



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

COORDINACIÓN GENERAL ACADÉMICA

Coordinación de Bibliotecas

Biblioteca Digital

La presente tesis es publicada a texto completo en virtud de que el autor ha dado su autorización por escrito para la incorporación del documento a la Biblioteca Digital y al Repositorio Institucional de la Universidad de Guadalajara, esto sin sufrir menoscabo sobre sus derechos como autor de la obra y los usos que posteriormente quiera darle a la misma.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias



**Efecto del extracto de hojas de camote (*Ipomoea batatas*)
en la expresión de la ornitina descarboxilasa en riñón y
colon en un modelo murino de cáncer de colon**

TESIS

Que para obtener el título de Licenciado en Biología

P R E S E N T A

Mariana Vázquez Rodarte

Las Agujas, Zapopan, Jalisco. Febrero 2016

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias



Efecto del extracto de hojas de camote (*Ipomoea batatas*) en la expresión de la ornitina descarboxilasa en riñón y colon en un modelo murino de cáncer de colon

TESIS

Que para obtener el título de Licenciado en Biología

P R E S E N T A

Mariana Vázquez Rodarte

Directora: Dra. Anne M. H. Santerre

Asesora: Dra. Luz Patricia Castro Félix

Asesora: Dra. María del Rosario Huizar López



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

C. MARIANA VÁZQUEZ RODARTE.
PRESENTE

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "Efecto del extracto de hojas de camote (*Ipomoea batatas*) en la expresión de la ornitina descarboxilasa en riñón y colon en un modelo murino de cáncer de colon.", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo: **Dra. Anne Marguerite Helene Santerre** y como asesoras a **Dra. María del Rosario Huizar López** y a **Dra. Luz Patricia Castro Félix**.
Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 9 de junio de 2015

DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

COMITE DE
TITULACION



DRA. CLAUDIA AURORA URIBE MÚ.
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

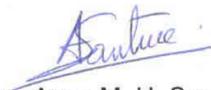
Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad de **TESIS E INFORMES**, opción **TESIS** con el título: **“Efecto del extracto de hojas de camote (*Ipomoea batatas*) en la expresión de la ornitina descarboxilasa en riñón y colon en un modelo murino de cáncer de colon”** que realizó la pasante **Mariana Vázquez Rodarte** con número de código **207526954**, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

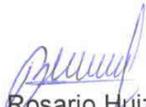
Atentamente
 Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 19 de Enero de 2016.

Directora del trabajo:

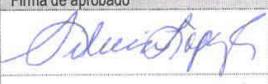

 Dra. Anne M. H. Santerre

Asesores:


 Dra. Luz Patricia Castro Félix


 Dra. María del Rosario Huizar López



Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Silvia Josefina López Pérez		20-Ene-16
Dra. Josefina Casa Solís		21-Enero 16
Dra. Nidia Jannette Carrillo González		20-Ene-16
Supl. Dra. Luz Patricia Castro Félix		19-Ene-2016


 210116.

SEDE

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biomarcadores Moleculares y Genética Molecular del Centro de Investigación en Genética Molecular del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, bajo la dirección de la Dra. Anne M. H. Santerre y asesoría de la Dra. María del Rosario Huizar López y la Dra. Luz Patricia Castro Félix.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo forma parte de los productos de un proyecto de investigación financiado por el Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco-Universidad de Guadalajara (COECYTJAL-UDG) con clave PS-2008-617.

Se agradece a la Dra. Mónica Elisa Ureña Guerrero, responsable del Laboratorio de Biología de la Neurotransmisión del mismo Departamento por permitir el uso del Sistema de Adquisición de Imágenes Gel Logic 100 obtenido de los recursos externos CONACYT #48002.

*“Cualquier cosa que la mente del hombre puede concebir y creer,
puede ser conseguida”*

Napoleón Hill

*“Si puedes soñarlo puedes hacerlo, recuerda que todo esto
comenzó con un ratón”*

Walt Disney

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a mis padres, ya que ellos son y serán siempre mi motivo para querer llegar cada vez más lejos.

Mi esfuerzo es para que sepan que también el suyo ha valido la pena.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por darme la oportunidad de estar siempre en el lugar y con las personas indicadas.

A mi Familia

Por darme su apoyo y cariño en cada momento y siempre estar al pendiente en cada paso a lo largo de mi formación profesional. Les agradezco cada una de las veces en que comprendieron las razones de pasar tanto tiempo en la computadora. Gracias mamá y papá por cuidar de mi cuando estuve aprisa y con preocupaciones, sin ustedes todo esto habría sido mucho más difícil.

A la Dra. Anne Santerre

Por darme su apoyo y confianza al asignarme este proyecto. Gracias por no solo ser mi maestra, si no también mi amiga y mamá académica. Debo decir que además de darme una oportunidad, también me dio el valor para seguir adelante, porque cuando yo dude usted siempre dijo “si vas a poder”. Gracias por todo su apoyo a lo largo de mi formación profesional y en el desarrollo de este proyecto. Usted fue uno de mis motivos para llevar este trabajo hasta al final.

A la Dra. Patricia Castro

Por ver en mí las capacidades de un buen estudiante y darme la oportunidad de entrar al laboratorio, gracias por compartir sus conocimientos conmigo y ser parte tan importante de mi formación académica y este proyecto.

A la Dra. Rosario Huizar

Gracias por ser mi maestra y darme las herramientas para realizar este trabajo.

A mis sinodales

Gracias a las Dra. Silvia Josefina López, Dra. Josefina Casas y Dra. Nidia Jannette Carrillo por su tiempo, apoyo y ayuda para mejorar mi trabajo.

A la Familia Hernández Puga

Por seguir cada paso del desarrollo de este proyecto y alentarme a seguir adelante sin importar que tan difícil fuera lograr el objetivo.

A Octavio

Gracias por no soltar mi mano a lo largo de la bonita aventura que fue mi carrera, por darme tu apoyo, comprensión y cariño en los momentos más difíciles, gracias por hacerme sentir importante, fuerte y capaz de lograr cualquier cosa. Este es el primero de muchos logros que tendremos juntos. Gracias por llegar a mi vida y estar a mi lado siempre.

A mis compañeros y amigos de laboratorio

Gracias a Athiziri, Josema, Oscar, Brenda, Andres, Karen, Luis e Itzel por las charlas tan agradables, por los momentos divertidos y las risas, por tomarse el tiempo de escuchar mis quejas y dar sus consejos para mejorar mi trabajo, pero sobre todo gracias a todos por la bonita amistad que me regalan. Luis, Karen e Itzel gracias por su apoyo en el trabajo experimental. Agradezco a Oscar por creer en mis conocimientos y habilidades de laboratorio.

A mis amigas

Miriam, Natali y Ale por su apoyo y buenos deseos durante mi trabajo en este proyecto. Gracias por decir siempre "tú puedes".

A mi mascota

Gracias a Pepa por recordarme cada noche de desvelo que tenía que dormir, y obligarme a despejarme de mi escritorio para salir a pasear y despejar la mente.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	1
I. ANTECEDENTES	2
1.1 Cáncer colorrectal.....	2
1.2 Modelo de desarrollo del cáncer colorrectal	3
1.3 Factores de riesgo del cáncer colorrectal.....	4
1.4 Marcadores tumorales del cáncer colorrectal.....	5
1.5 Ornitina descarboxilasa y poliaminas	7
1.6 Regulación de los niveles de la ornitina descarboxilasa.....	10
1.7 Ornitina descarboxilasa y cáncer	12
1.8 Modelo murino de cáncer de colon	13
1.9 Quimioprevención del cáncer colorrectal	13
1.10 Polifenoles	15
1.11 Propiedades del extracto etanólico de las hojas del camote dulce (<i>Ipomoea batatas</i>) ..	16
1.12 Los polifenoles y su efecto en cáncer	17
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS	21
V. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo General.....	22
5.2 Objetivos particulares	22
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	23
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	24
7.1 Animales de experimentación	24
7.2 Extracción de proteínas totales de riñón y colon	25
7.3 Cuantificación de proteínas totales de riñón y colon	25
7.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).....	26
7.5 Identificación de proteínas por Western blot	26
7.5.1 Electrotransferencia a membrana de PVDF.....	26

7.5.2 Incubación con anticuerpos anti-ODC y anti- β -actina	27
7.5.3 Revelado de la proteína ODC.....	28
7.6 Análisis de datos.....	28
VIII. RESULTADOS	29
8.1 Cuantificación de proteínas por el micrométodo de Bradford	29
8.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y electrotransferencia a membrana de PVDF	29
8.3 Identificación de las proteínas ODC y β -actina por Western blot.....	31
8.4 Determinación de la expresión relativa de la ODC	32
IX. DISCUSIÓN	39
X. CONCLUSIONES	44
XI. PERSPECTIVAS	45
XII. REFERENCIAS	46
XIII. ANEXOS.....	56
11.1 Anexo 1. Preparación y administración de la 1,2 dimetilhidracina (DMH).....	56
11.2 Anexo 2. Obtención y determinación de fenoles totales del extracto etanólico de <i>Ipomoea batatas</i>	57
11.3 Anexo 3. Concentración de proteínas totales de riñón	58
11.4 Anexo 4. Concentración de proteínas totales de colon.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alteraciones moleculares del cáncer colorrectal	3
Figura 2. Representación del homodímero de la ornitina descarboxilasa de ratón	8
Figura 3. Estructura de las tres principales poliaminas	8
Figura 4. Vía general de la biosíntesis y catabolismo de las poliaminas.....	9
Figura 5. Degradación de la proteína ornitina descarboxilasa.	11
Figura 6. Principales grupos de compuestos fenólicos	15
Figura 7. Flores y hojas de la planta del camote dulce (<i>Ipomoea batatas</i>).....	16
Figura 8. Curva estándar de BSA.....	29
Figura 9. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas de riñón.....	30
Figura 10. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas de colon	30
Figura 11. Expresión de la ODC y β -actina de muestras de riñón	31
Figura 12. Expresión de la ODC y β -actina de muestras de colon.....	31
Figura 13. Expresión relativa de la proteína ODC en riñón y colon de ratones Balb/c, semana 6.....	32
Figura 14. Expresión relativa de la proteína ODC en riñón y colon de ratones Balb/c, semana 12.....	33
Figura 15. Expresión relativa de la proteína ODC en riñón y colon de ratones Balb/c, semana 18.....	34
Figura 16. Expresión relativa de la proteína ODC en riñón y colon de ratones Balb/c, semana 24.....	35
Figura 17. Expresión relativa de la proteína ODC en riñón y colon de ratones Balb/c, semana 31.....	36
Figura 18. Inyección subcutánea del DMH para la inducción de cáncer colorrectal.....	56
Figura 19. Curva estándar de ácido galico para la cuantificación de fenoles totales.....	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Biomarcadores preneoplásicos identificados para cáncer colorrectal	6
Cuadro 2. Grupos experimentales	24
Cuadro 3. Cantidad de proteína y dilución de anticuerpos para la detección de la ODC y β-actina.....	27
Cuadro 4. Valores de expresión relativa de la ODC en riñón.....	37
Cuadro 5. Valores de expresión relativa de la ODC en colon	38
Cuadro 6. Concentración de proteínas totales de riñón	58
Cuadro 7. Concentración de proteínas totales de colon	59

ABREVIATURAS

µg	Microgramo	ODC	Ornitina descarboxilasa
µL	Microlitro	PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
ACE	Antígeno carcinoembrionario	PAO	Poliamina oxidasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico	PAs	Poliaminas
ARN	Ácido ribonucleico	pH	Potencial de Hidrogenon
APC	Poliposis Adenomatosa de Colon	PLP	Fosfato de piridoxal
AZs	Antizimas	PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>
Bis	N,N-Metilenobisacrilamida	PVDF	<i>Polivinildenedifloride</i>
BSA	Albúmina de suero bovino	PO	Proto-oncogen
CCR	Cáncer colorrectal	Pu	Putrescina
DCC	Gen deletado en carcinoma colorrectal.	rpm	Revoluciones por minuto
DFMO	Difluorometilornitina	SDS	Dodecil sulfato de sodio
DMH	1,2-dimetilhidracina	Spd	Espermidina
g	Gramo	SPDS	Espermidina sintasa
GST	Gen supresor de tumor	Spm	Espermina
h	Hora	SPMS	Espermina sintasa
kDa	Kilodalton	SSAT	Espermidina/espermina acetil transferasa
Kg	Kilogramo	TBS	Solución amortiguadora tris salino
mg	Miligramo	TBS-T	Solución amortiguadora tris salino y Tween 20
Milli Q	Agua desionizada	TCF	Factor de células T
min	Minuto	Tris-base	tris(hidroximetil)aminometano
mL	Mililitro	Tris-HCL	tris(hidroximetil)aminometano hidrocioruro
mM	Milimolar		
MT	Marcador tumoral	V	Volt

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad compleja caracterizada por la progresión y acumulación de diversas alteraciones genéticas. En nuestro país, esta enfermedad es el tercer tipo de cáncer más frecuente entre todos los tipos de tumores malignos y constituye el cáncer más común del tracto digestivo. Existen factores de riesgo genéticos y ambientales que intervienen en el desarrollo del CCR, ya que tanto las condiciones hereditarias como el estilo de vida y hábitos alimenticios, pueden influir en la susceptibilidad al carcinoma.

La búsqueda constante de nuevos fármacos y terapias para la prevención, retraso o inhibición del CCR, en los últimos años se ha enfocado en productos naturales específicamente de origen vegetal. Comparado con otras plantas, el camote dulce (*Ipomoea batatas*) presenta un alto contenido de polifenoles, especialmente en las hojas, y se considera que estos compuestos poseen actividad antiproliferativa.

La ornitina descarboxilasa (ODC) ha sido propuesta como biomarcador preneoplásico, debido a que en células tumorales el contenido de esta proteína se eleva significativamente y su expresión no controlada está estrechamente relacionada con la transformación e hiperproliferación celular. En el presente trabajo se utilizó un modelo experimental murino para evaluar durante 31 semanas la expresión de la ODC como marcador del efecto del extracto de hojas de camote en el proceso de carcinogénesis. Mediante la técnica de Western blot se identificó y determinó la expresión de la ODC en riñón y colon de ratones Balb/c tratados con el carcinógeno 1,2-dimetilhidracina (DMH) y/o el extracto etanólico de las hojas de *I. batatas*. Los resultados en los diferentes grupos experimentales mostraron que la expresión relativa de la ODC en riñón fue mayor que en colon. Además, se observó un incremento a las semanas 12 y 24 de la ODC en colon durante el tratamiento con DMH; y que el extracto administrado de manera preventiva no moduló la expresión de la proteína. En riñón, se observó una expresión mayor de la ODC en el grupo DMH en relación al grupo control a lo largo del estudio. Además, la expresión de la ODC en el grupo preventivo disminuyó, aún si las diferencias estadísticas no fueron significativas, en comparación con el grupo DMH a las semanas 6, 12 y 18.

I. ANTECEDENTES

1.1 Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad compleja en la que participan factores de riesgo genéticos y ambientales que provocan anomalías en las células del colon o del recto, causando que éstas se dividan sin control y se promueva el desarrollo inicial de pólipos y posteriormente tumores (Márques, 2011; Juárez y Rosales, 2014). Dichas anomalías son el resultado de la progresión y acumulación de diversas alteraciones genéticas asociadas principalmente a cambios en tres tipos de genes: proto-oncogenes (PO), genes supresores de tumores (GST) y genes de reparación de ADN. La activación mutacional de los PO a oncogenes en conjunto con la inactivación de GST promueven un crecimiento celular potenciado, mientras que las mutaciones en genes reparadores del ADN promueven la acumulación de errores durante la replicación (Catalán *et al.*, 2003; Zamorano *et al.*, 2008).

El CCR es una de las neoplasias más prevalentes en los países occidentales y una de las principales causas de muerte en estos países (Juárez y Rosales, 2014); representa el tercer tipo de cáncer más común y la cuarta causa de muerte por cáncer a nivel mundial (Mantilla *et al.*, 2014). En nuestro país, esta enfermedad es considerada como el tercer tipo de cáncer más frecuente entre todos los tipos de tumores malignos, precedida únicamente por el cáncer de pulmón y próstata en hombres, y cervicouterino y de mama en mujeres (World Health Organization, 2014).

Recientemente Villalobos *et al.* (2014) en un estudio realizado en cuatro hospitales de la ciudad de México observaron que a partir de la década de los 90's se aprecia un aumento progresivo de la incidencia de CCR hasta alcanzar, al final del estudio, el primer lugar en neoplasias del tracto digestivo en todas las instituciones, lo cual fue relacionado con cambios en la dieta de la población en general. Otras investigaciones indican que actualmente en México el CCR representa el 5.8% de las neoplasias malignas y constituye el cáncer más común del tracto digestivo (González y Bahena, 2010; World Health Organization, 2014).

1.2 Modelo de desarrollo del cáncer colorrectal

La carcinogénesis es un proceso de múltiples etapas en el que se sugieren al menos tres estadios: iniciación, promoción y progresión (Zamorano *et al.*, 2008). Durante la etapa de iniciación se producen mutaciones génicas, que provocan un cambio irreversible en las células caracterizado por una capacidad intrínseca de crecimiento autónomo; en la fase de promoción, las células se comprometen a ser cancerosas, son estimuladas a dividirse, se vuelven morfológicamente anormales y pueden causar la formación de un foco de células preneoplásicas. Durante la fase de progresión, también conocida como fase de transición al carcinoma, se desarrollan mutaciones adicionales que terminan por conferirle el fenotipo maligno a las células, lo que permite que sobrevivan y se multipliquen sin control aumentando su capacidad de invasión a nuevos tejidos y metástasis (Zamorano *et al.*, 2008; Reynoso *et al.*, 2009; Vázquez, 2013).

En un modelo de carcinogénesis colorrectal propuesto por Fearon y Vogelstein (1990), denominado secuencia adenoma-carcinoma, se establece que la propagación y crecimiento excesivo no controlado de células estructural y biológicamente anormales, que presentan mutaciones en al menos cuatro a cinco genes, culmina en el desarrollo de una neoplasia o tumor y a su vez condicionan las características del mismo (Figura 1).

