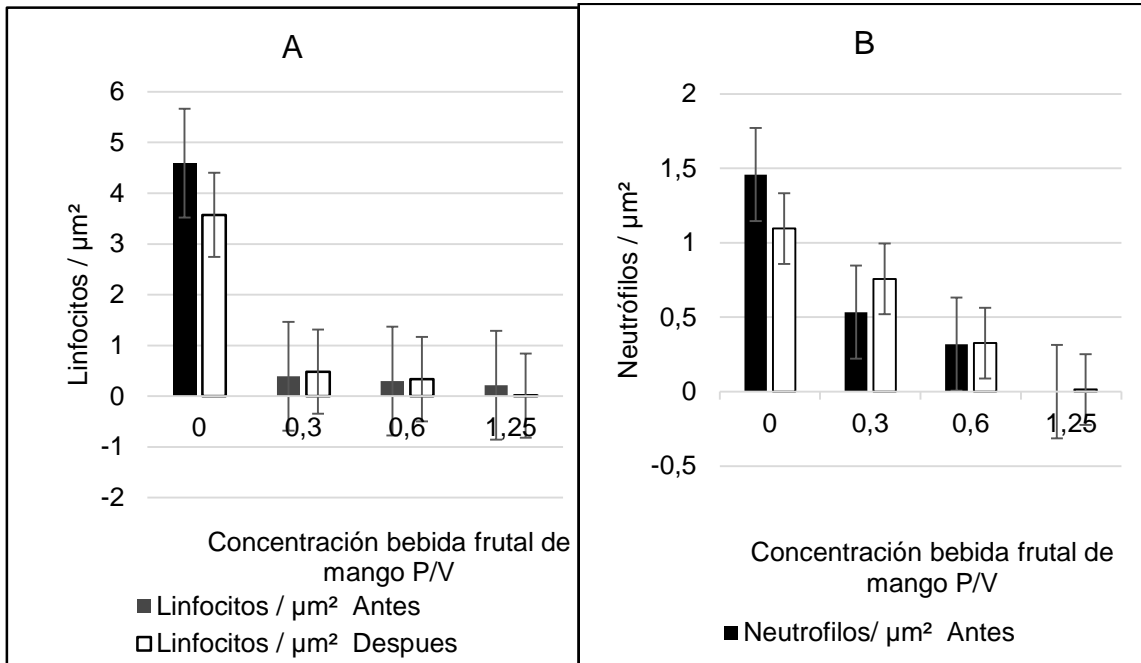


Figura 1. Efecto del consumo regular de bebida reconstituida de mango de azúcar *M. indica*, sobre el número de leucocitos en ratones inducidos con AOM. A) Linfocitos/ μm^2 . B) Neutrófilos/ μm^2 . Observe que con el extracto de *M indica* hubo disminución en el número de linfocitos y neutrófilos, cuando se suministró antes y después de la inducción con AOM.

