
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**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.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE
TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA:
MÓNICA PAULINA VÁZQUEZ BARAJAS**

Las Agujas, Zapopan, Jalisco. Noviembre del 2013



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

COORD. BIOL. 171/2012

C. MÓNICA PAULINA VÁZQUEZ BARAJAS
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 **"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 colorectal"**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director(a) de dicho trabajo a **Dra. María del Rosario Huizar López**, y como asesor a: **Dra. Anne Marguerite Helene Santerre**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 20 de septiembre, del 2012.


DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA


M.C. VERÓNICA PALOMERA AVALOS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

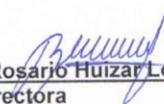
Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha
Presidente del Comité de Titulación.
Licenciatura en Biología.
CUCBA.
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **Tesis**, opción **Tesis** con el título: **“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.”** que realizó la pasante **Mónica Paulina Vázquez Barajas** con número de código **302478706** 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.

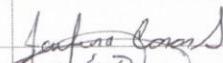
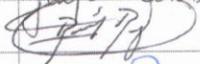
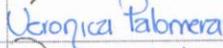
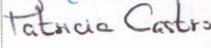
Atentamente

Zapopan, Nextipac. 08 de Octubre del 2013


Dra. María del Rosario Huizar López
 Directora


Dra. Anne Marguerite Helene Santerre
 Asesor

COMITE DE
 TITULACION

Nombre completo de los Síndicales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Josefina Casas Solís.		8/oct/13
Dr. Ramón Reynoso Orozco		8/oct/13
M.C Verónica Palomera Avalos		8 Oct 2013
Supl. Dra. Luz Patricia Castro Félix.		8 Oct 2013



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. María del Rosario Huizar López y asesoría de la Dra. Anne Marguerite Helene Santerre.

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.

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo
y no en el resultado. Un esfuerzo es una victoria
completa.*

Dedicatoria

A mis padres

Celina y Rigoberto quienes estuvieron a mi lado siendo mi apoyo, mi ejemplo y mi impulso para seguir adelante. Me han demostrado que todo trabajo implica un sacrificio pero al final tiene su recompensa. Gracias por enseñarme a luchar por mis sueños y mirar hacia adelante con firmeza y seguridad.

Reconocimientos y Agradecimientos

A Dios

Por haberme permitido llegar hasta este punto y ponerme en el camino correcto para culminar mi carrera.

A mis hermanos

Celina, Diego y Daniel por ser mis compañeros incondicionales y una chispa de felicidad en mi vida.

A mi abuelo Rubén

Quien es mi guerrero, un ejemplo de tenacidad y amor por la vida, me ha enseñado que nunca hay que dejar de luchar por lo que en verdad se quiere con todo el corazón.

A la Universidad de Guadalajara

Por brindarme la oportunidad de prepararme para la vida.

A mis amigos

Natalia, Ana y Carlos por ofrecerme su amistad en todos estos años.

A mis compañeros biólogos

*Lorena, Angélica, Francisco, Victor, Flavio, Mary, Liz, Claudia, Nidia,
Chabe por hacer de la carrera una experiencia grata y maravillosa.*

A mis compañeros de laboratorio

*Blanca, Ahtziri, Alejandra, Edgar, Enrique, Starón por el apoyo que me
brindaron en el laboratorio y durante la elaboración de mi tesis.*

A Cesar

Por el apoyo y la enseñanza que me brindo a lo largo de esta tesis.

A la Dra. Rosario

*Por toda su paciencia, conocimientos y confianza que me brindo en mi
estancia en el laboratorio.*

A la Dra. Anne

*Por haberme dado su apoyo y confianza para realizar la tesis en su
laboratorio.*

A mis sinodales

Dra. Josefina, M.C. Verónica, Dra. Patricia y Dr. Ramón por el tiempo y dedicación para que este trabajo llegara al final.

A todos mis maestros

Por haber compartido sus conocimientos que me ayudaron a superarme y que siempre llevaré conmigo.

Hoy miro hacia atrás y no me queda más que agradecer a todos los que compartieron conmigo el reto que la vida me puso enfrente.