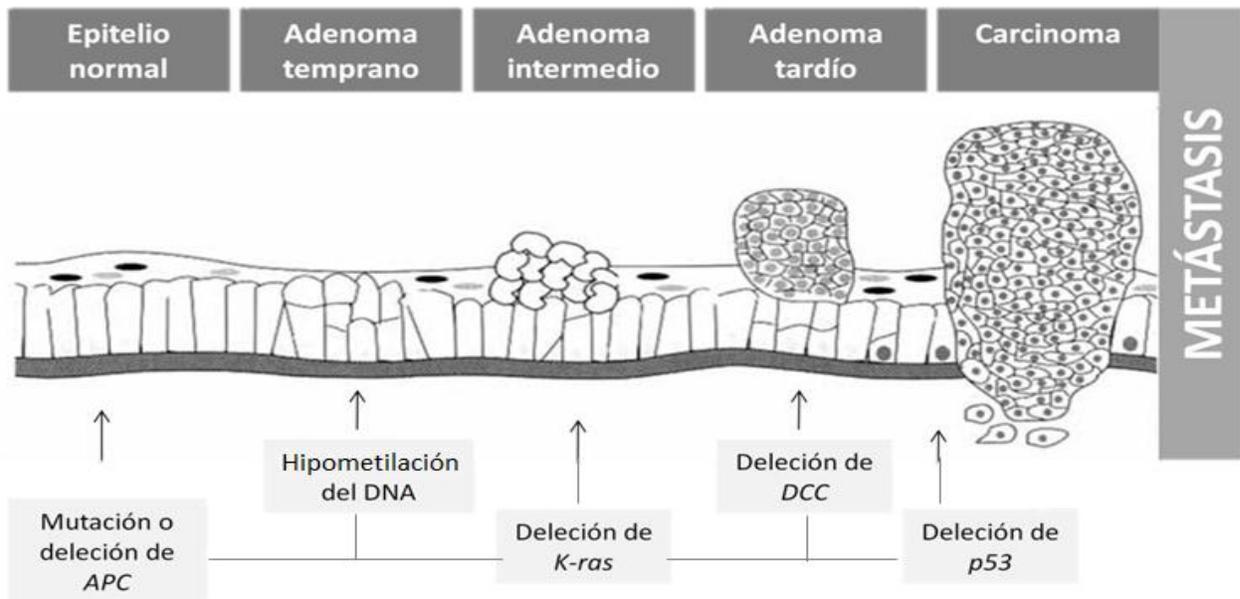


Figura 1. Alteraciones moleculares del cáncer colorrectal. Imagen tomada de Campo y García, 2009.

Según este modelo, los cambios genéticos que conducen al CCR inician con la inactivación del gen *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli* o Poliposis Adenomatosa Colónica), un GST que en seres humanos se localiza en el cromosoma 5, región 5q21, y se encuentra mutado en el 70% de los adenomas de colon. Se cree que las mutaciones en *APC* promueven la carcinogénesis, ya que impiden la degradación de la β -catenina, que al quedar libre en el citoplasma puede formar un complejo con el factor de células T (TCF) y activar la expresión de PO como *c-Myc* y *ciclina D1*. En este mismo modelo después de la inactivación de *APC* se observa también la activación mutacional del PO *K-ras*, el cual codifica una proteína de 21 kDa implicada en la transducción intracelular de señales, por lo que su mutación produce una señal de división celular constante; este tipo de mutación se encuentra en al menos el 50% de los pacientes con adenomas colorrectales mayores a 1 cm y en carcinomas. La fase de transición al carcinoma se caracteriza por la inactivación del GST *DCC* (*Carcinoma colorectal deleted* o gen deletado en carcinoma colorrectal) ubicado en el cromosoma 18, región 18q22, que codifica para una proteína transmembranal que participa en la apoptosis, adherencia, diferenciación y crecimiento celular. El último evento de inactivación mutacional reportado en el modelo de Fearon y Vogelstein se detecta en p53, otro GST involucrado de manera importante en el paso de adenoma a carcinoma y mutado en el 70% de los casos de CCR esporádico (Catalan *et al.*, 2003; Alberici, 2007; Juárez y Rosales, 2014). Aún si el orden de activación e inactivación génica no es absoluto, se considera a la acumulación total de cambios como un factor importante para el desarrollo de neoplasias colónicas (Zamorano *et al.*, 2008).

1.3 Factores de riesgo del cáncer colorrectal

Es un hecho que tener una historia familiar de neoplasias colorrectales o condiciones hereditarias, como poliposis familiar o variantes de síndrome de Lynch I y II, colitis ulcerosa y el desarrollo de pólipos, así como la obesidad, el abuso del consumo de tabaco y/o alcohol, el estrés y un estilo de vida sedentario, son factores de riesgo importantes para el desarrollo del CCR (González y Bahena, 2010; Juárez y Rosales, 2014). Sin embargo, esta enfermedad tiene una incidencia mayor entre la sexta y séptima década de la vida y afecta a menos del 20% de los pacientes menores de 50 años (Vilches *et al.*, 2010).

La mayoría de los casos de CCR derivan de tumores benignos conocidos como adenoma y gran parte de estos casos (aproximadamente el 75%), son de origen esporádico, es decir que ocurren en personas que no portan una mutación que les confiera susceptibilidad al tumor. El

resto de los casos se relaciona con la historia familiar y/o enfermedades intestinales inflamatorias (Cruz, 2004; Juárez y Rosales, 2014).

Estudios epidemiológicos sugieren que factores de riesgo ambientales, especialmente dietéticos, influyen en el desarrollo CCR, indicando que determinados cambios en la dieta, como el incremento de las calorías ingeridas o el aumento progresivo de la ingestión de carnes rojas y grasas de origen animal, en conjunto con la disminución del consumo de vegetales y folatos, coinciden con el aumento en la incidencia del carcinoma, ya que los intestinos grueso y delgado actúan como barreras en contra de agentes exógenos, particularmente en el caso de sustancias con capacidad mutagénica y carcinogénica (Sharma *et al.*, 2001; Zamorano *et al.*, 2008).

En México a partir de la década de los 90's se ha observado un aumento en la incidencia de CCR de origen esporádico, lo cual se relaciona con los cambios en la alimentación de la población general del país (Villalobos *et al.*, 2014). Se asume que la ingesta de frutas y vegetales tiene una relación inversa de riesgos en distintos tipos de cáncer incluyendo el CCR, debido a que muchos constituyentes fitoquímicos de las plantas como los polifenoles se han asociado con propiedades protectoras y un posible papel preventivo en el desarrollo de esta enfermedad (Rodrigo y Riestra, 2007).

1.4 Marcadores tumorales del cáncer colorrectal

Los marcadores tumorales (MT) son sustancias que sintetizan y liberan las células cancerosas o normales en respuesta a un proceso maligno (Santinelli y Cervera, 2010). Dichas sustancias se pueden encontrar en la sangre, en la orina o en otros fluidos corporales, así como también en tumores y en otros tejidos (Cruz *et al.*, 2008). De manera general las aplicaciones de los MT son: el tamizaje, definido como la evaluación de la posibilidad de la existencia de una enfermedad en sujetos sanos; el diagnóstico, que permite la identificación de enfermedades benignas o malignas; el pronóstico, el cual es la predicción de reacción al tratamiento; y la vigilancia o seguimiento de posibles recaídas o progresión de la enfermedad (Santinelli y Cervera, 2010).

El MT antígeno carcinoembrionario (ACE) es una glicoproteína sérica de 200 kDa detectada en el suero de pacientes que presentan CCR y es considerado como el marcador más útil para la vigilancia de individuos con diagnóstico de esta enfermedad, así como para la determinación de

recidiva en pacientes tras la resección quirúrgica del tumor. Sin embargo, este MT al igual que muchos otros carece de sensibilidad y de especificidad para la identificación temprana de la enfermedad neoplásica y presenta poco valor clínico como criterio único de diagnóstico (Santinelli y Cervera, 2010; Menéndez *et al.*, 2013). Otros MT son la inestabilidad de microsatélites, que permite pronosticar el riesgos de cáncer no polipósico y la determinación de sangre oculta en heces que tiene su principal aplicación en el diagnóstico precoz en personas mayores de 50 años (Menéndez *et al.*, 2013).

La mayoría de los CCR surgen a partir de pólipos adenomatosos o adenomas pre-existentes, por lo que la detección precoz de pólipos que pueden progresar hasta la malignidad es de suma importancia y los biomarcadores preneoplásicos (cuadro 1) son una herramienta útil para la identificación de los distintos estadios del proceso de carcinogénesis y el monitoreo de la progresión y desarrollo de la enfermedad en etapas tempranas (Sharma *et al.*, 2001).

Cuadro 1. Biomarcadores preneoplásicos identificados para cáncer colorrectal. Cuadro modificado de Sharma <i>et al.</i> , 2001.		
Tipo de biomarcador	Variable mensurada	Biomarcador
Patológico	Histología	Adenoma, focos crípticos aberrantes
Celular	Proliferación	BrDU, PCNA, Ki67, lectina marcada
	Diferenciación	Lectina marcada
	Apoptosis	Ensayo TUNEL
Bioquímico	Metabolismo del ácido araquidónico	Prostaglandinas, COX-2, ácido araquidónico, lipooxigenasa, leucotrienos
	Metabolismo de las poliaminas	Poliaminas, ornitina descarboxilasa
Molecular	Metilación ADN, aductos ADN	Grupos metil, MTHFR, MDA-aductos ADN
	Ciclo celular	Ciclina D1, TGF α
Genético	Gen/producto	<i>K-ras, APC, DCC</i>

Bromodeoxiuridina (BrDU); Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA); Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated Nick-End Labelling (TUNEL); Ciclooxygenasa 2 (COX-2); Glutation S-Transferasa (GST); Metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR); Malondaldehido (MDA); Factor de Crecimiento Transformante- α (TGF- α); Poliposis Adenomatosa Colónica (APC); Delecionado en Carcinoma Colorrectal (DCC).

Se sugiere a la ornitina descarboxilase (ODC) como biomarcador preneoplásico de carcinogénesis y progresión tumoral, debido a que en células neoplásicas el contenido de ODC se eleva significativamente en la mayoría de los tipos de cáncer, incluyendo displasia y neoplasia colorrectal (Sharma *et al.*, 2001; Thomas y Thomas, 2003). La ODC es la primera enzima limitante del metabolismo de las poliaminas (PAs), las cuales también son uno de los

biomarcadores preneoplásicos bioquímicos de uso potencial en la detección de distintos tipos de cáncer, así como en estudios de quimioprevención, ya que al igual que la ODC, su concentración se correlaciona con la proliferación celular (Sharma *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2005).

1.5 Ornitina descarboxilasa y poliaminas

La ODC (EC 4.1.1.17) es una descarboxilasa de aminoácidos dependiente de fosfato de piridoxal (PLP) que es enzimáticamente activa en forma de homodímero. Presenta dos dominios en cada subunidad (Figura 2), un dominio NH₂-terminal formado por un barril-β/α que se une al cofactor y un dominio COOH-terminal, que es predominantemente una estructura de hoja β; posee dos sitios activos formados por residuos procedentes de ambas subunidades, los cuales se encuentran en una cavidad entre la interfase del dominio NH₂-terminal de una subunidad y el dominio del COOH-terminal de la otra (Kern *et al.*, 1999; Pegg, 2006). Su estructura se encuentra altamente conservada entre las especies de mamíferos; a nivel de aminoácidos existe más del 90% de similitudes entre roedores y humanos, y las regiones promotoras de la ODC son también muy parecidas (Halmeekytö *et al.*, 1991)

La ODC es una enzima citoplasmática, aunque también puede ser encontrada en el núcleo; cuenta con una gran especificidad para la L-ornitina y baja actividad para L-lisina y L-arginina; en eucariontes es la primera enzima limitante de la biosíntesis de PAs (Algranati *et al.*, 2006; Pegg, 2006).

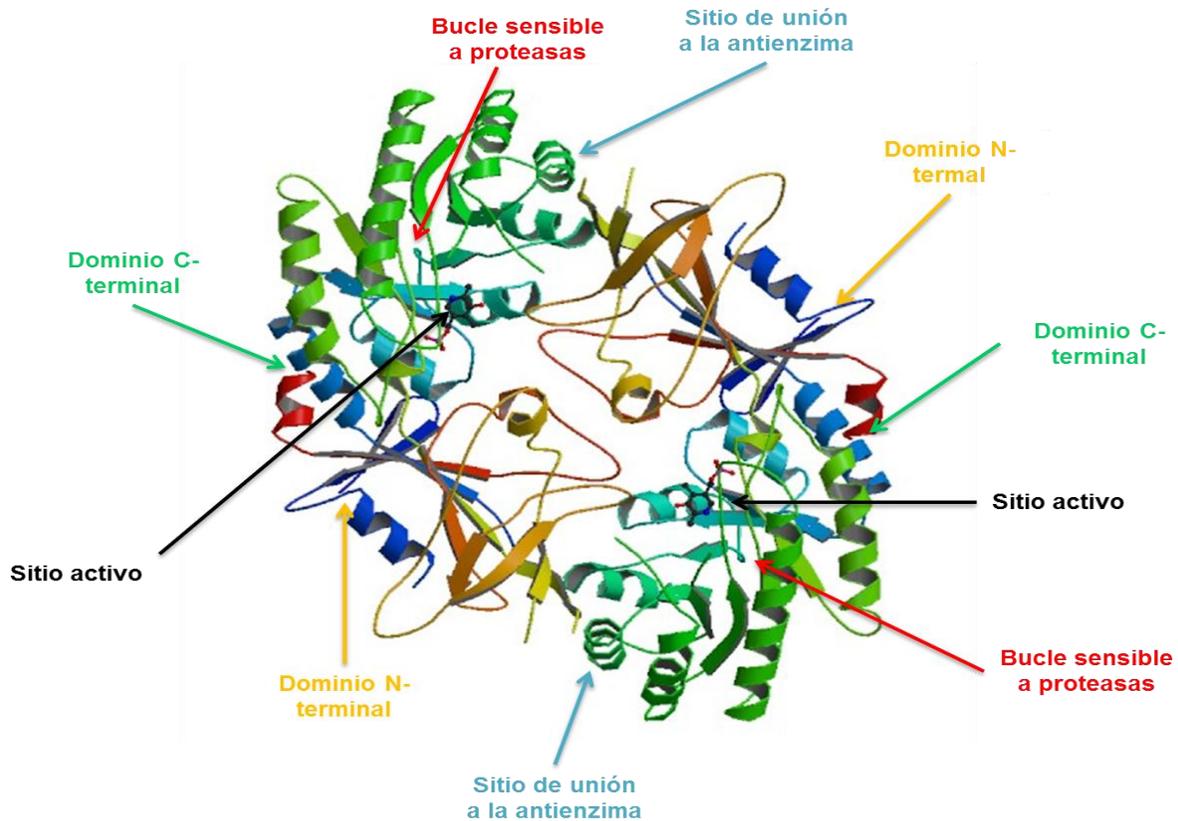


Figura 2. Representación del homodímero de la ornitina descarboxilasa de ratón. Imagen modificada de Kern *et al.*, 1999 y Protein Data Bank, 2011.

Las PAs son un grupo de moléculas básicas de bajo peso molecular presentes en prácticamente todos los organismos vivos. Las más estudiadas son la putrescina (Pu), espermidina (Spd) y espermina (Spm), las cuales se encuentran esencialmente en el citoplasma (Figura 3), aunque en el núcleo se han encontrado aproximadamente 8% de Pu y 16-17% de Spd y Spm (Algranati *et al.*, 2006; Medina, 2009).

Putrescina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
Espermidina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
Espermina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$

Figura 3. Estructura de las tres principales poliaminas. Imagen tomada de Algranati *et al.*, 2006.

La biosíntesis de las PAs en células de mamíferos (Figura 4) se realiza a partir de la descarboxilación del aminoácido ornitina (el cual tiene como precursor directo a la arginina), en una reacción catalizada por la ODC para producir Pu. Posteriormente, la adición de un grupo aminopropilo a la Pu, derivados de la descarboxilación de la S-adenosilmetionina por acción de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC), conduce a la síntesis de Spd. Esta misma reacción se repite para producir Spm a partir de Spd. Estos grupos aminopropilo son adicionados por las enzimas específicas espermidina sintasa (SPDS) y espermina sintasa (SPMS) respectivamente (Thomas y Thomas, 2003; Algranati *et al.*, 2006).

Adicionalmente al control de la biosíntesis de las PAs mediante la actividad de la ODC, la SAMDC, la SPDS y la SPMS, el catabolismo de estas moléculas también es importante para el ajuste de sus niveles intracelulares. Dicho mecanismo es controlado por la espermidina / espermina acetil transferasa (SSAT), que lleva acabo la acetilación de la Spd y Spm, lo que permite el marcaje de las PAs para su degradación por la poliamina oxidasa (PAO), la cual convierte Spm en Spd y Spd en Pu (Thomas y Thomas, 2003).

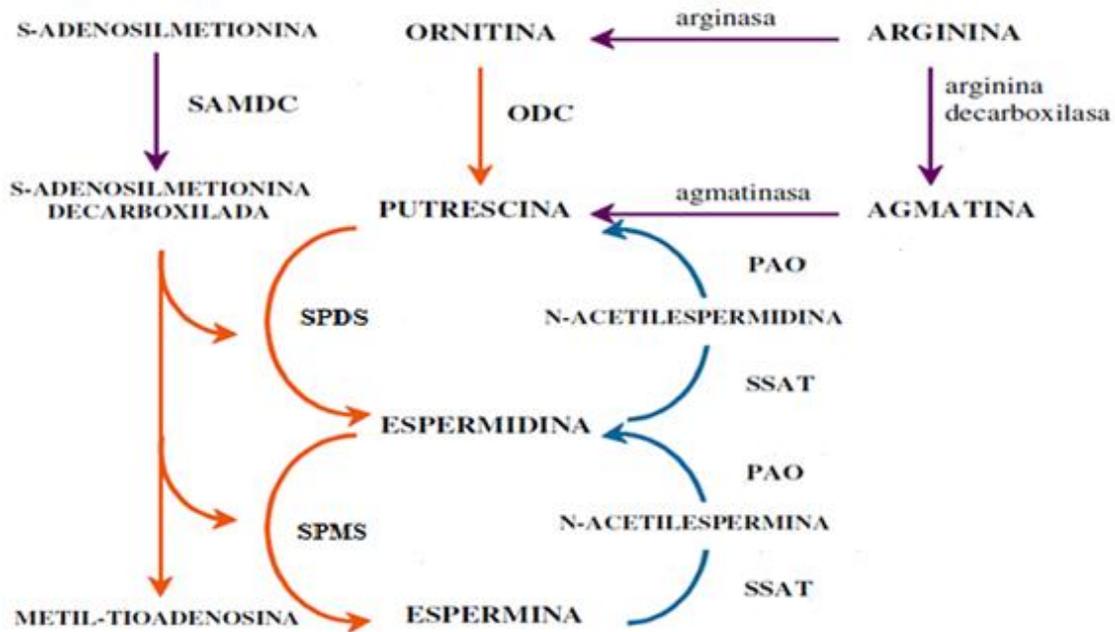


Figura 4. Vía general de la biosíntesis y catabolismo de las poliaminas. Imagen modificada de Algranati *et al.*, 2006.