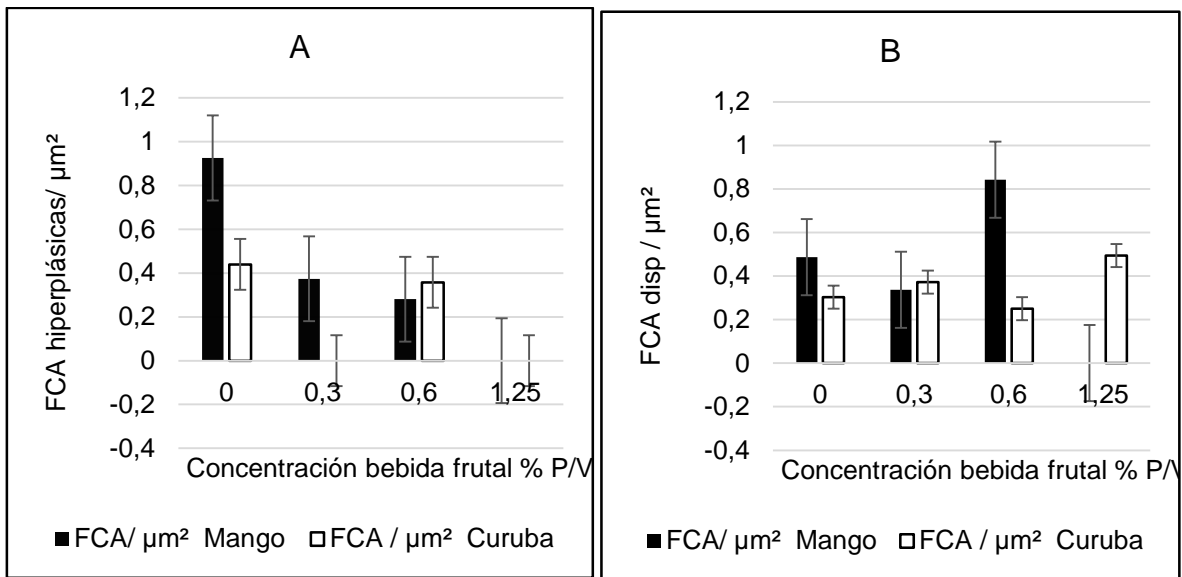


Figura 2. Efecto del consumo repetido de la bebida de *M. indica* y *P. molissima* sobre la presentación de FCA en ratones inducidos con AOM. A). FCA hiperplásicas/ μm^2 . B) FCA displásicas/ μm^2 . El extracto de *M. Indica* inhibe la producción de FCA hiperplásicas. No se observó efecto quimiopreventivo con *P. molissima*.

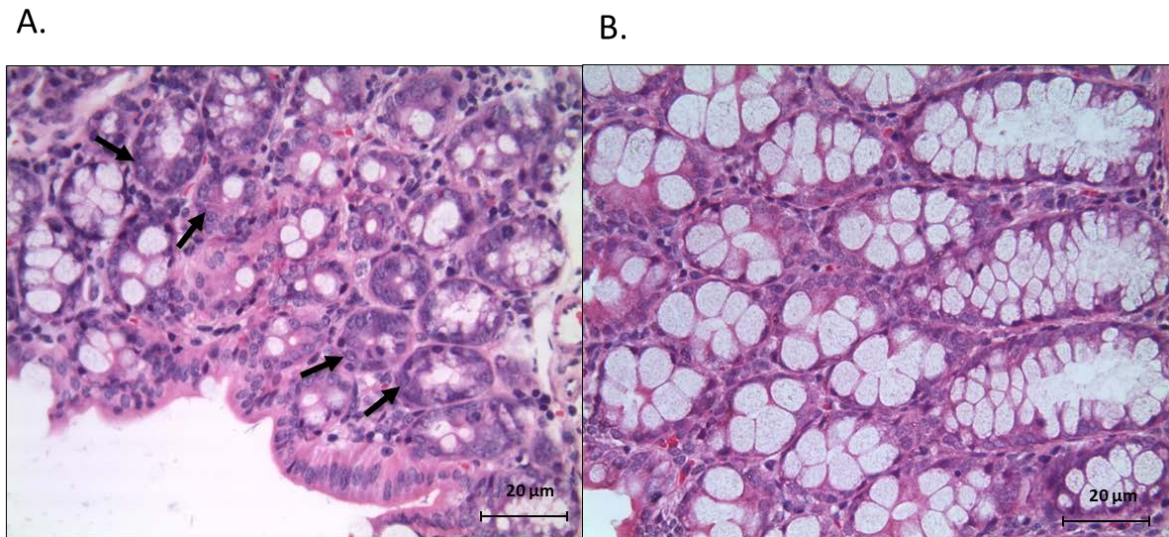


Fig. 3 (A) Colon, observe FCA (flecha) y (B) colon normal HE 400X.