GRACIAS

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURA	iii
ÍNDICE DE CUADRO	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vii
I. ANTECEDENTES	1
Generalidades del Cáncer	1
Epidemiología del Cáncer	1
Cáncer Colorrectal	2
Desarrollo del Cáncer Colorrectal	3
Factores de Riesgo de Cáncer Colorrectal	5
Hábitos Alimenticios	5
El Estilo de Vida	6
La Herencia	7
Marcadores Tumoraes	8
Las Poliaminas	9
Metabolismo de las Poliaminas	10
El Catabolismo de las Poliaminas	11
Las Poliaminas y el Cáncer	12
Tratamientos para el Cáncer de Colon	13
Camote dulce (<i>Ipomoea batatas</i>)	14
Los Polifenoles	15

Los Polifenoles y el Cáncer	17
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
III HIPÓTESIS.....	21
IV. OBJETIVOS	22
Objetivo General	22
Objetivos Particulares.....	22
V. DISEÑO EXPERIMENTAL	23
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	24
VII. RESULTADOS	31
VIII. DISCUSIÓN.....	44
IX. CONCLUSIONES.....	48
X. GLOSARIO.....	49
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	51

ÍNDICE DE FIGURA

Fig. 1. Fases de la carcinogénesis	4
Fig. 2. Proceso de cambio del epitelio normal a un carcinoma.....	5
Fig. 3. Estructura química de las poliaminas	9
Fig. 4. Metabolismo de las poliaminas.....	12
Fig. 5. Flor y hojas de <i>Ipomoea batatas</i> (camote dulce).....	14
Fig. 6. Estructuras de los principales subgrupos de polifenoles.....	16
Fig. 7. Metabolismo de los polifenoles.....	17
Fig. 8. Mecanismos de acción de los polifenoles.....	19
Fig. 9. Inyección subcutánea del carcinogénico DMH.....	26
Fig. 10. Obtención de orina de los ratones experimentales.....	28
Fig. 11. Cultivo de camote dulce (<i>Ipomoea batatas</i>) en el CUCBA.....	31
Fig. 12. Curva estándar de ácido gálico.....	32
Fig. 13. Separación cromatográfica de las poliaminas	33
Fig. 14. Curva estándar de putrescina.....	34
Fig. 15. Curva estándar de espermidina.....	34
Fig. 16. Curva estándar de espermina.....	35
Fig. 17. Niveles de putrescina en orina de los ratones, semana 6.....	36
Fig. 18. Niveles de putrescina en orina de los ratones, semana 12.....	37
Fig. 19. Niveles de putrescina en orina de los ratones, semana 18.....	38
Fig. 20. Niveles de putrescina en orina de los ratones, semana 24.....	39
Fig. 21. Niveles de espermina en orina de los ratones, semana 6.....	40
Fig. 22. Niveles de espermina en orina de los ratones semana 12.....	41
Fig. 23. Niveles de espermina en orina de los ratones, semana 18.....	42
Fig. 24. Niveles de espermina en orina de los ratones, semana 24.....	43

ÍNDICE DE CUADRO

Cuadro 1. Grupos de riesgo para el cáncer colorrectal.....	8
Cuadro 2. Programa de elución de las poliaminas por HPLC con el gradiente de los diferentes amortiguadores.....	30

ABREVIATURAS

ACE	Antígeno carcinoembrionario
Ado Met	S-adenosil-L-metionina
APC	Gen de la poliposis adenomatosis coli
°C	Grados Centígrados
CCHSP	Síndrome de cáncer colorrectal sin pólipos
CCR	Cáncer colorrectal
CUCI	Colitis ulcerativa crónica inespecífica
DMH	1,2 dimetilhidracina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GAE	Ácido gálico
GST	Gen supresor tumoral
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía de alta resolución
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
KDa	Kilodaltones (Unidades de masa atómica)
Kg	Kilogramos
KOH	Hidróxido de potasio
M	Molaridad
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanométros

ODC	Ornitina descarboxilasa
OPA	O-ftalaldehido
PAF	Poliposis adenomatosa familiar
PAO	Poliamina oxidasa
PA_s	Poliaminas
PBS	Solución salina de fosfatos
pH	Potencial de hidrogeno
p/v	Peso por volumen
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies oxido reactivas
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
SMO	Espermina oxidasa
SMS	Espermina sintasa
SPDS	Espermidina sintasa
SSAT	Espermidina, Espermina N ¹ -acetiltransferasa
TCA	Ácido tricloroacético
μL	Microlitros
μm	Micras
v/v	Volumen por volumen