El control de la biosíntesis, catabolismo, absorción y el flujo de salida de las PAs es necesario para el ajuste adecuado de sus niveles intracelulares (Thomas y Thomas, 2003), lo cual es importante para la replicación, transcripción y traducción adecuada, estabilización de membrana, crecimiento y muerte celular programada o apoptosis (Reynoso *et al.*, 2009), ya que su esqueleto alifático y su naturaleza policationica les permiten interactuar con diferentes regiones de macromoléculas o estructuras cargadas negativamente como el ADN, ARN, nucleoproteínas, fosfolípidos, partículas ribosomales y membranas (Algranati *et al.*, 2006).

La ODC cuenta con un importante papel en la transformación celular y el desarrollo del CCR y otros carcinomas, debido a que el cambio en la actividad de esta proteína es considerado como un evento temprano durante la expresión de malignidad (McConlogue *et al.*, 1984; Hu *et al.*, 2003; Hoshino *et al.*, 2007). En el ratón el gen que codifica para la ODC se encuentra en el cromosoma 12, mientras que en el hombre existen dos secuencias de ADN que codifican para esta enzima; una expresada de forma activa, encontrada en el cromosoma 2 y un pseudogén en el cromosoma 7 (Cox *et al.*, 1988; Pitkänen *et al.* 2001).

1.6 Regulación de los niveles de la ornitina descarboxilasa

La expresión de la proteína ODC varía según el tejido, encontrándose un mayor contenido de esta proteína en el tejido renal con respecto al intestino, hígado y mesotelio murino (Zamora, 2006). El riñón de ratones es el sistema en el que ha sido mejor estudiada la actividad de la ODC y ha sido claramente localizada mediante el uso de varias técnicas en la corteza renal, particularmente en los túbulos contorneados proximales. En este órgano la ODC constituye de 0.01 a 0.05% de su proteína citoplasmática inducida por andrógenos, lo que representa la mayor actividad de ODC descrita en mamíferos. Se ha demostrado que la ODC es una de las enzimas más altamente inducibles, ya que andrógenos como la testosterona provocan un aumento rápido y prolongado de la síntesis del ARNm y de la actividad de la proteína; bajo estas condiciones aumenta también la producción renal y excreción de la Pu en ratones macho y hembras tratadas con dosis farmacológicas de testosterona (McConlogue *et al.*, 1984; Levillain *et al.*, 2003).

En células animales la ODC cuenta con una vida media muy corta de 15 a 30 min, lo que permite una fina regulación de su expresión. La inducción y degradación de la ODC son modulados por mecanismos que responden a los niveles intracelulares de las PAs; su

regulación ocurre a múltiples niveles, incluyendo la transcripción de PO como *c-myc*, traducción del ARNm, recambio proteico e interacciones y modificaciones postranscripcionales. Además el aumento en los niveles de esta enzima puede ser inducido en respuesta a muchos estímulos, tales como hormonas, factores de crecimiento y promotores tumorales (Hu *et al.*, 2003; Algranati *et al.*, 2006).

El control del recambio proteico de la ODC es mediado por las antizimas (AZs), las cuales son sintetizadas en presencia de niveles altos de PAs y actúan uniéndose de manera irreversible al monómero de la ODC, lo que promueve su degradación proteolítica (Mitchell *et al.*, 2004; Schipper *et al.*, 2004). Tres isoformas independientes de AZs han sido descritas, las cuales se distinguen como AZ1, AZ2 y AZ3 (López *et al.*, 2006). La AZ1 es la primera descrita, tiene una alta afinidad por una región rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina (PEST) ubicada cerca del extremo C-terminal de la cadena polipeptídica y corresponde a una señal de proteólisis selectiva, impidiendo la formación del homodímero activo de ODC y la promoción de su degradación independiente de ubiquitina por el proteosoma 26S (Figura 5) (Levillain *et al.*, 2003; Algranati *et al.*, 2006; López *et al.*, 2006). La AZ2 al igual que AZ1 inhibe a la ODC y tiene una amplia distribución tisular, sin embargo, no acelera su degradación, mientras que AZ3 se encuentra únicamente en los testículos (Pitkänen *et al.*, 2001; Schipper *et al.*, 2004). Además de inactivar y promover la degradación de la ODC, las AZ1 y AZ2 evitan la acumulación de las PAs mediante la inhibición o supresión del transporte de las mismas (Mitchell *et al.*, 2004; López *et al.*, 2006).

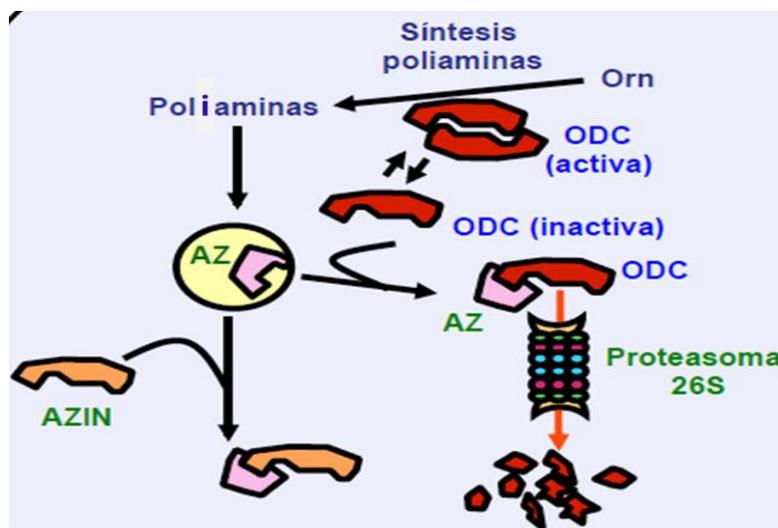


Figura 5. Degradación de la proteína ornitina descarboxilasa. Unión de la AZ a la región PEST de la ODC y su degradación por el proteosoma 26S (AZIN, inhibidor de la AZ). Imagen tomada de Ramos, 2013.

1.7 Ornitina descarboxilasa y cáncer

La actividad de la ODC ha sido constantemente relacionada con la progresión de la carcinogénesis, tanto en modelos animales como en pacientes. En células y tejidos sanos la ODC tiene una actividad baja con presencia mínima, pero durante el crecimiento y diferenciación celular existe un aumento en su actividad y en el caso de tejidos de células neoplásicas, el contenido de ODC se eleva considerablemente (Zamora, 2006; Sharma *et al.*, 2001). En la mayoría de los tipos de cáncer como en el carcinoma de estómago, pulmón, pecho, cabeza y cuello, piel, próstata y colon se ha demostrado una alta actividad de la ODC (Mohan *et al.*, 1999; Hoshino *et al.*, 2007).

Las alteraciones en el GST APC, son consideradas como uno de los cambios genéticos iniciales en el desarrollo del CCR en células germinales de roedores y humanos, lo que se asocia con un incremento de la actividad de la ODC (Fearon y Vogelstein, 1990; Thomas y Thomas, 2003) y por consiguiente parte importante de la activación de la biosíntesis de PAs. Esto está estrechamente relacionado con la rápida proliferación de las células cancerosas del colon, las cuales son capaces de utilizar todas las PAs disponibles y por el contrario, niveles bajos de PAs tienen como resultado un arresto celular en la fase G1 del ciclo (Hu *et al.*, 2003; Milovic y Turchanowa, 2003).

En biopsias de CCR la actividad de ODC, SAMDC y la concentración de PAs se encuentran incrementadas de 3 a 4 veces más que en tejido sano, lo que contribuye a la carcinogénesis y progresión tumoral (Milovic y Turchanowa, 2003; Thomas y Thomas, 2003). La ODC juega un papel crítico en la transformación celular y está implicada como un promotor esencial para la proliferación celular. Sin embargo, algunos datos sugieren que la inducción de la ODC es necesaria pero no suficiente para promover la tumorigénesis, mientras que la sobreexpresión de la ODC en conjunto con la expresión de oncogenes es suficiente para inducir la transformación celular (Rozhin *et al.*, 1984; Thomas y Thomas, 2003).

1.8 Modelo murino de cáncer de colon

Los modelos murinos de CCR son adecuados para obtener resultados transferibles a la situación clínica; no solo han permitido corroborar gran parte de los conocimientos obtenidos en las investigaciones para determinar el origen y factores de riesgo del CCR humano, sino que también han sido una herramienta útil en el estudio de posibles marcadores preneoplásicos, el efecto de agentes preventivos y el avance en la búsqueda de alternativas terapéuticas para la carcinogénesis colorrectal (Cazares, 2010; Márques, 2011; Karaca *et al.*, 2012).

Uno de los carcinógenos más comúnmente utilizado para la inducción química del CCR es la 1,2-dimetilhidracina (DMH), ya que presenta una eficiencia del 80 al 100% dependiendo del modelo experimental, por lo que es considerado como uno de los químicos más efectivos (Tong *et al.*, 2011; Cazares, 2010). Este compuesto ha sido utilizado en distintas cepas de roedores, tales como, ratas *Sprague-Dawley* (Pérez *et al.*, 2005), ratas *Holtzmann* (Justil *et al.*, 2010), ratas *Wistar* albinas (Sadik y Shaker, 2012) y ratones Balb/c (Gali *et al.*, 2001; Cazares, 2010; Márques, 2011; Karaca *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2014), principalmente porque el modelo murino de CCR inducido por DMH recapitula de manera muy similar la secuencia adenoma-carcinoma tal y como ocurre en los seres humanos, tanto macroscópicamente como a nivel molecular. La DMH permite la inducción de CCR en ratones de la cepa Balb/c dependiendo de la dosis y el tiempo de tratamiento, ya que diversos autores indican que es necesario inyecciones repetidas de DMH para la inducción irreversible de alteraciones moleculares e histológicas en el colon de roedores, como mutaciones en los genes *APC* y *K-ras*, formación de focos de criptas aberrantes (FCA), adenoma y carcinoma (Perše y Cerar, 2005; Robertis *et al.*, 2011). Este modelo de estudio es considerado relativamente rápido, reproducible y simple (Pérez *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2011).

1.9 Quimioprevención del cáncer colorrectal

La quimioprevención del cáncer puede definirse como la inhibición, retraso o inversión del proceso carcinogénico mediante recursos químicos. Se conoce como quimioprevención primaria o secundaria (según implique individuos sanos o con predisposición al desarrollo de la enfermedad respectivamente) a la prevención de la carcinogénesis en un estadio premaligno o en una fase inicial de malignidad, mientras que la prevención de los casos de enfermedades

neoplásicas tratados con éxito, pero con riesgo elevado de reincidir, se denominan quimioprevención terciaria (Sharma *et al.*, 2001).

Los métodos más comúnmente utilizados para el tratamiento del CCR son la cirugía, la quimioterapia y radioterapia, estos últimos pueden realizarse de manera individual o como complemento de otros tratamientos. Sin embargo, en etapas avanzadas de la enfermedad estas técnicas, aunque se realicen de manera adecuada, no garantizan ni previenen una recaída local o a distancia, además producen efectos colaterales en el organismo y presentan una baja efectividad (Avila, 2008; Calderillo, 2008; Vázquez, 2013). Diversos estudios han utilizado posibles agentes quimiopreventivos con distintos mecanismos de acción para reducir el riesgo de desarrollar CCR; los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), como la aspirina y sulindac, han demostrada su eficacia en la prevención de adenoma y CCR a través de la modulación del metabolismo de la prostaglandina E2 por inhibición de las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2), sin embargo, se desconoce la dosis y la duración necesaria de un posible tratamiento para obtener dichos beneficios (Silva, 2008; Fernández, 2011; Zubiaurre y Bujanda, 2011). De la misma manera, los químicos derivados de las plantas como los folatos (abundante en vegetales verdes) pueden ejercer un efecto protector sobre la carcinogénesis del colon, debido a su participación en el mantenimiento de la integridad y estabilidad del ADN por ser factores importantes para la biosíntesis de purinas y timidilato (Sadik y Shaker, 2012).

Las PAs, así como las enzimas que participan en la modulación de su vía metabólica, están involucradas en casi todos las etapas de la carcinogénesis de colon, por lo que se han convertido en un objetivo bioquímico de los agentes quimiopreventivos del CCR (O'Brien *et al.*, 1997; Milovic y Turchanowa, 2003). La modulación de la biosíntesis de las PAs se ha llevado a cabo principalmente por la inhibición de la primera enzima límite de su metabolismo, mediante el uso de diversos agentes químicos y fitoquímicos. Uno de los inhibidores selectivos de la ODC más estudiados es la α -Difluorometilornitina (DFMO), la cual se une de manera irreversible al aminoácido Cys-360, que desempeña un papel importante en la química de la reacción ODC/ornitina, inhibiendo así la actividad de esta enzima (Milovic y Turchanowa, 2003; Zamora, 2006). Desafortunadamente incluso este inhibidor selectivo de la ODC, es solo ligeramente eficaz en la inhibición del crecimiento del tumor a dosis bajas y por el contrario una dosis alta induce ototoxicidad reversible (Sharma *et al.*, 2001; Mitchell *et al.*, 2004; Reynoso *et al.*, 2008).

Uno de los fundamentos de la medicina alternativa en el tratamiento y prevención del cáncer es utilizar sustancias naturales que podrían incluirse en la dieta, ya que estudios epidemiológicos y experimentales sugieren una estrecha relación entre el riesgo de desarrollar CCR y factores

dietéticos (Zamorano *et al.*, 2008). Se ha relacionado a algunos fitoquímicos de los vegetales como los polifenoles con la disminución de las PAs y la ODC en células del CCR, además a estos compuesto se les atribuye una actividad antitumoral y grandes beneficios a la salud humana sin efectos adversos por consumo regular (Bachrach y Wang, 2002; Milovic y Turchanowa, 2003; Bhooshan y Ibrahim, 2009).

1.10 Polifenoles

Los polifenoles también conocidos como fenilpropanoides o compuestos fenólicos, son sustancias químicas derivadas del fenol (un anillo aromático con un grupo hidroxilo) que constituyen uno de los productos del metabolismo secundario más numerosos y ubicuos de las plantas (Ávalos y Urría, 2009; Granado, 2010). Representan el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal y pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de anillos de fenol que contienen y de los elementos estructurales que presentan dichos anillos; los principales y más ampliamente distribuidos compuestos fenólicos son (Figura 6): los ácidos y alcoholes fenólicos, estilbenos, lignanos y flavonoides (Bhooshan y Ibrahim, 2009; Quiñones *et al.*, 2012).

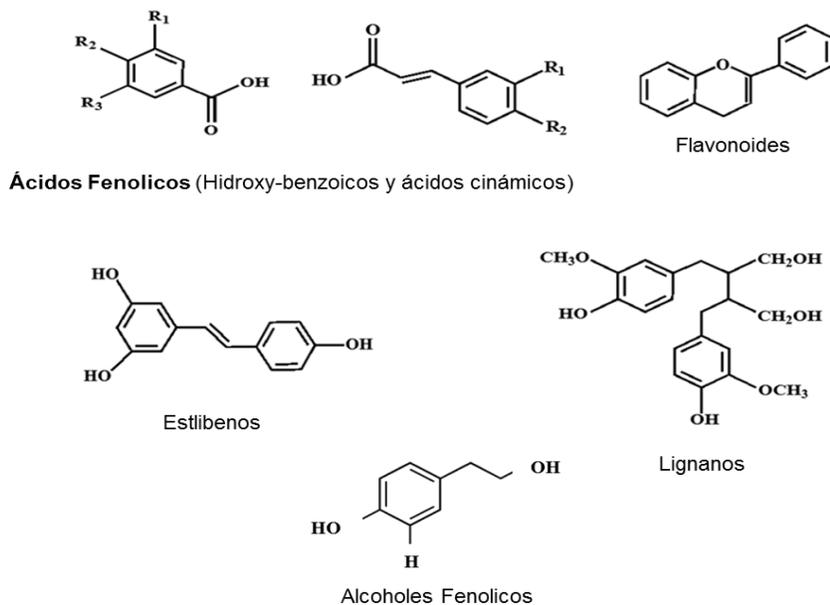


Figura 6. Principales grupos de compuestos fenólicos. Imagen modificada de Bhooshan y Ibrahim, 2009.

Los compuestos fenólicos constituyen una parte importante de la dieta humana por su ubicuidad en los alimentos de origen vegetal; estos compuestos presentan actividades antioxidativas, cardioprotectoras, antiinflamatorias, antimicrobianas y anticancerígenas (Li *et al.*, 2014). Por lo que una dieta rica en polifenoles ofrece efectos benéficos en la prevención de enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, diabetes y osteoporosis (Bhooshan y Ibrahim, 2009). Se considera que los contenidos más altos de compuestos fenólicos se encuentran en el frijol de soya, hojas de pimienta, hojas de ginseng, cebollín, brócoli, té verde y hojas de camote (Li *et al.*, 2014).

1.11 Propiedades del extracto etanólico de las hojas del camote dulce (*Ipomoea batatas*)

El camote dulce (*Ipomoea batatas*) es una planta herbácea y perenne, con tallos cilíndricos que se expanden de manera horizontal; su sistema radicular consiste en raíces fibrosas (raíces que sostienen a la planta y absorben nutrientes y agua) y raíces reservantes (raíces engrosadas que almacenan los productos fotosintéticos); sus hojas son simples y alternas que pueden ser enteras, dentadas o lobuladas con la base de la lámina generalmente acorazonada, pecioladas y de pigmentación verde y ocasionalmente moradas, sus flores cuentan con pétalos unidos en forma tubular que en el interior es de color morado y en el limbo en general es lila o morado blanquecino (Figura 7) (Huamán, 1992; Vázquez, 2013). *I. batatas* se encuentra dentro de la siguiente clasificación taxonómica de acuerdo con la forma capitada del estigma y la superficie del grano de polen, la cual es espinosa (Huamán, 1992):

- Reino: Plantae
- Subreino: Tracheobionta
- División: Spermathophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Asteridae
- Orden: Solanales
- Familia: Convolvulaceae
- Género: *Ipomoea* L.
- Especie: *I. batatas* (L.) Lam (Basantes, 2012).