Efecto de las bebidas frutales sobre la expresión de mucinas

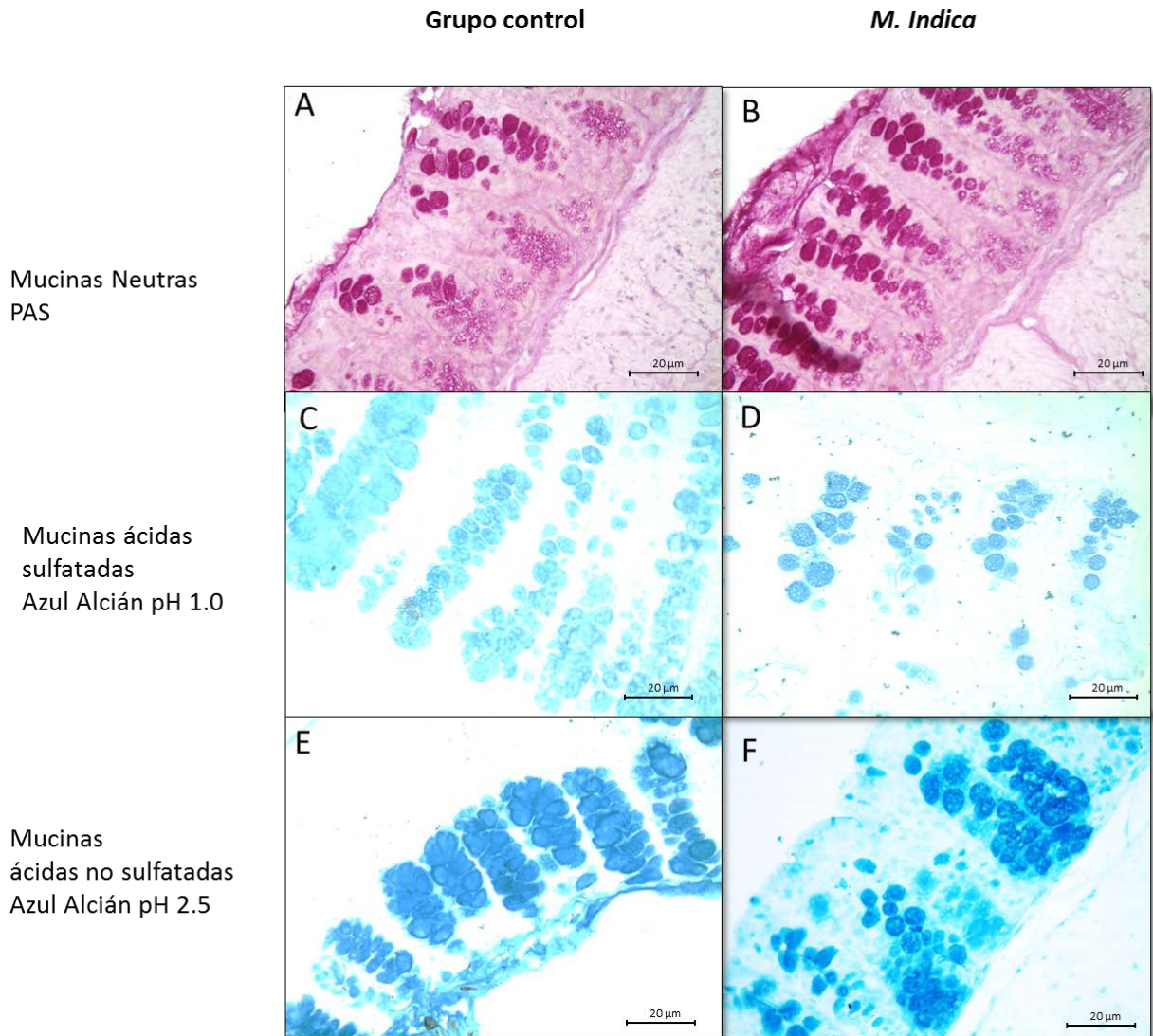


Figura 4. Microfotografías de colon con coloraciones Histoquímicas para células caliciformes, en ratones que consumieron *M. indica* y en el grupo control. El extracto de *M. indica* promueve el aumento de células caliciformes productoras de mucinas neutras (B), y la disminución de expresión de mucinas ácidas sulfatadas (D) y no sulfatadas (F)