RESUMEN

El cáncer colorectal (CCR) constituye una de las formas más frecuentes de cáncer. Actualmente los fármacos utilizados para su tratamiento son de origen sintético y presentan baja efectividad y alta toxicidad por lo que la farmacología se está enfocando en formulaciones de origen natural como los extractos vegetales de las hojas de camote (*Ipomoea batatas*) que son ricas en polifenoles, compuestos que presentan propiedades anti-inflamatorias, antitumorales y ayudan a inducir la apoptosis. En el CCR es fundamental el diagnóstico en etapas iniciales por lo que es necesaria la búsqueda de moléculas biomarcadoras como las poliaminas involucradas en la hiperproliferación y diferenciación celular.

En el presente trabajo se evaluó el efecto preventivo y antitumoral del extracto etanólico de las hojas de camote, a través de los niveles de las poliaminas en un modelo murino de CCR, inducido con el carcinógeno 1,2 dimetilhidracina (DMH). El extracto se administró vía oral a ratones Balb/c, se colectó la orina a la semana 6, 12, 18 y 24 de experimentación y las muestras se analizaron por HPLC. Los niveles de putrescina en el grupo tratado con el carcinógeno DMH se encontraron elevados en todas las semanas experimentales en comparación con el grupo sano. Los niveles de putrescina en este grupo fueron similares a los del grupo tratado preventivamente con el extracto. Por otro lado, se observó que a la semana 24 los ratones tratados con el extracto vegetal tanto preventivamente como a la par presentaron una disminución en los niveles de espermina en comparación con el grupo DMH. Los resultados obtenidos indican que la putrescina podría ser útil como molécula biomarcadora del CCR en etapas iniciales, mientras que la espermina en etapas tardías. Los datos experimentales indican además que la administración preventiva del extracto vegetal modula el metabolismo de las poliaminas lo que permite controlar la proliferación celular.

I. ANTECEDENTES

Generalidades del Cáncer

El cáncer es una serie de enfermedades caracterizadas por cambios en los mecanismos de regulación y control del ciclo celular, rompe el equilibrio entre la proliferación y los mecanismos normales de muerte celular (Rodríguez *et al.*, 2007).

Las células cancerosas se alteran por la acumulación de diversas mutaciones, pierden la capacidad de regularse y proliferan sin control lo que ocasiona la formación de tumores malignos, que tienden a crecer y afectan a órganos y tejidos adyacentes, una de sus características es la invasión a distancia llamada metástasis (Hanahan y Weinber, 2011).

Epidemiología del Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte con aproximadamente 7.6 millones de defunciones anuales lo que representa el 13% del total de muertes en el mundo. Los tipos de cáncer más frecuentes son el pulmonar (1.37 millones de defunciones), el gástrico (736,000), hepático (695,000); colorrectal (608, 000); mamario (458,000); y el cervicouterino (275,000), más del 70% de las defunciones se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se estima que el número de defunciones por cáncer aumente en todo el mundo y supere los 13.1 millones para el 2030 (OMS, 2013).

En México en el 2011 se presentó una mortalidad de 590,693 individuos de los cuales 75,795 fallecieron a causa de algún tumor (neoplasia) lo que representa el 13% del total, 37,045 defunciones fueron hombres y 38,750

fueron mujeres por lo que ocupan un lugar considerable de muertes en el país (INEGI, 2013).

En Jalisco en el año 2011, se registraron 40,328 defunciones por neoplasias, 56% sucedieron en hombres y 44% en mujeres. Los tumores malignos ocupan el tercer lugar en la lista de las principales causas de defunción en Jalisco; por dicha causa fallecieron 5,451 personas, el volumen representa 13.5% del total de defunciones registradas en el año en esta entidad (INEGI, 2013).

Según la Organización Mundial de la Salud los principales tipos de cáncer con mayor incidencia son entre las mujeres el cáncer de mama, cervicouterino y ovario, mientras que en los hombres el de próstata, pulmón y colorrectal.