Figura 7. Flores y hojas de la planta del camote dulce (*Ipomoea batatas*). Imagen tomada de Vázquez, 2013.

En comparación con otros vegetales el camote dulce, además de contar con un alto contenido de nutrientes, vitaminas y minerales, presenta una elevada concentración de polifenoles en las hojas y se considera que los flavonoides son uno de sus principales componentes activos (Li *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2010; Karna *et al.*, 2011). Los fitoquímicos de *I. batatas* presentan varias funciones promotoras de la salud; estudios recientes indican que el extracto metanólico de las hojas de camote ejercen una actividad antiproliferativa dosis dependiente en líneas celulares de cáncer de estómago, colon, útero, pulmón e hígado (Kang *et al.*, 2010). Además se le ha atribuido una posible actividad antidiabética, ya que en una investigación realizada por Li *et al.* (2009) encontraron una disminución de la glucosa en sangre, colesterol total y triglicéridos en ratones diabéticos tratados con el extracto etanólico de las hojas del camote.

1.12 Los polifenoles y su efecto en cáncer

El consumo de los compuestos fenólicos, particularmente del grupo de los flavonoides, encontrados en diversas plantas presenta un efecto antitumoral dosis dependiente en diversos tipos de células y tejidos. Este efecto es determinado por distintos mecanismos entre los que se encuentran el arresto de la célula en alguna parte del ciclo celular, apoptosis y sobreexpresión de genes relacionados con la misma, la disminución del contenido de PAs, así como de las moléculas que participan en su metabolismo (Schneider *et al.*, 2000; Carnésecchi *et al.*, 2002). Compuestos como el resveratrol, genisteína y procianidina, pertenecientes al grupo de los flavonoides, en estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado tener un efecto sobre la ODC, ya que disminuye de manera significativa la actividad de esta proteína y por consiguiente provoca una reducción en el contenido intracelular de PAs. En correlación con lo anterior, la proliferación celular y el desarrollo de tumores también se han visto disminuidos por el tratamiento con estos compuestos (Tseng y Verma, 1996; Schneider *et al.*, 2000; Carnésecchi *et al.*, 2002).

Se considera que el té verde (*Camellia sinensis*) es una de las plantas con mayor contenido de polifenoles, ya que representan el 30% del peso seco de las hojas y se ha observado que el extracto de esta planta previene la aparición de tumores en modelos murinos de cáncer gástrico o de piel y disminuye la expresión de la ODC en el tejido y de Spd intracelular (Bomser *et al.*, 2000; Bachrach y Wang, 2002). El contenido de polifenoles en las hojas de *Ipomoea batatas* es similar al encontrado en el té verde; en nuestro laboratorio se determinó, mediante el método de Folin, que el contenido de los fenoles totales en el extracto etanólico de las hojas de *I. batatas* es de 2,720 mg/100 g de muestra (Vázquez, 2013; Anexo 2).

En estudios *in vitro* la administración del extracto de las hojas del camote dulce disminuyó el crecimiento de las células de cáncer de colon, estómago y leucemia promielocítica; en esta última también se observó una mayor actividad de la caspasa 3 y una expresión elevada del gen *c-jun*, el cual está relacionado con la apoptosis (Kurata *et al.*, 2007). Se sugiere que el desarrollo del cáncer y la actividad quimiopreventiva de los polifenoles también puede ser explicado mediante el efecto sobre la proteína ODC, debido a su importancia en la proliferación y transformación celular (Bachrach y Wang, 2002). En el presente trabajo se utilizó un modelo experimental para evaluar mediante la técnica de Western blot, la expresión de la ODC como marcador del efecto del extracto de camote como una alternativa terapéutica para inhibir, retrasar o revertir el proceso de carcinogénesis del colon.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CCR es uno de los principales problemas de salud pública, debido a su alta incidencia y mortalidad. Su principal y más efectiva forma de tratamiento es la cirugía, sin embargo, el 50% de los pacientes, en los que se ha conseguido la eliminación del tejido dañado, presentan reincidencia, por lo que es indiscutible la necesidad de nuevas alternativas en el tratamiento y prevención de esta enfermedad.

Se considera que el control negativo de la biosíntesis de poliaminas mediante la inhibición selectiva de la ornitina descarboxilasa (ODC), puede ser una alternativa para la prevención de neoplasias colorrectales. Uno de los compuestos más estudiados es la α -Difluorometilornitina (DFMO), el cual actúa como un inhibidor de la actividad de ODC, sin embargo este químico presenta efectos colaterales nocivos para la salud, por lo que es necesario probar la eficacia de otros compuestos más inocuos, como los productos de origen vegetal principalmente los que cuentan con un alto contenido de polifenoles.

III. JUSTIFICACIÓN

Se ha sugerido a los fitoquímicos, principalmente los polifenoles, como compuestos que podrían reducir el riesgo de desarrollar CCR sin afectar la salud humana, ya que existe evidencia que indica que los polifenoles presentes en las plantas inhiben el crecimiento de las células del CCR a partir de distintos mecanismo de acción, incluyendo la disminución del contenido de la ODC. Por lo que podemos asumir que el consumo de vegetales ricos en polifenoles, puede prevenir, retrasar o revertir el desarrollo del CCR. Se ha reportado que las hojas del camote dulce (*Ipomoea batatas*) ejercen varias funciones promotoras de la salud, y se considera que esta planta podría desempeñar un papel importante en la prevención del CCR, atribuibles a su gran concentración de flavonoides, los cuales actúan de manera directa o indirecta sobre la síntesis de moléculas que participan en la proliferación celular.

Es importante realizar más estudios sobre el efecto de los polifenoles de esta planta sobre la ODC y el metabolismo de las PAs en el CCR. En el presente estudio se evaluó el posible efecto antitumoral del extracto etanólico de las hojas de camote a través del análisis de la expresión de la proteína ODC tanto en tejido de colon (tejido afectado), como renal, debido a su correlación con el aumento de los niveles de PAs en orina, para determinar el efecto de los distintos tratamientos y como indicador del desarrollo tumoral.

IV. HIPÓTESIS

El extracto de camote (*Ipomoea batatas*) disminuye la expresión de la proteína ornitina descarboxilasa (ODC) en colon y riñón de ratones Balb/c con cáncer colorrectal (CCR) inducido con 1,2-dimetilhidracina (DMH).

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Analizar el efecto del extracto de camote (*Ipomoea batatas*) sobre la expresión de la ornitina descarboxilasa (ODC) en un modelo murino de cáncer de colon.

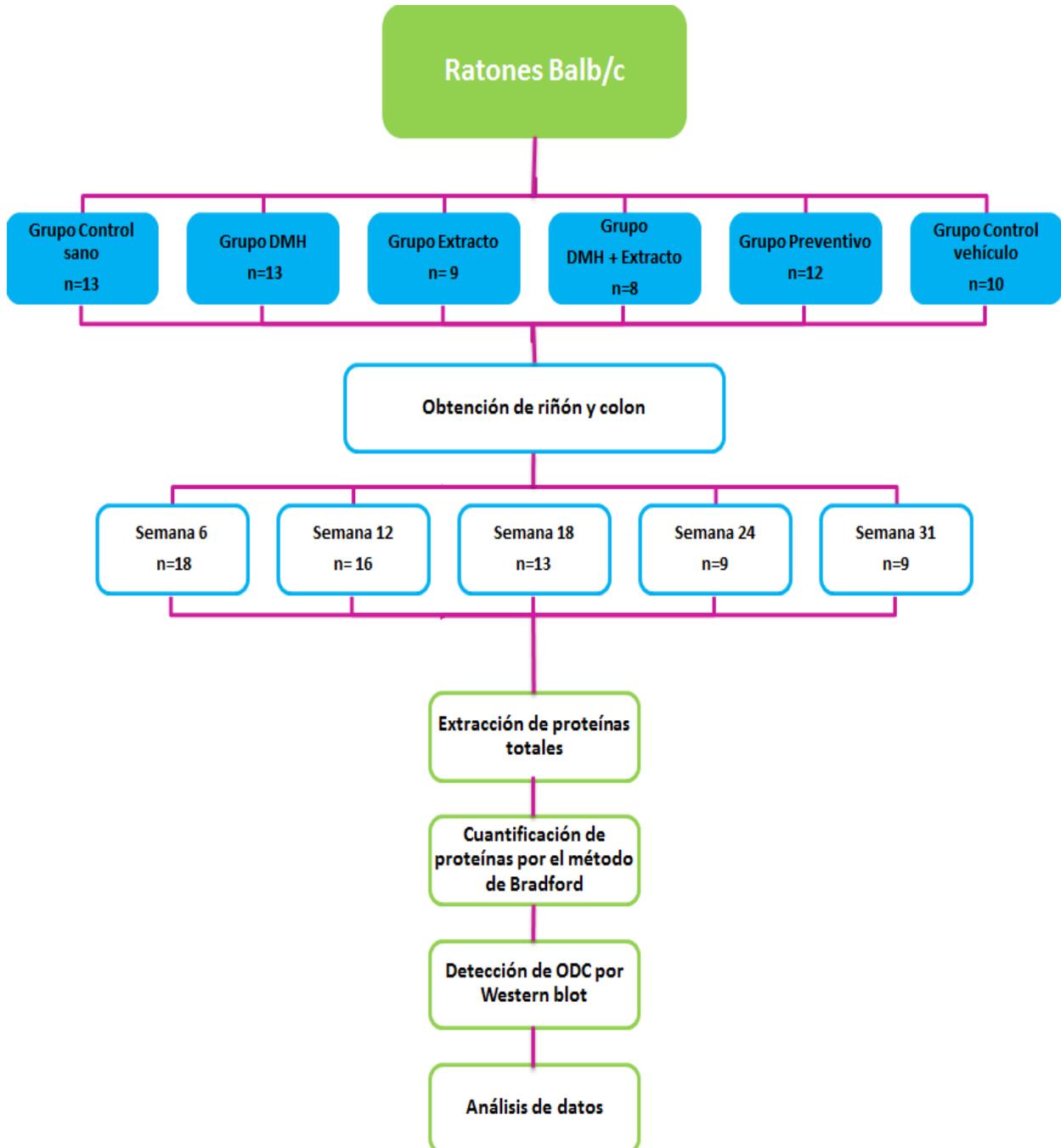
5.2 Objetivos particulares

Estandarizar la técnica de Western blot para la identificación de las proteínas ornitina descarboxilasa (ODC) y β -actina en colon y riñón de ratones Balb/c.

Analizar el efecto del extracto de camote (*Ipomoea batatas*) en la expresión de la ODC en **colon** de un modelo murino de cáncer de colon.

Analizar el efecto del extracto de camote (*Ipomoea batatas*) en la expresión de la ODC en **riñón** de un modelo murino de cáncer de colon.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Animales de experimentación

Durante el desarrollo del presente proyecto se trabajó con tejido de riñón y colon obtenido de ratones hembra de 23 ± 2 g de peso corporal inicial, tratadas con DMH y/o el extracto etanólico de *I. batatas* y grupos controles. Las características establecidas previamente por nuestro equipo de trabajo para cada grupo experimental se presentan el cuadro 2.

Cuadro 2. Grupos experimentales.		
Grupo	Solución administrada	Periodo de tiempo
<i>Control sano</i>	Se inyectó 200 μ L de solución salina subcutáneamente.	Una vez a la semana durante 24 semanas.
<i>DMH</i>	Se inyectó subcutáneamente 200 μ L del carcinógeno diluido en solución salina (20 mg/kg de peso).	Una vez a la semana durante 24 semanas.
<i>Extracto</i>	Se administró 100 μ L del extracto etanólico de hojas de camote vía oral diluido en Tween 80 al 0.1% (200 mg/kg de peso corporal).	Dos veces a la semana durante 24 semanas.
<i>Preventivo</i>	Se administró 100 μ L del extracto etanólico de hojas de camote vía oral.	Dos veces a la semana durante 4 semanas.
	Posteriormente en conjunto con la administración oral del extracto se inyectó subcutáneamente 200 μ L de DMH en la parte ventral del ratón.	Dos y una vez a la semana respectivamente durante 24 semanas.
<i>DMH y extracto</i>	Se administró 100 μ L del extracto etanólico de hojas de camote vía oral en conjunto con 200 μ L de DMH inyectado subcutáneamente	Dos y una vez a la semana respectivamente durante 24 semanas.
<i>Control vehículo</i>	Se administró 100 μ L de una solución de Tween 80 al 0.1% en Solución Salina de Fosfatos (PBS) vía oral.	Una vez a la semana durante 24 semanas.

Las muestras utilizadas en este trabajo se obtuvieron a partir de un proyecto previo de investigación realizado en nuestro laboratorio, en el que se utilizó un modelo murino de CCR inducido con el carcinógeno 1,2-dimetilhidracina (DMH), mediante inyecciones subcutáneas en la parte ventral de ratones Balb/c del carcinógeno disuelto en solución salina isotónica en una relación de 20 mg/kg de peso corporal (Cazares, 2010; Márques, 2011; Anexo 1); así mismo se administraron 100 μ L del extracto etanólico de hojas de camote a una concentración de 200 mg/Kg de peso corporal dos veces por semana, por vía oral con cánula. El extracto fue diluido en el vehículo el cual consiste en Tween 80 al 0.1% en PBS. A partir de estas condiciones, los tejidos de riñón y colon de cada grupo experimental se extrajeron a las semanas 6, 12, 18, 24 y 31 de tratamiento y se conservaron a -20°C hasta su uso (Vázquez, 2013).

7.2 Extracción de proteínas totales de riñón y colon

Para la extracción de proteínas totales se utilizaron 50 mg de riñón o colon; las muestras fueron descongeladas y posteriormente trituradas con un homogeneizador motorizado (Kontes); previamente se agregó a la muestra 1 mL de amortiguador de lisis RIPA de la marca Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Tris-HCL 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM pH 8.0, EDTA 5 mM pH 8.0, tritón X-100 1%) e inhibidores de proteasas y fosfatasas (PMSF 200 mM, Na-Ortovanadato 100 mM y coctel inhibidor de proteasas) y se homogeneizó 3 veces durante 5 min en cada ocasión manteniendo la muestra sobre hielo durante todo el proceso. Posteriormente la muestra se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta su uso (Levillan *et al.*, 2003).

7.3 Cuantificación de proteínas totales de riñón y colon

La proteína total extraída de cada muestra fue cuantificada mediante el micro-método de Bradford (Bradford, 1976). Se realizó una curva de referencia con albúmina de suero bovino (BSA) diluido en la solución de amortiguador de lisis RIPA (diluido a su vez 1:15 en agua) en proporción 1:1. Las muestras de proteínas se diluyeron 1:15 en agua y finalmente se mezcló con solución Bradford (5 μ L de muestra diluida + 250 μ L de Bradford). Las muestras en duplicado se incubaron durante 5 min protegidas de la luz y posteriormente fueron analizadas en un lector de microplacas (ThermoElectron Corporation, Multiskan Ascent) a una longitud de onda de 595 nm y se determinó la concentración de proteína con base en la curva estándar.

7.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), los cuales se prepararon en dos fases: el gel inferior al 12.5% de acrilamida (acrilamida: bis-acrilamida 29:1, Tris-base 2 M pH 8.8, persulfato de amonio 1.5%, SDS 10%, TEMED 10%) y el gel superior al 4% de acrilamida (acrilamida: bis-acrilamida 29:1, Tris HCL 1 M pH 6.8, persulfato de amonio 1.5%, SDS 10%, TEMED 5%). Se colocaron en cámara de electroforesis (BIO-RAD) y fueron sumergidos en una solución amortiguadora (Tris-base 0.025 M, glicina 0.19 M, SDS 10%, pH 8.3).

Cada muestra proteica inicialmente fue descongelada y centrifugada a 7000 rpm por 5 min a 4°C, posteriormente fueron diluidas en agua (con el fin de alcanzar la concentración de proteína a cargar por pozo) y se añadió un amortiguador de carga en proporción 1:1 (Tris-HCL 0.5 M pH 6.8, glicerol 10%, SDS 10%, mercaptoetanol 10% azul de bromofenol 0.005%); la mezcla se llevó a punto de ebullición por 10 min en baño María y se enfrió a 4°C por 5 min, se agitó vigorosamente y finalmente las muestras fueron cargadas en los geles. Se usó un marcador de peso molecular de 10-170 kDa (Thermo Fisher Scientific, Prestained Protein Ladder #26616) y se llevó a cabo la separación de las proteínas durante 3 h a 100 V.

Después de la separación de proteínas, los geles se tiñeron con azul de Coomassie (metanol 45%, Coomassie *Brilliant Blue* R-250 0.1% y ácido acético 10%) durante 30 min en agitación, posteriormente se sumergieron en solución para desteñir (metanol 10% y ácido acético 10%) durante 30 min en agitación y se llevaron a refrigeración a 4°C sumergidos en la misma solución por 12 h (Bolt y Mahoney, 1997; Shi y Jackowski, 1998).

7.5 Identificación de proteínas por Western blot

7.5.1 Electrotransferencia a membrana de PVDF

Las proteínas separadas en geles de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de PVDF (Difluoruro de Polivinilideno, Millipore) en cámara húmeda. Inicialmente la membrana fue sumergida en metanol absoluto por 10 min y lavada con agua destilada; el gel al igual que las almohadillas de fibra y papel filtro, fueron sumergidas en amortiguador de electrotransferencia por 10 min. Se colocó primero una almohadilla de fibra, tres hojas de papel filtro y se puso en contacto la membrana con el gel de poliacrilamida, posteriormente se colocaron nuevamente

almohadillas y papel filtro y se llevó a la cámara de electrotransferencia, para finalmente ser sumergidos en amortiguador (Tris-base 0.025 M, glicina 0.19 M, metanol 20% a pH 8.3). Se corrió a 100 V durante 3 h en frío y con agitación constante. La membrana fue teñida con rojo de Ponceau (ácido acético al 5%, rojo de Ponceau al 0.5%) con el fin de comprobar la transferencia (Merril y Washart 1998).