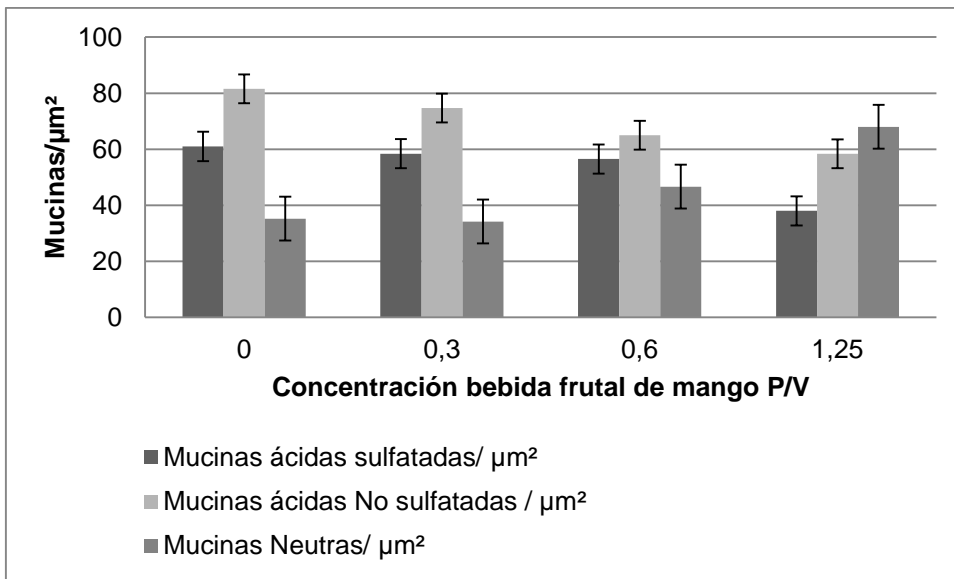


Figura 5. Efecto de *M. indica* sobre el número de las células caliciformes con expresión de mucinas neutras, ácidas sulfatas y no sulfatadas. El número de células caliciformes productoras de mucinas neutras aumento y las mucinas ácidas disminuyeron en ratones que consumieron *M. Indica*.

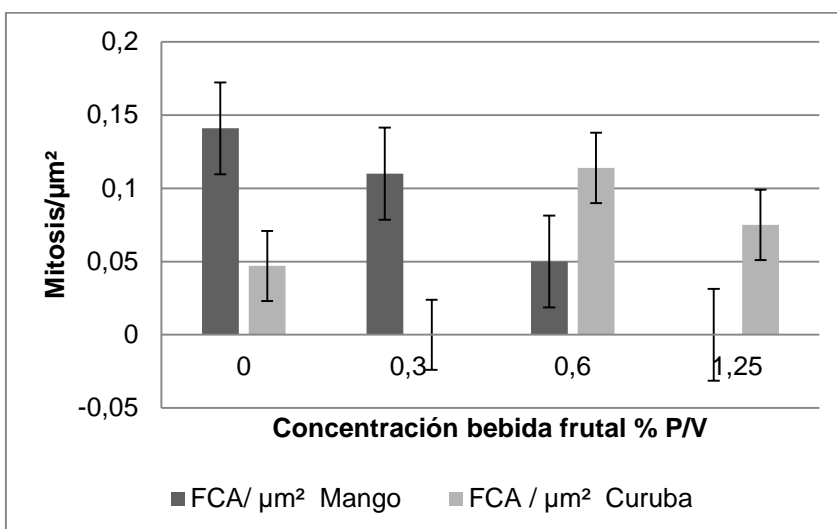


Figura 6. Efecto del consumo repetido de extracto frutal sobre el número de mitosis en ratones inducidos con el carcinogénico AOM. Observe que el número de mitosis fue menor en los ratones que consumieron *M. Indica*.

7. CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo se realizó una descripción del efecto quimiopreventivo de dos bebidas reconstituidas de frutas tropicales; mango de azúcar, *Mangifera indica*, y curuba larga, *Passiflora molissima*, sobre la cantidad de células inflamatorias, las mucinas intestinales, los cambios preneoplásicos y neoplásicos, en un modelo experimental de cáncer de colon murino.

El consumo regular de las bebidas reconstituidas de frutas tropicales; mango de azúcar, *Mangifera indica* y curuba larga *Passiflora molissima*, generó una disminución en el número células inflamatorias, y la aparición de lesiones preneoplásicas y displásicas en el colon de ratones inoculados con AOM, al disminuir significativamente la formación de FCA. Los resultados de este estudio evidencian como la creación de un ambiente proinflamatorio y la formación de FCA, hacen parte de la patogenia en el colon en los ratones sometidos al carcinógeno AOM, al tiempo que se evidenció como estas alteraciones se vieron atenuados por el poder quimiopreventivo de las bebidas frutales.