7.5.2 Incubación con anticuerpos anti-ODC y anti- β -actina

Después de la tinción, la membrana se lavó por 15 min con solución de TBS-T (Tween 20 al 0.1% en TBS [Tris-HCL 1M pH 7.6, NaCl 0.13 M]) para retirar el colorante y posteriormente los sitios sin proteínas transferidas fueron bloqueados con caseína al 5% en TBS-T durante 1 h. La membrana se lavó nuevamente en TBS-T en dos ocasiones por 15 min; todo el proceso se llevó a cabo en agitador orbital.

La membrana fue expuesta al anticuerpo primario, anti-ODC (Sigma) o anti- β -actina (Sigma) diluidos en TBS-T durante 1 h en agitación a temperatura ambiente y se dejó en reposo a 4°C por 12 h. Posteriormente, la membrana se lavó 4 veces con TBS-T en agitación durante 15 min en cada ocasión y se expuso con el anticuerpo secundario (IgG) de la marca Sigma diluido en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente y se lavó nuevamente de la misma manera que el anticuerpo primario (Gandre *et al.*, 2002; Levillan *et al.*, 2003). La cantidad de proteína total y dilución óptima de los anticuerpos para la detección de las proteínas ODC y β -actina se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Cantidad de proteína y dilución de anticuerpos para la detección de la ODC y β-actina.	
Muestra	Concentración
Riñón	3.5 μ g
Colon	2.5 μ g
Anticuerpo	Dilución
Primario (Anti-ODC)	1:8000
Primario (Anti- β -actina)	1:30000
Secundario (IgG)	1:20000

7.5.3 Revelado de la proteína ODC

La detección de las proteínas de interés se realizó en cuarto oscuro haciendo uso de luz roja, se utilizó el método de detección quimioluminiscente ECL de GE Healthcare PLUS, según las instrucciones del fabricante. La membrana se incubó con la mezcla de detección (solución A [luminol]: solución B [peróxido] 1:1) por 5 min a temperatura ambiente, se retiró el exceso y se expuso a una película de rayos X (Hyperfilm ECL). La película fue sumergida en solución reveladora durante 1 min, se lavó en agua destilada por 1 min y se sumergió en solución fijadora durante 1 min, se lavó nuevamente con agua y finalmente se observaron las bandas de interés.

7.6 Análisis de datos

Las bandas se analizaron con el sistema de foto documentación EDAS 4.05 de Kodak. Los niveles de expresión de la ODC se obtuvieron en unidades arbitrarias de intensidad de píxeles de la banda ODC en relación con la β -actina (intensidad relativa de la ODC). Se estimaron las medias \pm SE (error estándar) con el programa GraphPad Prism 5.01 y la comparación entre los grupos experimentales se realizó mediante una ANOVA de dos vías y una prueba de Bonferroni, con un nivel de significancia del 95% (Zar, 1999).

VIII. RESULTADOS

8.1 Cuantificación de proteínas por el micrométodo de Bradford

La concentración de proteínas totales se determinó con base a curvas estándares de la proteína BSA. La figura 8 muestra una curva representativa que presentó una $R^2=0.9996$. La concentración de proteínas en **riñón** fue de 2.10 a 5.40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con una media de 3.74 y en **colon** de 1.00 a 5.40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con una media de 2.76 (Anexo 3 y 4).

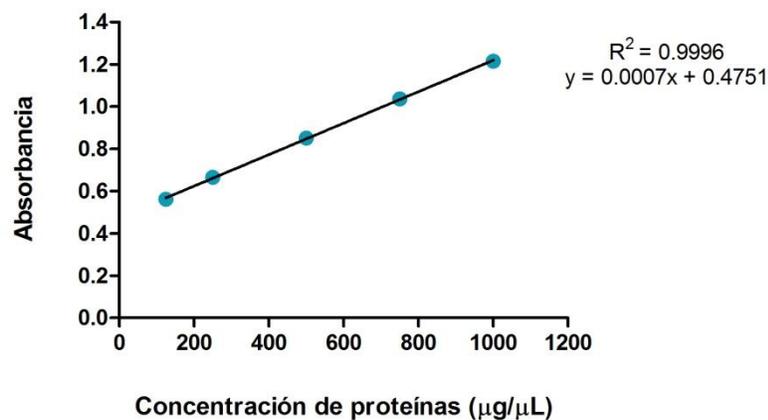


Figura 8. Curva estándar de BSA. Determinación de la concentración de proteínas totales.

8.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y electrotransferencia a membrana de PVDF

En las figuras 9 y 10 se observa la separación de proteínas totales de **riñón** y **colon** en gel de poliacrilamida, teñido con azul de Coomassie para los distintos grupos experimentales (9A y 10A), así como sus transferencias a membranas de PVDF y posterior tinción con rojo de Ponceau (9B y 10B). Los geles fueron cargados con 3.5 y 2.5 μg de proteínas de **riñón** y **colon** respectivamente.

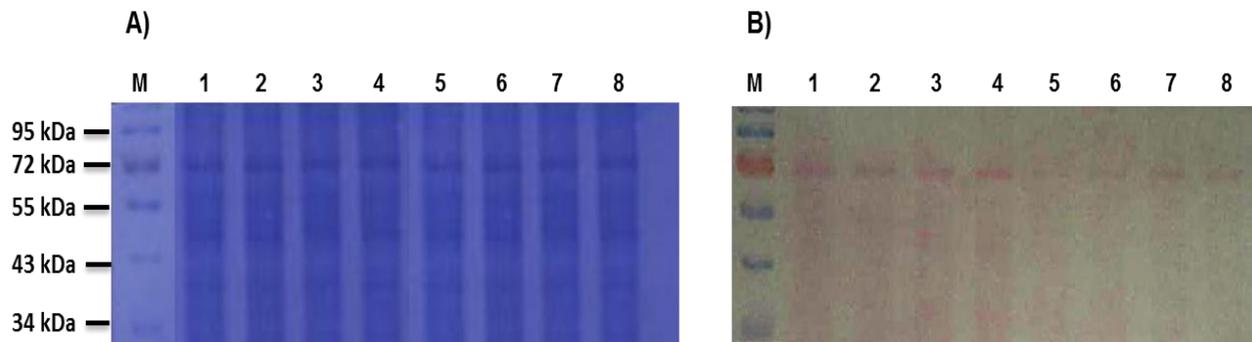


Figura 9. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas de riñón. A) Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie, B) Membrana de PVDF teñida con rojo de Ponceau, en los que se observa el marcador en el primer carril (M) seguido de las muestras control (1 y 2), DMH (3 y 4), extracto (5), DMH + extracto (6), preventivo (7) y control vehículo (8).

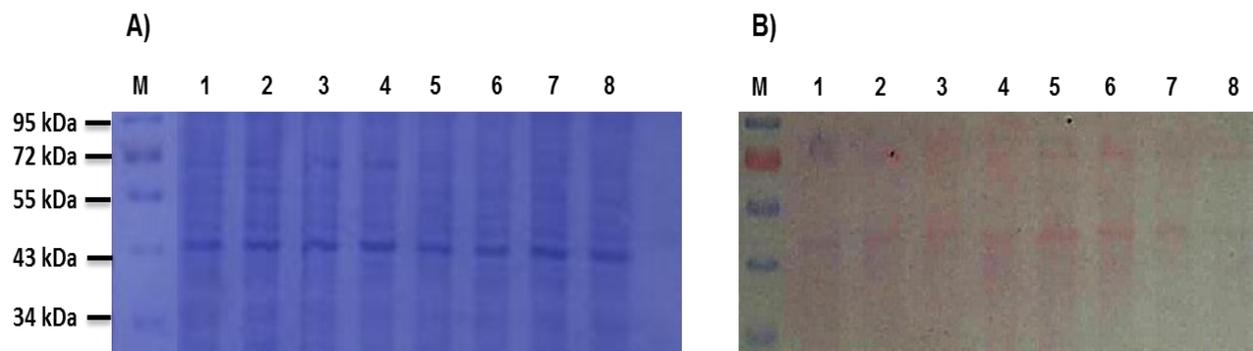


Figura 10. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas de colon. A) Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie, B) Membrana de PVDF teñida con rojo de Ponceau en el que se observa el marcador en el primer carril (M) seguido de las muestras control (1 y 2), DMH (3 y 4), extracto (5), DMH + extracto (6), preventivo (7) y control vehículo (8).

Ambos tejidos mostraron un patrón de bandeo distinto, en las muestras de **riñón** se aprecia una banda de mayor intensidad de 72 kDa, mientras que en **colon** se observa una banda más intensa de 43 kDa.

8.3 Identificación de las proteínas ODC y β -actina por Western blot

En las figuras 11 y 12 se observa la expresión de la ODC y β -actina en **riñón** y **colon** para cada grupo experimental. Los anticuerpos primarios anti-ODC y anti- β -actina se utilizaron a una dilución de 1:8000 y 1:30000 respectivamente, mientras que el anticuerpo secundario se diluyó 1:20000. La ODC presentó una banda de peso molecular de 53 kDa y la β -actina de 42 kDa, ambas proteínas coinciden con los pesos moleculares esperados.

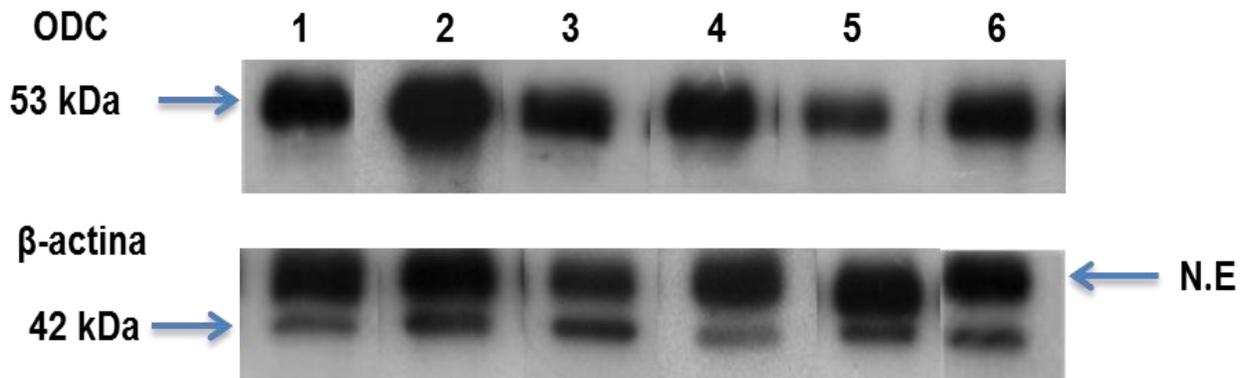


Figura 11. Expresión de la ODC y β -actina de muestras de riñón. ODC (53 kDa) y β -actina (42 kDa) del grupo control (1), DMH (2), extracto (3), DMH + extracto (4), preventivo (5) y control vehículo (6) (N. E = no específico).

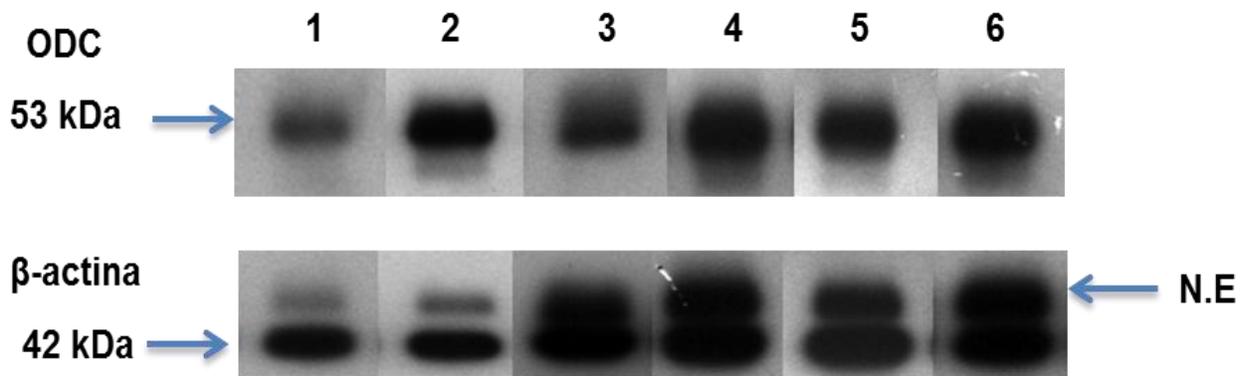


Figura 12. Expresión de la ODC y β -actina de muestras de colon. ODC (53 kDa) y β -actina (42 kDa) del grupo control (1), DMH (2), extracto (3), DMH + extracto (4), preventivo (5) y control vehículo (6) (N. E = no específico).

8.4 Determinación de la expresión relativa de la ODC

Semana 6

La expresión relativa de la proteína ODC en **riñón** no mostró diferencias estadísticas entre los grupos experimentales, sin embargo en la figura 13A se observa una tendencia en los grupos DMH, DMH + extracto y control vehículo a una mayor expresión de la ODC, en comparación con los grupos control, extracto y preventivo (cuadro 4).

En **colon** los grupos control y DMH presentan una menor expresión de la ODC que el resto de los grupos. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de la ODC de estos dos y los grupos preventivo y control vehículo. Además la expresión de la proteína en los grupos extracto y DMH + extracto fue significativamente diferente de la del control vehículo (figura 13B). Los valores relativos de ODC se presentan en el cuadro 5 en media \pm SE.

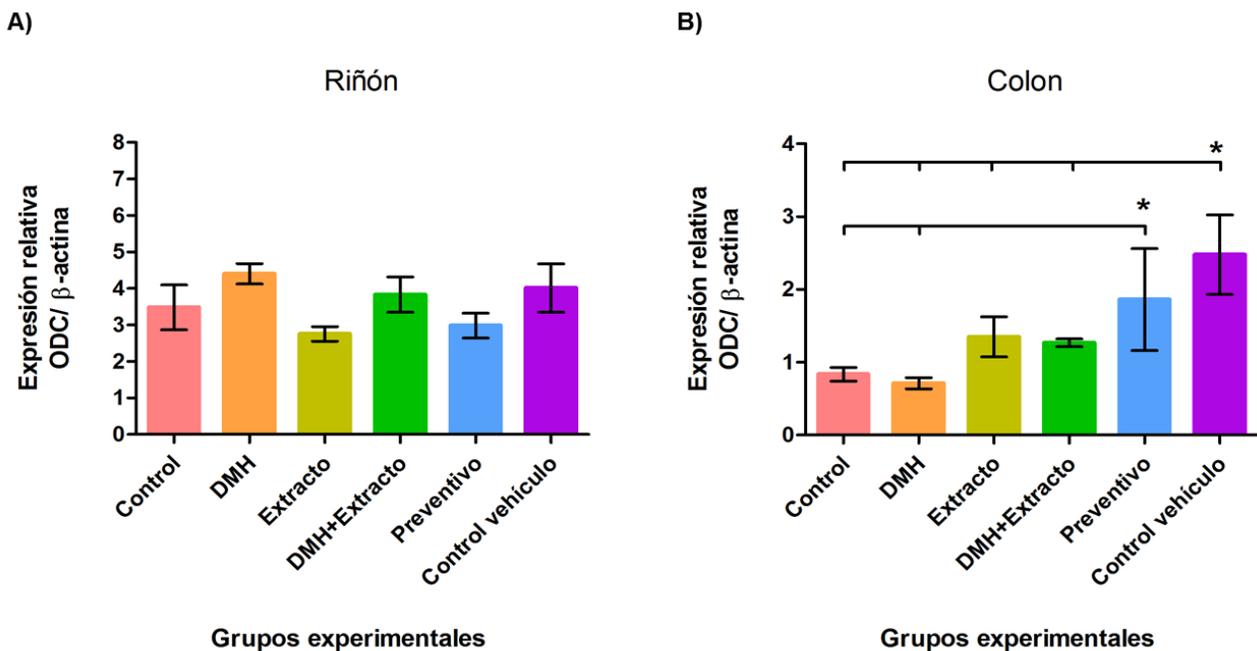


Figura 13. Expresión relativa de la proteína ODC en riñón y colon de ratones Balb/c, semana 6. A) Muestras de riñón, B) Muestras de colon. Los grupos que presentan una diferencia estadística significativa están marcados con un *, lo que indica una $p < 0.05$.

Semana 12

En **riñón** los grupos DMH y control vehículo presentan una expresión de ODC similar a la de los grupos preventivo y extracto, mientras que el control y DMH + extracto presentan una expresión relativa de la ODC menor a la del resto de los grupos y sus medias son similares entre sí (figura 14A), el cuadro 4 presenta los valores de expresión de ODC. Estas diferencias no son estadísticamente significativas.

En el caso del **colon** los grupos control, extracto y preventivo presentan una expresión relativa de ODC con una media menor a la observada en los grupos DMH, DMH + extracto y control vehículo, lo cual puede observarse en el cuadro 5. No se encontró diferencia significativa, tal como se observa en la figura 14B.

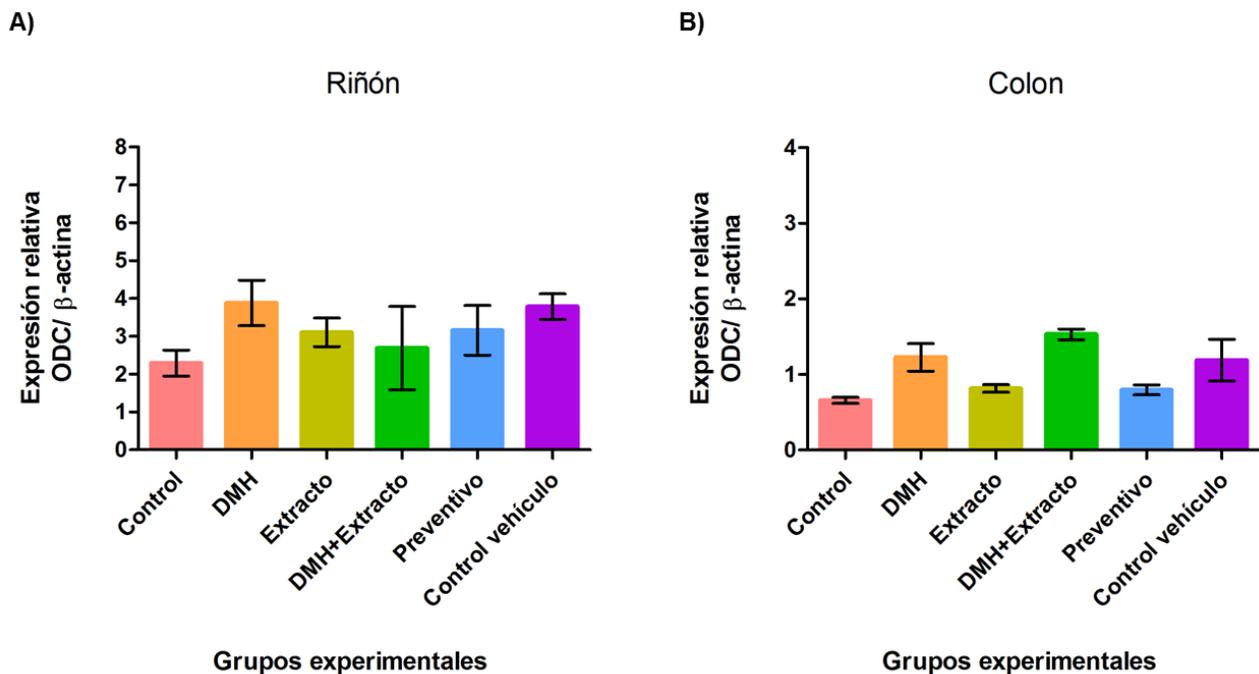


Figura 14. Expresión relativa de la proteína ODC en riñón y colon de ratones Balb/c, semana 12. A) Muestras de riñón, B) Muestras de colon.

Semana 18

En la figura 15A se aprecia que en muestras de **riñón** todos los grupos experimentales presentan homogeneidad en la expresión relativa de la ODC (los valores se observan en el cuadro 4).

En las muestras de **colon** los grupos control, DMH y preventivo presentan una expresión de ODC más baja en comparación con los grupos extracto y control vehículo (cuadro 5). Este último grupo fue significativamente diferente en relación al control, DMH y preventivo (figura 15B).

El grupo DMH + extracto tanto en tejido renal como de colon se encuentra representado por un solo individuo, por lo que el resultado del análisis estadístico no incluye a este grupo y solo se representó gráficamente.

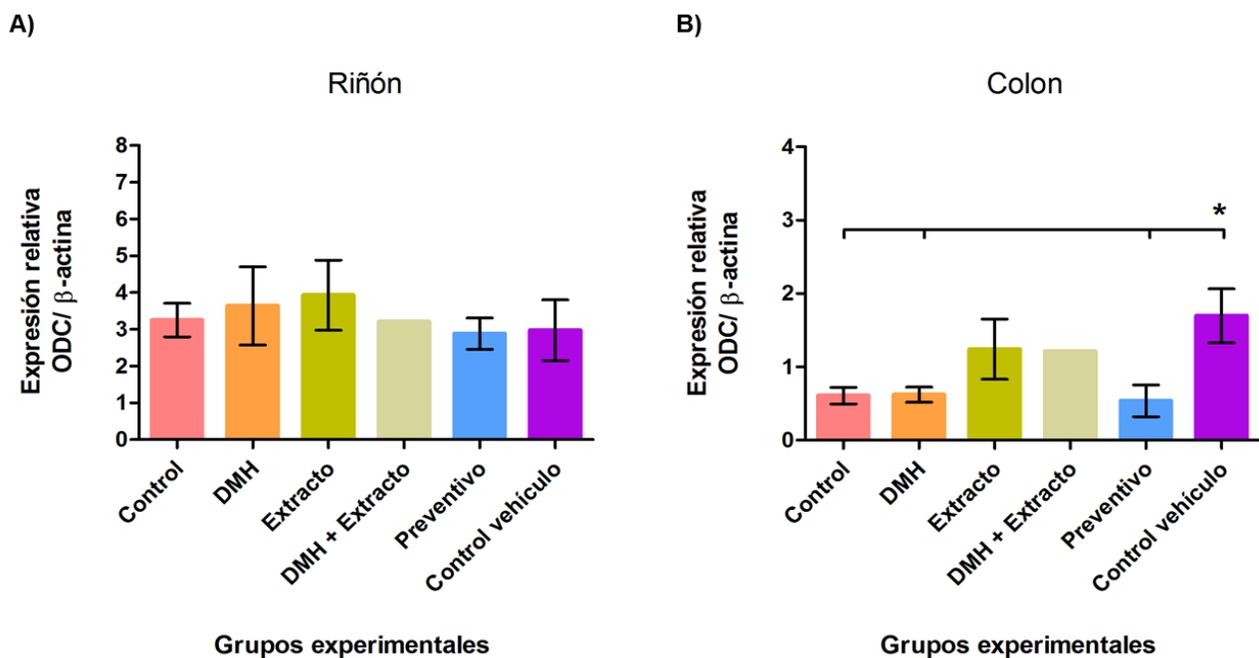


Figura 15. Expresión relativa de la proteína ODC en riñón y colon de ratones Balb/c, semana 18. A) Muestras de riñón, B) Muestras de colon. Los grupos que presentan una diferencia estadística significativa están marcados con un *, lo que indica una $p < 0.05$ (■ grupos en los que solo hay un individuo).

Semana 24

Las muestras de **riñón** de los grupos control y DMH son similares en la expresión relativa de la ODC, mientras que el grupo preventivo presenta una expresión mayor de esta proteína en relación a la β -actina (figura 16A). Los grupos extracto, DMH + extracto y control vehículo cuentan con una sola muestra por grupo, por lo que los resultados obtenidos no fueron considerados para el estudio.

Las muestras de **colon** del grupo control presentan una expresión relativa de ODC menor a la de los grupos DMH y preventivo. Estas diferencias no son estadísticamente significativas en ninguno de los casos. Los grupos extracto, DMH + extracto y control vehículo al igual que en riñón, se encuentran representados por un solo individuo, por lo que los datos únicamente fueron considerados para su representación gráfica, tal como se observa en la figura 16B.

Los datos de expresión relativa de ODC en riñón y colon pueden ser observados en los cuadros 4 y 5.

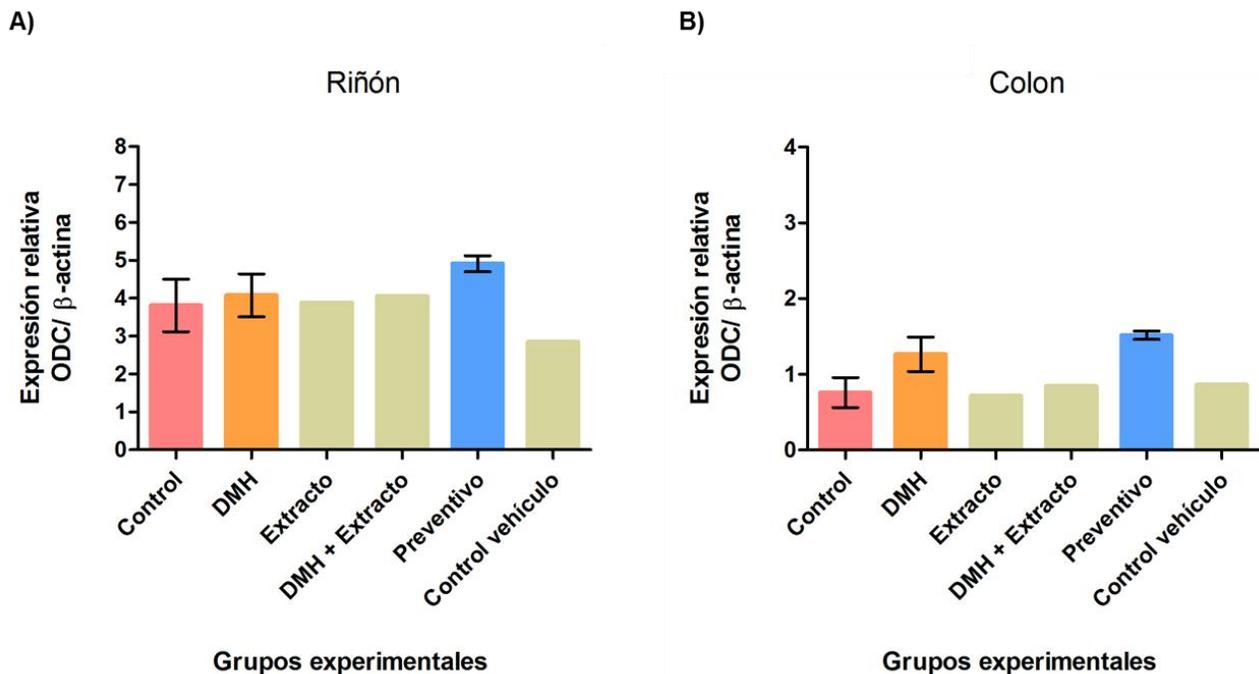


Figura 16. Expresión relativa de la proteína ODC en riñón y colon de ratones Balb/c, semana 24. A) Muestras de riñón, B) Muestras de colon (■ grupos en los que solo hay un individuo).

Semana 31

La expresión relativa de la ODC en el grupo preventivo fue significativamente diferente a la observada en los grupos control y DMH en las muestras de **riñón** (figura 17A).

En **colon** se observa que los grupos DMH y preventivo presentan una expresión de la ODC menor a la del control (figura 17B). Las diferencias entre los grupos no son significativas.

Los grupos extracto, DMH + extracto y control vehículo para ambos tejidos cuentan con una sola muestra por lo que los datos de expresión relativa de la ODC, encontrados en los cuadros 4 y 5, únicamente son representados gráficamente (figura 17).

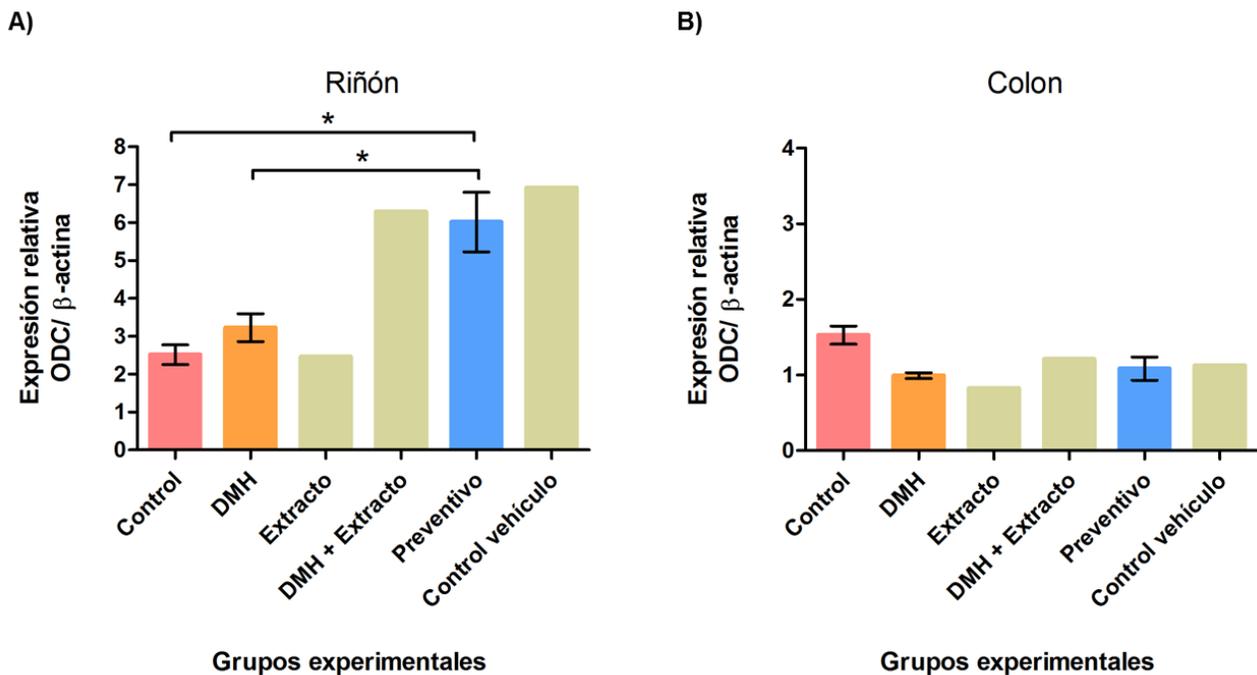


Figura 17. Expresión relativa de la proteína ODC en riñón y colon de ratones Balb/c, semana 31. A) Muestras de riñón, B) Muestras de colon. Los grupos que presentan una diferencia estadística significativa están marcados con un *, lo que indica una $p < 0.05$ (■ grupos en los que solo hay un individuo).

Expresión relativa de la ODC en todos los grupos experimentales

En los cuadros 4 y 5 se observan los valores de expresión relativa de la ODC en media \pm SE en las muestras de **riñón** y **colon** de los grupos de estudio a lo largo de todo el periodo experimental. La comparación de los resultados obtenidos indica, de manera general, una mayor expresión de la ODC en riñón en comparación con colon.

Cuadro 4. Valores de expresión relativa de la ODC en riñón. Los valores relativos de la expresión de la ODC en **riñón** de los distintos grupos experimentales a lo largo de todo el periodo experimental se presentan en media \pm SE.

Grupo experimental	Semanas				
	6	12	18	24	31
Control	3.484 \pm 0.614	2.293 \pm 0.342	3.252 \pm 0.455	3.809 \pm 0.692	2.516 \pm 0.258
DMH	4.402 \pm 0.280	3.882 \pm 0.599	3.642 \pm 1.063	4.078 \pm 0.565	3.230 \pm 0.368
Extracto	2.755 \pm 0.199	3.107 \pm 0.376	3.929 \pm 0.954	3.885	2.463
DMH + Extracto	3.833 \pm 0.481	2.688 \pm 1.101	3.211	4.060	6.291
Preventivo	2.985 \pm 0.341	3.159 \pm 0.655	2.883 \pm 0.427	4.915 \pm 0.211	6.017 \pm 0.789
Control vehículo	4.016 \pm 0.664	3.782 \pm 0.341	2.976 \pm 0.825	2.848	6.923

Los datos en gris representan los grupos en los que solo se contó con una muestra.

Cuadro 5. Valores de expresión relativa de la ODC en colon. Los valores relativos de la expresión de la ODC en **colon** de los distintos grupos experimentales a lo largo de todo el periodo experimental se presentan en media \pm SE.

Grupo experimental	Semanas				
	6	12	18	24	31
Control	0.834 \pm 0.093	0.658 \pm 0.039	0.608 \pm 0.113	0.760 \pm .197	1.529 \pm 0.120
DMH	0.712 \pm 0.076	1.228 \pm 0.181	0.621 \pm 0.103	1.267 \pm 0.226	0.993 \pm 0.038
Extracto	1.349 \pm 0.275	0.815 \pm 0.049	1.242 \pm 0.411	0.714	0.825
DMH + Extracto	1.268 \pm 0.054	1.531 \pm 0.072	1.214	0.846	1.211
Preventivo	1.862 \pm 0.699	0.796 \pm 0.064	0.538 \pm 0.215	1.516 \pm 0.055	1.084 \pm 0.153
Control vehículo	2.477 \pm 0.547	1.190 \pm 0.274	1.697 \pm 0.369	0.861	1.130

Los datos en gris representan los grupos en los que solo se contó con una muestra.

IX. DISCUSIÓN

La búsqueda constante de nuevos fármacos y terapias para la prevención, retraso o inhibición del CCR en los últimos años se ha enfocado en productos naturales específicamente de origen vegetal, debido a que los compuestos químicos derivados de las plantas han sido relacionados con la prevención de distintos tipos de cáncer con mínimos efectos adversos. Este efecto se atribuye principalmente a la presencia de compuestos fenólicos y se ha demostrado que algunos de ellos tienen un efecto directo sobre la actividad de ODC (Bomser *et al.*, 2000; Middleton *et al.*, 2000; Justil *et al.*, 2010).

Los flavonoides son el grupo más representativo de polifenoles presentes en las hojas del camote dulce (*Ipomoea batatas*), a los cuales se les atribuye una gran variedad de propiedades bioquímicas y farmacológicas que han sido estudiadas tanto *in vivo* como *in vitro*. Los resultados de estos estudios indican que los polifenoles presentes en esta planta juega un importante papel en la reducción del riesgo de desarrollar diferentes enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer (Kurata *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Karna *et al.*, 2011). Sin embargo, el efecto de esta planta sobre la expresión de la ODC no se conoce, por lo que en el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto del extracto etanólico de las hojas de *I. batatas* en la expresión de la proteína ODC en un modelo murino de cáncer de colon inducido con 1, 2-dimetilhidracina (DMH).

La técnica de Western blot con un sistema de detección quimioluminiscente, utilizada en el presente trabajo para evaluar la expresión de la ODC, mostró una alta sensibilidad y permitió la identificación específica de las proteínas ODC (53 kDa) y β -actina (42 kDa) en las muestras de colon y riñón de los diferentes grupos experimentales. Cabe mencionar que el anticuerpo utilizado para la detección de la β -actina, en la mayoría de las veces, reveló dos bandas de peso molecular muy parecido tanto en riñón como en colon. Algunos autores reportan la misma observación y proponen que estas variantes corresponden a formas isoméricas de la proteína (Ramos *et al.*, 2014).

Nuestros resultados mostraron que a lo largo de todo el periodo experimental la expresión relativa de la ODC en **riñón** tiende a presentar niveles mayores en condiciones de desarrollo neoplásico (grupo DMH) en comparación con el control; este efecto es más evidente durante las semanas 6 y 12 del tratamiento, por lo que podemos asociar una expresión mayor de la ODC renal con las fases iniciales del tratamiento con DMH. Los resultados coinciden con los obtenidos previamente por nuestro equipo de trabajo, en los que se identificó a la putrescina

(Pu) urinaria como un biomarcador temprano del cáncer colorrectal (CCR), al encontrarse niveles altos de esta molécula durante las fases iniciales del tratamiento con DMH en un modelo murino (Vázquez, 2013). Los resultados sobre la expresión de la ODC en tejido **renal** ponen en evidencia la existencia de una relación entre el aumento de la expresión relativa de la ODC y los niveles de Pu, la cual es la primera molécula derivada de la descarboxilación de la L-ornitina por la ODC.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio relacionaron mayores niveles del ARNm de la ODC en **riñón** con las etapas avanzadas del desarrollo tumoral, encontrando que a la semana 31 (evaluada por RT-PCR semi-cuantitativa) los ratones tratados con DMH presentaron un nivel significativamente más alto que el grupo sano (Márques, 2011), de manera similar en el presente trabajo se encontró que la ODC, a niveles de la traducción, mostró un comportamiento parecido, sin embargo las diferencias no fueron significativas. Esto puede ser atribuible a una menor expresión detectada de la proteína a nivel de la traducción, modificaciones postraduccionales y a la corta vida media de esta enzima (Hu *et al.*, 2003).