El consumo regular de las bebidas reconstituidas de frutas tropicales; mango de azúcar, *Mangifera indica*, y curuba larga, *Passiflora molissima*, disminuyó la expresión de mucinas ácidas y aumentó la expresión de mucinas neutras, esto ratificó el poder quimiopreventivo de las bebidas frutales, ya que la sobreexpresión de mucinas ácidas constituye el patrón predominante en el CCR tanto en modelos murinos como en humanos.

Esta información es relevante para diseñar estrategias de diagnóstico temprano y pronóstico del CCR, y medidas de quimioprevención, a través de la suplementación o inclusión en la dieta de estas dos frutas. En el modelo se verificó como el CCR en su fase de iniciación puede verse acompañado por una expresión alterada de mucinas neutras y un aumento de mucinas ácidas y que aunque su rol en la inmunidad innata en defensa contra la progresión tumoral, no está bien dilucida, si se observó como el suministro de las bebidas frutales de mango de azúcar, *Mangifera indica* y curuba larga, *Passiflora molissima*, logró una aparente normalización en la expresión de dichas mucinas hacia su expresión basal.

Estos resultados pueden ser un punto de partida para la realización de estudios complementarios, para conocer más a fondo el papel de la respuesta inflamatoria en la carcinogénesis colorectal y la influencia de la quimioprevención con mango de azúcar, *Mangifera indica* y curuba larga, *Passiflora molissima*. Algunos de estos estudios complementarios podrían apuntar a la medición y caracterización del ambiente proinflamatorio que acompaña al CCR, mediante la medición de las citoquinas expresadas, la medición de inmunoglobulinas asociadas a la mucosa colónica y la valoración del efecto de los extractos frutales en estadios más avanzados de la carcinogénesis.

En el presente estudio se implementó un modelo animal para avanzar de los estudios *in vitro* a los estudios *in vivo* y el uso de técnicas histoquímicas en la evaluación del efecto

quimiopreventivo del mango de azúcar, *Mangifera indica* y se realizan los primeros estudios sobre los efectos quimiopreventivos de la curuba larga, *Passiflora molissima*. El modelo Murino complementado con la valoración histoquímica de las mucinas podría emplearse como una alternativa complementaria al diagnóstico precoz del CCR en Medicina Veterinaria, además de ser una contribución a la medicina humana.

8. Referencias

Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, Takada Y, Sand D y Heber D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54(3):980-985.

Ali U, Nagi AH, Naseem N, Ullah. Mucin Histochemistry in Tumours of Colon, Ovaries and Lung. *J Cytol Histol.* 2013; 3(163):1-4.

Alrawi SJ, Schiff M, Carroll RE, Dayton M, Gibbs JF, kulavlat M, Anderson GR. Aberrant Crypt Foci. *Anticancer Res* 2006; 26:107-120.

Amin AR, Kucuk O, Khuri FR, Shin DM. Perspectives for cancer prevention with natural compounds. *J Clin Oncol* 2009; 27:2712-2725.

Baker SL. New study: mango prevents and halts growth of colon and breast cancer cells. [fecha de acceso: 21 de Junio de 2014].URL: http://www.naturalnews.com/027992_mango_brst_cancer.html#

Banerjee N, Kim H, Talcott S, Mertens-Talcott S. Pomegranate polyphenolics suppressed azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci and inflammation: possible role of miR-126/VCAM-1 and miR-126/PI3K/AKT/mTOR. *Carcinogenesis.* 2013; 34(12):2814-2822.

Beatty PL, Narayanan S, Gariépy J, Ranganathan S, Finn OJ. Vaccine against MUC1 antigen expressed in inflammatory bowel disease and cancer lessens colonic inflammation and prevents progression to colitis-associated colon cancer. *Cancer Prev Res* 2010; 3: 438-446.

Beltran GO. ¿Está cambiando la epidemiología del cancer de colon en Colombia? *Rev Col Gastroenterol* 2005; 20: 5-6.

Bendardaf R, Lamlum H, Pyrhönen S. Prognostic and predictive molecular markers in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2004; 24:2519-2530.

Bingham SA. Diet and colorectal cancer prevention. *Biochem Soc Trans* 2000; 28:12-16.

Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in colorectal cancer. *J. AGA.* 2010; 138(6):2073-2087.

Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state. *Oxid Med Cell Longev* 2010; 3(4):228-237.