En **colon** la expresión relativa de la ODC en el grupo DMH fue mayor en las semanas 12 y 24 del tratamiento en comparación con el control sano. Cabe mencionar que a diferencia del riñón, este comportamiento no se observó en el resto de las semanas de tratamiento, ya que el aumento en los niveles de expresión de la ODC no fue constante. Es probable que el incremento en la expresión de la ODC se presente más tarde durante el desarrollo tumoral en colon en relación al riñón. En **colon** a la semana 31 la expresión de la ODC del grupo tratado con DMH fue menor que en el grupo control, lo que es similar a los datos reportados por Moorehead *et al.* (1987), quienes observaron que en pacientes en etapas avanzadas del CCR la actividad de la ODC en colon era menor en comparación con el tejido normal del mismo paciente. El aumento transitorio de la ODC a lo largo de todo el periodo experimental en **colon** pueden ser atribuido a la regulación negativa de la ODC por niveles altos de PAs y el rápido recambio intracelular de la proteína (Schipper *et al.*, 2004). Además otros autores también han reportado variación en la actividad de la ODC del **colon** después de la inducción de la expresión de esta proteína en modelos animales (Takano *et al.*, 1984). Cabe mencionar que estos datos de expresión relativa de ODC no mostraron diferencia estadística tanto en riñón como en colon.

El nivel elevado de la ODC renal y colónica en el grupo tratado con el carcinógeno DMH coincide con los cambios histológicos observados previamente en nuestro laboratorio en ratones tratados con DMH, ya que a partir de la semana 7 se observó la aparición de focos de

criptas aberrantes (FCA), lo cual es un evento temprano en la carcinogénesis del colon. Otros estudios en modelos murinos de CCR inducido con DMH también reportan la aparición de estas lesiones preneoplásicas del colon en etapas tempranas del tratamiento (Tudek *et al.*, 1989; Rosenberg y Liu, 1995).

Por otro lado los ratones tratados solo con el extracto etanólico de las hojas de *I. batatas* presentaron una expresión relativa de la ODC en **riñón** similar al control durante las semanas 6 y 12 de tratamiento, por lo que se asume que la dosis utilizada del extracto no produce un efecto tóxico (200 mg/ Kg de peso, dos veces por la semana). Lo anterior coincide con lo reportado por Karna *et al.* (2011) quienes trataron a ratones con cáncer de próstata diariamente por 6 semanas con un extracto metanólico de *I. batatas* para disminuir el tumor, sin encontrar algún efecto adverso para la salud del ratón (400 mg/ Kg de peso). Por otro lado, en nuestro estudio se observó que a la semana 18 de tratamiento con el extracto solo, la ODC aumentó su expresión en **riñón** en relación al grupo DMH y este mismo comportamiento se aprecia en las muestras de **colon** a las semanas 6 y 18, sin llegar a encontrarse diferencias significativas. Dicho efecto podría ser atribuible al vehículo utilizado para la administración del extracto (Tween 80 al 0.1%), ya que a pesar de que esta molécula es ampliamente utilizada en aplicaciones bioquímicas como dispersante de sustancias medicinales y productos alimenticios, su administración en altas concentraciones y/o de manera regular ha sido relacionada con efectos indeseables, como la inducción de proliferación celular y la elevación de moléculas indicadoras de respuesta al tumor como la fosfatasa alcalina, transaminasa sérica glutámico oxalacética y transaminasa sérica glutamato piruvato (Ma *et al.*, 2011; Beeba *et al.*, 2014).

El grupo control vehículo, en el cual únicamente se administró 100 µL de una solución de Tween 80 al 0.1% en Solución Salina de Fosfatos (PBS) vía oral, durante las semanas 6, 12 y 18 de experimentación, presentó una expresión relativa de ODC igual o mayor a la del grupo tratado con DMH en ambos tejidos, por esta razón se considera que este vehículo pudo haber alterado el efecto del extracto etanólico de las hojas de *I. batatas* sobre la ODC. Además existe evidencia que indica que el Tween 80 puede disminuir la efectividad de otras moléculas y fármacos, incluso aquellos utilizados para el tratamiento del cáncer (Ma *et al.*, 2011; Beeba *et al.*, 2014).

En relación al efecto preventivo del extracto vegetal, se observó que la expresión de la ODC en **riñón** fue menor en relación al grupo DMH durante las semanas 6, 12 y 18, mientras que en **colon** este efecto solamente se presentó en la semana 12. La expresión de la ODC en **riñón** a las semanas 24 y 31 aumento en este grupo en comparación con el grupo control y DHM. Estos

resultados, aunque no mostraron significancia estadística, indican que la administración del extracto cuatro semanas antes del carcinógeno DMH, podría ser efectiva para mantener los niveles de ODC únicamente en etapas iniciales del desarrollo del CCR. Es importante precisar que un estudio histológico del colon de ratones tratados con DMH, indicó que el extracto presenta un efecto benéfico contra el desarrollo tumoral (Santerre *et al.*, 2015). El estudio consistió en el conteo de los FCA y destacó que al final del periodo experimental (semana 31), los ratones de los grupos tratados preventivamente con el extracto de *I. batatas* (51 FCA/ mm²) y los tratados a la par con *I. batatas* y DMH (60 FCA/ mm²) mostraron una disminución significativa del número de lesiones preneoplásicas en comparación con el grupo DMH (120 FCA/ mm²). Esto indica la posibilidad de que el extracto de las hojas de camote actué sobre otras moléculas de manera más efectiva que sobre la ODC, ya que en el estudio realizado por Kurata *et al.* (2007) observaron que *in vitro* el extracto de las hojas de camote suprime la proliferación de las células de cáncer de estómago y colorrectal y en células de leucemia aumenta los niveles de caspasa 3 y la expresión del gen *c-jun*, ambos relacionados con la apoptosis.

El aumento en la expresión de la ODC en **colon** y **riñón** del grupo preventivo en las últimas semanas del experimento, podría deberse al vehículo utilizado para la administración del extracto. Pérez *et al.* (2005) reportan que el efecto de la DMH puede ser modulado por la administración conjunta de otras sustancias, por lo que se asume la posibilidad de que el Tween 80 pudo haber potencializado la acción de la DMH después de su administración conjunta con el extracto, para el cual se utilizó esta molécula como vehículo, ya que la administración constante de este detergente se asocia tanto con múltiples efectos secundarios, como con una posible función carcinogénica o acompañante de carcinógeno (Beeba *et al.*, 2014). Además, es posible que la dosis del extracto utilizada en este estudio (200 mg/ Kg de peso, dos veces por semana) no fuera suficiente para inhibir la expresión de la ODC en etapas avanzadas del CCR, ya que diversos autores han demostrado que el efecto del extracto de las hojas del camote y de otras plantas es dosis dependiente (Justil *et al.*, 2010; Karna *et al.*, 2011).

En las semanas 18, 24 y 31 no se apreció de manera óptima el efecto del extracto administrado a la par con DMH, debido al limitado número de muestra. En **riñón** la expresión de la ODC en el grupo DMH + extracto durante las semanas 6 y 12 fue menor en relación al grupo DMH, mientras que en **colon** se observó el efecto contrario; la dosis administrada del extracto podría no haber sido suficiente para contrarrestar el efecto de la DMH sobre la expresión de la ODC.

Es probable que la administración del extracto de manera preventiva (200 mg/ Kg de peso corporal) sea más eficiente que a la par.

X. CONCLUSIONES

Se observó que la expresión relativa de la ODC es mayor en riñón que en colon en los diferentes grupos experimentales a lo largo de todo el estudio.

La expresión relativa de la ODC en **riñón** tiende a presentar niveles mayores en el grupo DMH en comparación con el grupo control, este efecto es más evidente en la fase inicial (semanas 6 y 12) del tratamiento con DMH.

En **colon** la expresión de la ODC en el grupo DMH tiende a incrementarse más tarde que en riñón (semanas 12 y 24) durante el periodo experimental.

En **riñón** el extracto etanólico de las hojas de *Ipomoea batatas* administrado de manera preventiva tiende a ser efectivo en la modulación de la expresión de la proteína ODC en las etapas tempranas (semanas 6, 12 y 18) del desarrollo tumoral.

El extracto etanólico de las hojas de *Ipomoea batatas* administrado de manera preventiva no presentó un efecto modulador de la expresión de la ODC en **colon** durante la fase experimental.

XI. PERSPECTIVAS

Con base en la experiencia adquirida durante el desarrollo del presente proyecto y de los trabajos realizados por Vázquez (2013) y Santerre *et al.* (2015), se conoce que el extracto etanólico de las hojas de *I. batatas* tiene un efecto benéfico en la prevención de la formación de los focos de criptas aberrantes (FCA) y disminución de la putrescina urinaria. Este efecto tiende a ser similar sobre la expresión de la ODC en riñón a las semanas 6, 12 y 18, aún si las diferencias no fueron significativas.

Futuros proyectos en este modelo experimental se enfocarán en la evaluación de las citocinas pro y anti-inflamatorias, así como en la expresión génica de proto-oncogenes y genes supresores de tumor, relacionados con el metabolismo de las poliaminas y la actividad de la ODC. Se aumentará tanto el número de animales por grupo experimental como la concentración del extracto etanólico de las hojas de *I. batatas*. Además, debido al efecto del Tween 80 al 0.1% sobre la expresión de la ODC, será importante cambiar el vehículo utilizado para la disolución y administración del extracto vegetal.

XII. REFERENCIAS

- Alberici P. 2007. The adenoma-carcinoma sequence in colorectal cancer. Scratching the surface. *Tesis de Doctorado*. Universidad Erasmus de Rotterdam. pp. 163.
- Algranati I. D., Serra M. P., Carrillo C. y González N. S. 2006. Biología molecular del metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos. Expresión de genes heterólogos de ornitina y arginina descarboxilasa en *Trypanosoma cruzi*. *Revista Química Viva*. 2(5):78-94.
- Ávalos G. A., Urria C. P. 2009. Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca (Biología)*. 2(3):119-145.
- Ávila M. E. 2008. Tratamiento quirúrgico en colon. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 7(4):31-33.
- Bachrach U. y Wang C. Y. 2002. Cancer therapy and prevention by green tea: role of ornithine decarboxylase. *Amino Acids*. 22:1-13
- Beeba J., Anwar F. y Susheel S. 2014. Pharmacological effect of polysorbate 80 in cancer chemotherapy. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 6(4):83-87.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Basantes L. M. G. 2012. Caracterización molecular de la colección nacional de camote (*Ipomoea spp.*) del banco nacional de germoplasma del INIAP mediante marcadores microsatelites. *Tesis de ingeniería*. Escuela Politécnica del Ejército. pp. 152.
- Bhooshan P. K. y Ibrahim R. S. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2(5):270-278.
- Bolt W. M. y Mahoney A. P. 1997. High-Efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 247:185-192.
- Bomser J., Singletary K., y Meline B. 2000. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced mouse skin ornithine decarboxylase and protein kinase C by polyphenolics from grapes. *Chemico-Biological Interactions*. 127:45-59.

- Calderillo R. G. 2008. Quimioterapia adyuvante en cáncer de colon. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 7(4):34-39.
- Campo A. L. y García G. A. 2009. Capítulo 1. Fisiopatología y patogenia del cáncer colorrectal. En Guía de prevención y manejo del cáncer colorrectal en atención primaria. Ed. Peña F. E. *Edición YOU & US*. pp. 65.
- Catalán V., Honorato B., García F., Bandrés E., Zabalegui N., Zárate R., Salgado E. y García F. J. 2003. Carcinogénesis colónica: proceso de transformación neoplásica. *Revista Médica Universitaria Navarra*. 47(1):15-9.
- Carnésecchi S., Schneider Y., Lazarus S. A., Coehlo D., Gossé F., y Raul F. 2002. Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells. *Cancer letters*. 175(2):147-155.
- Cazares A. A. 2010. Estandarización de un modelo murino experimental de cáncer de colon en ratones BALB/c inducido con 1,2-Dimetilhidracina. *Tesis de licenciatura*. Universidad de Guadalajara. pp. 67.
- Cox D. R., Trouillot T., Ashley P. L., Brabant M. y Coffino, P. 1988. A functional mouse ornithine decarboxylase gene (Odc) maps to chromosome 12: further evidence of homoeology between mouse chromosome 12 and the short arm of human chromosome 2. *Cytogenetic and Genome Research*. 48(2):92-94.
- Cruz B. C. 2004. Genética molecular del cáncer colorrectal. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 96(1):48-59.
- Cruz T. P. A., Villegas G. V. E. y Ramírez C. S. R. 2008. Fundamento biológico y aplicación clínica de los marcadores tumorales séricos. *Revista Ciencias de la Salud*. 6(2):85-98.
- Fearon E. R. y Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61:759-767.
- Fernández C. M. 2011. Prevención primara farmacológica del cáncer de colon. ¿Una nueva indicación para la Aspirina?. *Semana de la Enfermedad Digestiva*. Curso para residentes. pp. 5.

- Freitas G. A. F., Olivera de P. S., Vilela G. R., Licursi de O. L., Fortes F. C. L. y Silva C. D. 2014. Prebiotics prevent the appearance of aberrant crypt foci (ACF) in the colon of Balb/c mice for increasing the gene expression of p16 protein. *Nutrición Hospitalaria*. 30(4):883-890.
- Gali M. H. U., Younes H. I., Karchesy J. J. y El-Sabban E. M. 2001. Plant tannins inhibit the induction of aberrant crypt foci and colonic tumors by 1,2-dimethylhydrazine in mice. *Nutrition and Cancer*. 39(1):108:116.
- Gandre S., Bercovich Z. y Kahana C. 2002. Ornithine decarboxylase-antizyme is rapidly degraded through a mechanism that requires functional ubiquitin-dependent proteolytic activity. *European Journal of Biochemistry*. 269:1316-1322.
- González C. Q. y Bahena A. J. 2010. Cáncer de colon. *Revista de Gastroenterología de México*. 1(75):65-68.
- Granado S. A. B. 2010. Estudio de los mecanismos de acción molecular de polifenoles de la dieta en cultivos celulares y animales experimentales. *Tesis de Doctorado*. Universidad Complutense de Madrid. pp. 195.
- Halmekytö M., Hyttinen J. M., Sinervirta R., Utriainen M., Myöhänen S., Voipio H. M., Wahlfors J., Syrjänen S., Syrjänen K., Alhonen L. y Jänne J. 1991. Transgenic mice aberrantly expressing human ornithine decarboxylase gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 266(29):19746-19751.
- Herrera G. R. 2008. Carcinoma de colon y recto. Diagnóstico histológico y estadificación. . *Gaceta Mexicana de Oncología*. 7(4): 22-30.
- Hoshino Y., Terashima S., Teranishi Y., Terashima M., Kogure M., Saitoh T., Osuka F., Kashimura S., Saze Z. y Gotoh M. 2007. Ornithine decarboxylase activity as a prognostic marker for colorectal cancer. *Fukushima Journal of Medical Science*. 53(1):1-9.
- Hu H. Y., Liu X. X., Jiang C. Y., Zhang Y., Bian J. F., Lu Y., Geng Z., Liu S. L., Liu C. H., Wang X. M. y Wang W. 2003. Cloning and expression of ornithine decarboxylase gene from human colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*. 9(4):714-716.
- Hu H. Y., Liu X. X., Jiang C. Y., Lu Y., Liu S. L., Bian J. F., Wang X. M., Geng Z., Zhang Y. y Zhang B. 2005. Ornithine decarboxylase gene is overexpressed in colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*. 11(15):2244-2248.

- Huamán Z. 1992. Botánica sistemática y morfología de la planta de batata o camote. *Centro Internacional de la papa*. Boletín de Información Técnica. pp. 7-25.
- Juárez V. C. y Rosales R. M. 2014. Cáncer colorrectal (CCR): alteraciones genéticas y moleculares. *Gaceta Médica de México*. 150:154-64.
- Justil H., Arroyo J. y Valencia J. 2010. Extracto etanólico de *Baccharis genistelloides* (carqueja) sobre el cáncer de colon inducido con 1,2-dimetilhidrazina en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*. 71(2):88-96.
- Kang H. G., Jeong S. H. Cho J. H. 2010. Antimutagenic and anticarcinogenic effect of methanol extracts of sweetpotato (*Ipomea batata*) leaves. *Official Journal of Korean Society of Toxicology*. 26(1):29-35.
- Karaca O., Ertekin T., Canoz O., Ulger H., Soysal H. y Kus I. 2012. Effect of endostatin on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumor in mice. *Toxicology and Industrial Health*. 28(1):21-26.
- Karna P., Gundala R. S., Gupta V. M., Shamsi A. S., Pace R. D., Yates C., Narayan S. y Aneja R. 2011. Polyphenol-rich sweet potato greens extract inhibits proliferation and induces apoptosis in prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis*. 32(12):1872-1880.
- Kern D. A., Olivera A. M., Coffino P. y Hackert L. M. 1999. Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases. *Elsevier Science*. 7(5):567-581.
- Kurata R., Adachi M., Yamakawa O. y Yoshimoto M. 2007. Growth suppression of human cancer cells by polyphenolics from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:185-190.
- Levillain O., Greco A., Diaz J. J., Augier R., Didier A., Kindbeiter K., Catez F. y Cayre M. 2003. Influence of testosterone on regulation of ODC, antizyme, and N¹-SSAT gene expression in mouse kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 285:F498-F506.
- Li A. N., Li S., Zhang Y. J., Zhang Y. J., Xu X. R., Chen Y. M. y Li H. B. 2014. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*. 6:6020-6047.