Bouayed TB. Dietary derived antioxidants: implications on health, nutrition. nutrition, well-being and health. In: *Nutrition, Well-Being and Health.* 1a ed. Luxembourg; 2012 p. 1-22.

Bromatología y Toxicología. 2014; 41(3):312.

Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 2004; 23:77–99.

Carmona, F. R. Cáncer de colon experimental: caracterización del modelo mediante marcadores tumorales y moléculas de adhesión. [Tesis Doctoral]. Salamanca, España: Universidad de Salamanca; 2009.

Catalán V, Honorato B, García F, Bandrés E, Zabalegui N, Zárate R, García FD. Carcinogenesis colonica proceso de transformacion. *Rev Med Univ Navarra*. 2009; 47(1):15-9.

Corrales A, Franco C, Urango L, Rojano B, Maldonado M. • Mango de azúcar, (*Mangifera indica*), variedad de Colombia: características antioxidantes, nutricionales y sensoriales. *Revista chilena de nutrición: órgano oficial de la Sociedad Chilena de Nutrición*.

Corrales-Bernal A, Amparo Urango L, Rojano B, Maldonado ME. [In vitro and in vivo effects of mango pulp (*Mangifera indica* cv. Azúcar) in colon carcinogenesis]. *Arch Latin Am Nutr*. 2014; 64(1):16-23

Chaparro D, Maldonado M, Urango L, Rojano B. Propiedades quimiopreventivas de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba larga) contra cáncer colorrectal. *Revista cubana de plantas medicinales*. 2015; 20(1).

Chaparro D, Maldonado M, Franco C, Urango L. Características nutricionales y antioxidantes de la fruta curuba larga (*Passiflora mollissima* Bailey). *Perspectivas en nutrición humana*. 2014; 16(2):205.

Chen J, Huang XF. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *J Cancer Biol Therapy*. 2009; 8:1313-1317.

Cho E, Lee JE, Rimm EB, Fuchs CS, Giovannucci EL. Alcohol consumption and the risk of colon cancer by family history of colorectal cancer. *Am J Clin Nutr* 2012; 95:413-419.

Corfield AP, Myerscough N, Longman R, Sylvester P, Arul S, Pignatelli M. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut* 2000; 47(4):589-594

Corrales BA., Amparo UL, Rojano B, Maldonado ME. *In vitro* and *in vivo* effects of mango pulp (*Mangifera indica* cv. azucar) in colon carcinogenesis. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 20014; 64(1):16-23.

Cossío S, Vázquez F, Guerrero AH, Goepfert RH, Del Monte JS, Lárraga JOA. Endoscopia de magnificación para la detección de foco de cripta aberrante displásica en pacientes mexicanos con alto riesgo de cáncer de colon. *Endoscopia* 2007; 19(2):119-126.

Danese S, Mantovani A. Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer. *Oncogene* 2010; 10(29):3313-23.

Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:1131-1141.

Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Patterson SD. Panitumumab–FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *NEJM* 2013; 369(11):1023-1034.

Dyson JK, Rutter MD. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? *WJG* 2012; 18(29):3839-3848.

Feregrino A. A. Caracterización y efecto de polisacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad negro 8025 sobre el estadio temprano de cáncer de colon. [Tesis de Maestría]. Querétaro, México: Facultad de Química , Universidad Autónoma de Queretaro; 2008

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. *Int J Cancer* 2010; 127:2893-2917.

Femia AP, Dolara P, Giannini A, Salvadori M, Biggeri A, Caderni G. Frequent mutation of Apc gene in rat colon tumors and mucin-depleted foci, preneoplastic lesions in experimental colon carcinogenesis. *Cancer Res* 2012; 67(2):445-449.

Fodor AA, Jobin C. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 2012; 5(338):120-123.

Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunol* 2013; 14(10):1014-1022.

Ghafar SA, Yazan LS, Tahir PM, Ismail M. Kenaf seed supercritical fluid extract reduces aberrant crypt foci formation in azoxymethane-induced rats. *Exp Toxicol Pathol* 2012; 64(3):247-251.

Greenspan EJ, Jablonski MA, Rajan TV, Levine J, Belinsky GS, Rosenberg DW. Epigenetic alterations in RASSF1A in human aberrant crypt foci. *Carcinogenesis* 2006; 27(7):1316-1322.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646-674.

Hawk ET, Umar A y Viner JL. Colorectal Cancer Chemoprevention—An Overview of the Science. *GASTROENTEROLOGY* 2004; 126:1423.

Hernández-Salazar, M. Efecto quimioprotector de la linaza (*linum usitatissimum* L.) sobre estadios tempranos de cáncer de colon. [Tesis de Doctorado] Ciudad, País: Facultad de química, Universidad autonoma de Queretera; 2015.

Higurashi T, Hosono K, Endo H, Takahashi H, Lida H, Uchiyama T, Nakajima. Eicosapentaenoic acid (EPA) efficacy for colorectal aberrant crypt foci (ACF): a double-blind randomized controlled trial. *BMC Cancer* 2012; 12(413):1-7.

Hong JT. Pharmaceutical comprising thiacremonona for treating colon cancer 2010; Patent N° US 7, 759,391.

Hu ML. Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung Med J* 2011; 34(15):449-460.

Imai Y, Yamagishi H, Fukuda K, Ono Y, Inoue T, Ueda X. Differential mucin phenotypes and their significance in a variation of colorectal carcinoma. *WJG* 2013; 19(25):3957-3968.

Instituto Nacional de Cancerología, Colombia. Cancer en cifras. [fecha de acceso: Agosto de 2013].URL:

<http://www.cancer.gov.co/contenido/contenido.aspx?catID=437&conID=790&pagID=775>

Hernández J, Sanz J, Landolfi S, López F, Palacios J, Bautista MD, Ramón S. Recomendaciones para la determinación de mutaciones de K-RAS en cáncer de colon. Rev Esp Patol 2012; 45(12):76-85.

Jones J, Verghese M, Walker LT, Shackelford L, Chawan CB. Grape Products Reduce Colon Cancer in Azoxymethane-induced Aberrant Crypt Foci in Fisher 344 Rats. Int J Cancer Res 2014; 10(1):46-53.

Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation plays multiple roles in colorectal cancer. J Gastroint Dig Syst 2004; 3(2):2-3.

Kohno H, Suzuki R, Sugie S y Tanaka. β -Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. Cancer science, 2005; 96(2): 69-76.

Kundu J, Chun KS, Chae IG, Kundu JK. Phloretin: an apple polyphenol with cancer chemopreventive potential. Arch Bas App Med 2014; 2(1):15-21.

Kundu CE. Phloretin: an apple polyphenol with cancer chemopreventive. Arch Bas App Med 2014; 2:17-23.

Larsson JMH, Thomsson KA, Rodríguez AM, Karlsson H, Hansson GC. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. III. Gastrointestinal Muc5ac and Muc2 mucin O-glycan patterns reveal a regiospecific distribution. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2013; 301:357-363.

Lindblad M, Rodríguez LAG, Lagergren J. Body mass, tobacco and alcohol and risk of esophageal, gastric cardia, and gastric cardia and non-cardia adenocarcinoma among men and women in a nested case-control study. Cancer Causes Control 2005; 16(3):285-294.

Maldonado ME, et al Propiedades quimiopreventivas del mango y la manzana en el cáncer de colon. Salud(i)Ciencia. 2014; 20: 614-618

Martínez A, Debolos C, Garrido M, Roca FJ, Barranco C, Alobid I, Mulo J. Mucin genes have different expression patterns in healthy and diseased upper airway mucosa. Clin Exper Allergy 2006; 6(4):448-457.

Martínez LR, Maciel AG, Cravioto J. Características histoquímicas de la mucosa intestinal de la rata hembra durante el primer año de vida. Vet Méx 1994; 25(1):31-40.

Minker C, Duban L, Karas D Järvinen P, Lobstein A, Muller, CD. Impact of procyanidins from different berries on caspase 8 activation in colon cancer. *Oxidative Med Cell Longevity* 2014; 1-14.

Murphy N, Norat T, Ferrari P, Jenab M, Bueno-de-Mesquita B, Skeie, G, Riboli. Dietary fibre intake and risks of cancers of the colon and rectum in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *EPIC PLoS One* 2012; 7(9):1-10.