- Li F., Li Q., Gao D. y Peng Y. 2009. The optimal extraction parameters and anti-diabetic activity of flavonoids from *Ipomoea batatas* leaf. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*. 6(2):195-202.
- López C. A. J., López G. C., Jiménez C. C., Cremades A. y Peñafiel R. 2006. Mouse ornithine decarboxylase-like gene encodes an antizyme inhibitor devoid of ornithine and arginine decarboxylating activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(41):30896-30906.
- Ma Y., Zheng Y., Zeng X., Jiang L., Chen H., Liu R., Huang L. y Mei L. 2011. Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on PCL-Tween 80 copolymer for cancer treatment. *International Journal of Nanomedicine*. 6:2679–2688.
- Márques G. B., 2011. Estudio de la expresión de la ornitina descarboxilasa (ODC) en el modelo murino Balb/c de cáncer de colon. *Tesis de licenciatura en Biología*. Universidad de Guadalajara. pp. 65.
- Mantilla M. A., Mendoza M. R. y Alcarado C. I. 2014. Evaluación de piezas quirúrgicas con carcinoma de colon. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 13(4):229-235.
- Márques G. B. 2011. Estudio de la expresión de la ornitina descarboxilasa (ODC) en el modelo murino Balb/c de cáncer de colon. *Tesis de licenciatura en Biología*. Universidad de Guadalajara. pp. 65.
- McConlogue L., Gupta M., Wu L., y Coffino P. 1984. Molecular cloning and expression of the mouse ornithine decarboxylase gene. *Proceedings National Academy of Sciences USA*. 81:540-544.
- Medina E. M. 2009. Caracterización de la inhibición de la ornitina descarboxilasa por la cloroacetil-L-ornitina y su posible efecto antineoplásico. *Tesis de Maestría en Biomedicina y Biotecnología Molecular*. Instituto Politécnico Nacional. pp. 66.
- Menéndez S. P., Villarejo C. P., Padilla V. D., Menéndez R. J. A. y Rodríguez M. J. A. 2013. Marcadores tumorales en el cáncer colorrectal. *Cirugía y Cirujanos*. 81(2):169-175.
- Merril R. C. y Washart M. K. 1998. Capítulo 2. Protein detection methods. En: *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*. Ed. Hames B. D. Tercera Edición. *Oxford University Press*. pp. 345.

- Middleton E., Kandaswami C. y Theoharides C. T. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 52(4):673-751.
- Milovic V. y Turchanowa L. 2003. Polyamines and colon cancer. *Biochemical Society Transactions*. 31(2):381-383.
- Mitchell L. A. J., Simkus L. C., Thane K. T., Tokarz P., Bonar M. M., Frydman B., Valasinas L. A., Reddy K. V. y Marton J. L. 2004. Antizyme induction mediates feedback limitation of the incorporation of specific polyamine analogues in tissue culture. *Biochemical Journal*. 384:271-279.
- Mohan R. R., Challa A., Gupta S., Bostwick G. D., Ahmad N., Abarwal R., Marengo R. S., Amini B. S., Paras F., MacLennan T. G., Resnick I. M. y Mukhtar H. 1999. Overexpression of ornithine decarboxylase in prostate cancer and prostatic fluid in humans. *Clinical Cancer Research*. 5:143-147.
- Moorehead R. J., Hoper M. y McKelvey S. T. D. 1987. Assessment of ornithine decarboxylase activity in rectal mucosa as a marker for colorectal adenomas and carcinomas. *British Journal of Surgery*. 74(5):364-365.
- O'Brien G. T., Megosh C. L., Gilliard G. y Peralta S. A. 1997. Ornithine decarboxylase overexpression is a sufficient condition for tumor promotion in mouse skin. *Cancer Research*. 57:2630-2637.
- Pegg E. A. 2006. Regulation of ornithine decarboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(21):14529-14532.
- Pérez H. S., Rodrigo L., Viñas S. J. y Piñol F. C. 2005. Efecto de la ingesta de etanol en un modelo experimental de cáncer de colon. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 97(2):87-96.
- Perše M. y Cerar A. 2005. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat – experimental colorectal carcinogenesis. *Radiology and Oncology*. 39(1):61-70.
- Pitkänen T. L., Heiskala M. y Andersson C. L. 2001. Expression of a novel human ornithine decarboxylase-like protein in the central nervous system and testes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 287:1051-1057.

- Pochapski M. T., Fosquiera E. C., Esmerino L. A., Dos Santos E. B., Farago P. V. Santor F. A., Groppo F. C. 2011. Phytochemical screening, antioxidant, and antimicrobial activities of the crude leaves' extract from *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Pharmacognosy Magazine*. 7(26):165-170.
- Protein Data Bank. 2011. Protein (Ornithine Decarboxylase). <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=7odc>. (Revisado 22 de agosto 2015).
- Quiñones M., Miguel M. y Aleixandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 27(1):76-89.
- Ramos M. D. B. 2013. Estructura, expresión y aspectos funcionales del inhibidor de antizimas 2. *Tesis de doctorado*. Universidad de Murcia. pp. 183.
- Ramos R. J., Pabijan J., García R. y Lekka M. 2014. The softening of human bladder cancer cells happens at an early stage of the malignancy process. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 5:447-457.
- Reynoso O. R., Delgado S. J. I., Puebla P. A. M., Calvo M. C., Carr D., Velázquez M. S. y Santerre A. 2008. Difluorometil ornitina y el efecto acuoso de *Bursera fagaroides* en el modelo de linfoma murino L5178Y en ratones Balb/c: comparación de su efecto en el metabolismo de las poliaminas. *Revista de Salud Animal*. 30(2):128-132.
- Reynoso O. R., Velázquez M. S., Puebla P. A., Clavo M. C. y Santerre A. 2009. Las poliaminas y el cáncer: el conocimiento, su aplicación y perspectivas. *Scientia-CUCBA*. 11(1-2):31-42.
- Robertis De M., Massi E., Poeta L. M., Carotti S., Morini S., Cecchetelli L., Signori E. y Fazio M. V. 2011. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of Carcinogenesis*. 10(1):9.
- Rodrigo L. y Riestra S. 2007 Dieta y cáncer de colon. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 99(4):183-189.
- Rosenberg, D. W., y Liu, Y. 1995. Induction of aberrant crypts in murine colon with varying sensitivity to colon carcinogenesis. *Cancer letters*. 92(2):209-214.

- Rozhin J., Wilson S. P., Bull W. A. y Nigro D. N. 1984. Ornithine decarboxylase activity in the rat and human colon. *Cancer Research*. 44:3226-3230.
- Sadik A. H. N. y Shaker G. O. 2012. Dietary folate suppresses DMH-induced colon carcinogenesis in a rat model and affects DMH-induced expression of four DNA repair enzymes. *Nutrition and Cancer*. 64(8):1196-1203.
- Santinelli N. B. y Cervera C. E. E. 2010. Capítulo 11. Marcadores tumorales. En: Manual de oncología, procedimientos médicos quirúrgicos. Eds. Granados G. M. y Herrera G. A. Cuarta Edición. *McGraw-Hill*. pp. 1364.
- Santerre A., Huizar L. Ma. R., Mejía G. A., Vázquez B. M. P., Casas J. J. y Castro F. P. 2015. Efecto del extracto etanólico de *Ipomoea batatas* en los niveles de citosinas en un modelo murino de cáncer colorrectal. *Progresos en las Ciencias Biológico-Agropecuarias, XXV semana nacional de la investigación científica y tecnológica*. pp. 138.
- Schneider Y., Vincent F., Durantón B., Badolo L., Gossé F., Bergmann C., Seiler N. y Raul F. 2000. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer letters*. 158(1):85-91.
- Sharma R. A., Manson M. M., Gescher A. y Steward W. P. 2001. Colorectal cancer chemoprevention: biochemical targets and clinical development of promising agents. *European Journal of Cancer*. 37:12-22.
- Shi Q. y Jackowski G. 1998. Capítulo 1. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. En: Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. Ed. Hames B. D. Tercera Edición. *Oxford University Press*. pp. 345.
- Silva J. A. 2008. Quimioprevención en cáncer de colon. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 7(4): 20-21.
- Schipper G. R., Cuijpers M. J. I. V., de Groot H. J. M. L., Thio M. y Verhofstad A. J. A. 2004. Intracellular localization of ornithine decarboxylase and its regulatory protein, antizyme-1. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 52(10):1259-1266.
- Takano S., Akagi M. y Bryan G. T. 1984. Stimulation of ornithine decarboxylase activity and DNA synthesis by phorbol esters or bile acids in rat colon. *Gann=Gan*. 75(1): 29-35.

- Tudek B., Bird R. P., y Bruce W. R. 1989. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. *Cancer research*. 49(5):1236-1240.
- Tseng C. P. y Verma A. K. 1996. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced ornithine decarboxylase activity by genistein, a tyrosine kinase inhibitor. *Molecular pharmacology*. 50(2):249-257.
- Thomas T. y Thomas T. J. 2003. Polyamine metabolism and cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 7(2):113-126.
- Tong Y., Yang W. y Koeffler P. H. 2011. Mouse models of colorectal cancer. *Chinese Anti-Cancer Association*. 30(7):450-462.
- Vázquez B. M. 2013. Evaluación del efecto antitumoral del extracto de camote (*Ipomoea batatas*) a través de la medición de los niveles de poliaminas en un modelo murino de cáncer colorrectal. *Tesis de licenciatura en Biología*. Universidad de Guadalajara. pp. 73.
- Villalobos P. J., Bourlon T. M. y Loaeza C. A. 2014. Variaciones en la frecuencia de cáncer del aparato digestivo en el transcurso de 35 años en cuatro instituciones de la Ciudad de México de distinto nivel socioeconómico. *Gaceta Médica de México*. 150:49-57.
- Vilches C. N., Luévano G. A., Barboza Q. O., Garza G. R., Ancer R. J. y Flores G. J. P. 2010. Carcinoma colorrectal: comparación histológica entre pacientes mayores de 51 años. *Patología*. 48(1):12-17.
- World Health Organization. 2014. Cancer Country Profiles, Mexico. http://www.who.int/cancer/country-profiles/mex_en.pdf?ua=1 (Revisado 05 de diciembre 2015).
- Zamora G. E. 2006. Estandarización y determinación de la actividad de la ornitina descarboxilasa en tejido de ratón. *Tesis de licenciatura*. Universidad de Guadalajara. pp. 63.
- Zamorano P. E., Lagos M. P., Rivera C. P. y Fernández R. J. 2008. Un modelo experimental inducible en ratón para conducir estudios en quimioprevención y anticarcinogénesis. *Theoría*. 17(1):71-86.
- Zar J. H. 1999 Biostatistical Analysis. Cuarta edición. *Prentice Hall*. pp. 622.

Zubiaurre L. y Bujanda F. de P. L. 2011. Aspirina en la prevención del cáncer colorrectal.
Gastroenterología y Hepatología. 34(5):337-345.

XIII. ANEXOS

11.1 Anexo 1. Preparación y administración de la 1,2 dimetilhidracina (DMH)

Ratones hembra de la cepa Balb/c de 23 ± 2 g de peso corporal, recibieron una inyección subcutánea semanal de DMH, durante 24 semanas a la dosis subletal de 20 mg/ Kg de peso corporal. La DMH (Sigma) se preparó inmediatamente antes de ser administrada, se disolvió en solución salina isotónica y se ajustó a la concentración deseada. La inyección subcutánea se realizó en la parte ventral del animal utilizando una jeringa de insulina con un volumen constante de 200 μ L, tal como se observa en la figura 18 (Cazares, 2010; Vázquez, 2013).



Figura 18. Inyección subcutánea del DMH para la inducción de cáncer colorrectal. Imagen tomada de Vázquez, 2013.

11.2 Anexo 2. Obtención y determinación de fenoles totales del extracto etanólico de *Ipomoea batatas*

La planta del camote dulce (*Ipomoea batatas*) se cultivó en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). Las hojas se colectaron, lavaron y dejaron secar en estufa a 45°C durante 48 h. Posteriormente se molieron en un mortero y se colocaron en etanol al 96% en una relación 1:10 p/v en constante movimiento por 48 h. El extracto se filtró y pasó al rota vapor para la eliminación del exceso de etanol y por último se liofilizó. El liofilizado se almacenó en frasco ámbar a 4°C hasta su utilización.

La cuantificación de los fenoles se realizó mediante la técnica de Folin-Ciocalteu (Pochapski *et al.*, 2011). Se colocaron 200 µL del extracto con 1.4 mL de agua Mili-Q y 100 µL del reactivo de Folin, después de 5 min, se añadieron 300 µL de Na₂CO₃ al 20%, se mezclaron los reactivos y se dejaron reposar 2 h en la obscuridad. La absorbancia se midió a 765 nm en un espectrofotómetro (spectro UV-Vis RS, UV-2500). La curva de calibración se realizó con un estándar de ácido gálico a diferentes concentraciones (10-100 ppm), que se trataron de manera similar a las muestras (figura 19). Como blanco se utilizó 200 µL de etanol y se procesó similar a las muestras. Del extracto vegetal se prepararon diluciones seriadas por duplicado para determinar la concentración de fenoles contenidos en el mismo. Los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de muestra; el contenido de los fenoles totales en el extracto etanólico fue de 2,720 mg/100 g (Vázquez, 2013).

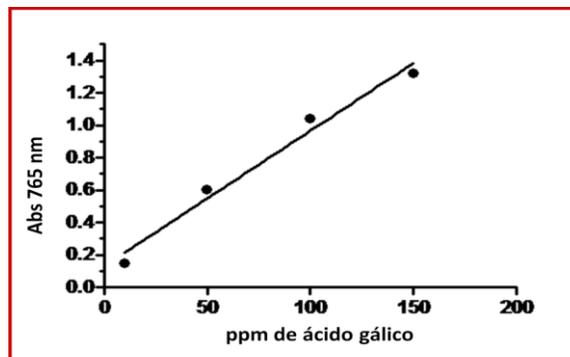


Figura 19. Curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales. Imagen tomada de Vázquez, 2013.

11.3 Anexo 3. Concentración de proteínas totales de riñón

Cuadro 6. Concentración de proteínas totales de riñón.									
Semana de sacrificio	Grupo experimental	Individuo	Concentración (µg/µL)	Semana de sacrificio	Grupo experimental	Individuo	Concentración (µg/µL)		
6	Control	1	4.27	18	Control	1	4.80		
		2	4.65			2	3.20		
		3	4.05			3	3.53		
	DMH	1	5.40		DMH	1	4.75		
		2	4.80			2	3.40		
		3	3.35			3	3.47		
	Extracto	1	3.80		Extracto	1	3.50		
		2	3.93			2	4.30		
		3	4.03		DMH+Extracto	1	2.90		
	DMH+Extracto	1	5.10		Preventivo	1	2.85		
		2	3.90			2	2.70		
		3	3.80		Control vehículo	1	3.10		
	Preventivo	1	3.83			2	2.20		
		2	4.57		Control	1	3.18		
		3	4.45			2	2.77		
	Control vehículo	1	4.40		DMH	1	2.70		
		2	3.67			2	2.65		
		3	3.93		Extracto	1	3.60		
12	Control	1	4.00	24	DMH+Extracto	1	3.83		
		2	4.30		Preventivo	1	3.67		
		3	3.87			2	4.63		
	DMH	1	4.10		Control vehículo	1	4.40		
		2	3.17			Control	1	4.05	
		3	2.88		2		3.55		
	Extracto	1	2.90		DMH		1	3.90	
		2	3.10			2	4.53		
	DMH+Extracto	1	4.70		Extracto	1	4.00		
		2	3.80		DMH+Extracto	1	4.10		
	Preventivo	1	3.00		Preventivo	1	3.90		
		2	2.10			2	3.93		
		3	2.33		Control vehículo	1	4.40		
	Control vehículo	1	2.95			31	Control vehículo	1	4.40
		2	3.80						
		3	3.47						

11.4 Anexo 4. Concentración de proteínas totales de colon

Cuadro 7. Concentración de proteínas totales de colon.								
Semana de sacrificio	Grupo experimental	Individuo	Concentración (µg/µL)	Semana de sacrificio	Grupo experimental	Individuo	Concentración (µg/µL)	
6	Control	1	2.00	18	Control	1	3.60	
		2	2.30			2	2.50	
		3	1.60			3	2.55	
	DMH	1	2.20		DMH	1	2.70	
		2	2.60			2	3.90	
		3	3.30			3	2.10	
	Extracto	1	2.83		Extracto	1	1.80	
		2	1.80			2	2.10	
		3	1.00		DMH+Extracto	1	4.60	
	DMH+Extracto	1	2.70		Preventivo	1	3.20	
		2	1.30			2	4.05	
		3	1.10		Control vehículo	1	3.10	
	Preventivo	1	1.30			2	4.40	
		Control vehículo	2		1.75	Control	1	3.70
	1		2.00		2		3.10	
2	1.60		DMH	1	3.95			
3	1.30	2		3.80				
12	Control	1	2.60	24	Extracto	1	3.88	
		2	2.80		DMH+Extracto	1	3.45	
		3	3.00		Preventivo	1	3.00	
	DMH	1	1.80			2	2.70	
		2	1.90		Control vehículo	1	3.10	
		3	2.40			Control	1	2.90
	Extracto	1	2.60		2		2.50	
		2	2.00		DMH	1	2.30	
	DMH+Extracto	1	2.40			2	2.97	
		2	2.00		Extracto	1	2.85	
	Preventivo	1	4.50			DMH+Extracto	1	1.60
		2	5.10			Preventivo	1	1.59
		3	5.40		2		2.21	
	Control vehículo	1	3.80		Control vehículo	1	2.40	
		2	4.70					
3		4.70						
31	Control	1	2.60	31	Control	1	2.90	
		2	2.80			2	2.50	
		3	3.00			DMH	1	2.30
	DMH	1	1.80		2		2.97	
		2	1.90		Extracto	1	2.85	
		3	2.40			DMH+Extracto	1	1.60
	Extracto	1	2.60			Preventivo	1	1.59
		2	2.00		2		2.21	
	DMH+Extracto	1	2.40		Control vehículo	1	2.40	
		2	2.00					
	Preventivo	1	4.50					
		2	5.10					
		3	5.40					
	Control vehículo	1	3.80					
		2	4.70					
3		4.70						