Múzes G, Molnár B, Tulassay Z, Sipos F. Regulatory T cells in inflammatory bowel diseases and. *World J Gastroenterol* 2012; 18(40):5688-5694.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization. *Nature* 2012; 487:330-337

OMS (Organización Mundial de la Salud). Prevención de las enfermedades crónicas: una inversión vital. Ginebra, 2005 [fecha de acceso: Agosto de 2013]. URL: <http://www.cancer.gov.co/contenido/contenido.aspx?catID=437&conID=790&pagID=775>

Pancione M, Remo A Colantuoni V. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Pathol Res International* 2008; 1-11.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy, Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 2008; 4(2):89.

Piña-Zentella RM. Efecto protector de los extractos de verdolaga (*Portulaca oleraceae* L.) sobre un modelo de inflamación-cáncer de colon inducido químicamente en ratas f 344. [Tesis de Doctorado]. Querétaro, México: Facultad de química, Universidad Autónoma de Queretaro; 2015.

Prasad VG, KawadeS, Jayashree BS, Reddy ND, Francis A, Nayak PG, Shenoy RR. Iminoflavones Combat 1,2-Dimethyl Hydrazine-Induced Aberrant Crypt Foci Development in Colon Cancer. *BioMed Res International* 2014; 2014:1-7.

Rabassa ME. Estudio de las mucinas polimórficas epiteliales asociadas a tumores malignos. [Tesis de Doctorado]. La Plata, Argentina: Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata; 2005.

Rodrigo L, Riestra S. Dieta y cáncer de colon. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99(3):183-189.

Rojano BA, Zapata Acosta K, Cortes C, Correa FB. Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2012; 17(4):408-419.

Romero JC. purificación y caracterización parcial de mucina citoplasmática utilizando la lectina de salvia bogotensis. [Tesis de Maestría]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2010.

Sánchez MT. Cáncer colorrectal (CCR). Rev Col Gastroenterol 2005; 20(1):43-53.

Sánchez PM, Campos PV, Padilla D, Menéndez JM, Montes JR. Carcinogénesis del cáncer colorrectal. Span J Surg Res 2012; 15(1):27-34.

Secretaría de Salud de Antioquia, Colombia. Situación del cáncer en el departamento de antioquia. Análisis de la información preliminar, años 2007 - 2009. Registro poblacional de cáncer de antioquia (RPCA, 2009).

Sharma RA, Manson MM, Gescher A, Steward WP. Colorectal cancer chemoprevention: biochemical targets and clinical development of promising agents. Europ J Cancer 2011; 239-250.

Siegel R, DeSantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics. Ca Cancer J Clin 2014; 42:104-117.

Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal. Clin Cancer Res. 2012; 18:1506-1512.

Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, Wolf CR. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer. J Med Sci 2002; 99:14.

Talcott ST. Propiedades fitoquímicas del mango que contribuyen a beneficios en la salud. Reporte final de la investigación para el Consejo Nacional del Mango. 2009.

Tanaka T. Colorectal carcinogenesis: review of human and experimental animal studies. *J Carcinogenesis* 2009; 8(5):1-19.

Tanaka T, Shnimizu M, Moriwaki H. Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules* 2012; 17(3):3202-3242.

Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101-2114.

Toshiya K, Testuya T, Akira H, Takuji T. Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. *J Biophys Chem* 2012; 3:2.

Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, Galon J. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 2011; 71(4):1263-1271.

Vucenik I, Stains JP. Obesity and cancer risk: evidence, mechanisms, and recommendations. *Ann NY Acad Sci* 2012; 1271:37-43.

Watson AJM. Apoptosis and colorectal cancer. *Gut* 2004; 53(11):1701-1709.

Won HS. Sequential changes in aberrant crypt foci and lectin expression in the early and late stages of DMH-induced colon carcinogenesis in rats. Gut and liver 2012; 6(2):229-234.

Zamorano PE, Romero JF Muñoz PL, Caamaño P R. Un modelo experimental inducible en ratón para conducir estudios en quimioprevención y anticarcinogénesis. Theoria- Concepcion 2009; 17(1):71-86.

Zapata DJ. Efecto del Lipopolisacarido (LPS) de E. Coli, sobre la distribución de mucinas intestinales en lechones pos destete. [Tesis de Mestría]. Antioquia, Colombia: Universidad de Antioquia; 2013.

Zlobec Y, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: The importance of reliable markers for effective selection of therapy. En: The challenge of colorectal cancer. Ed. Cidón 2008; 285-308. Madrid: Signpost.