Cáncer Colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es un tumor maligno que se origina en el epitelio del colon y recto, constituye una de las formas más frecuentes de cáncer (Nussbaum *et al.*, 2008). Actualmente es un problema de salud pública ya que cada vez su incidencia es mayor, ocupa el segundo lugar de mortalidad en los Estados Unidos y se encuentra dentro de los cuatro tipos de cáncer más diagnosticados tanto en México como en el mundo (Jemal *et al.*, 2010).

Por sus características clínicas, epidemiológicas y genéticas el CCR se clasifica en los siguientes tipos: a) el esporádico: que representa el 70 - 80% de los casos de CCR; b) familiar; c) hereditario y d) el relacionado con enfermedades inflamatorias, como colitis ulcerativa crónica inespecífica (CUCI) y enfermedad de Crohn (Granados y Herrera, 2010).

Cada año en el mundo se diagnostican cerca de 600,000 nuevos casos de CCR, lo que representa el 9% de las neoplasias malignas en el humano y el

riesgo de presentar CCR se incrementa con la edad, con una media de 50.8 años y solo el 3% de los casos ocurren en personas menores de 40 años (Granados y Herrera, 2010).

Desarrollo del Cáncer Colorrectal

Para el desarrollo de la carcinogénesis es necesaria una serie de eventos con tres fases importantes: iniciación, promoción y progresión, procesos por los cuales una célula normal pasa a ser una célula cancerosa o tumoral (Granado, 2010).

Iniciación: Esta es una fase relativamente rápida pero reversible que consiste en el daño en el material genético de la célula (mutaciones en el DNA).

Promoción: Es una fase relativamente larga; la célula dañada persiste, se replica y puede originar un foco de células preneoplásicas. En esta fase se producen también procesos de angiogénesis.

Progresión: Es la fase final e irreversible de la carcinogénesis donde las células alteradas genéticamente se perpetúan y pasan de ser preneoplásicas a neoplásicas, proliferan sin control y aumenta su potencial de invasión a nuevos tejidos llamado metástasis (Figura 1).

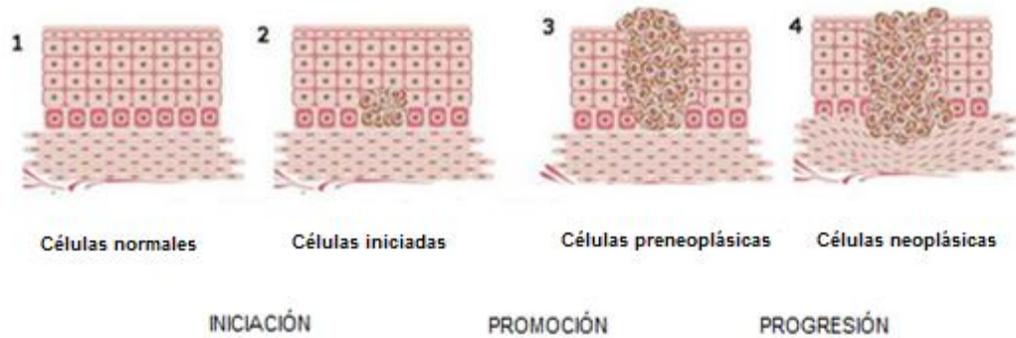


Figura 1. Fases de la carcinogénesis (Granado, 2010).

La mayoría de los tumores colorrectales son adenocarcinomas, que se originan a partir de pólipos adenomatosos desarrollados en la mucosa colónica sana. La progresión morfológica de la mucosa normal a adenoma y de ésta a tumor maligno es una manifestación de mutaciones en el DNA. El CCR resultado de una serie de mutaciones acumuladas en los genes supresores tumorales, oncogenes y genes reparadores del DNA (Campos y García, 2010).

El CCR inicia con la mutación del gen APC (poliposis adenomatosa del colon) el cual es un gen supresor tumoral, el resultado de esta mutación es una proteína trunca de 300 kDa que inhibe la apoptosis y la proliferación celular. Tras inactivarse APC se presenta la mutación del oncogen K-RAS el cual está involucrado en las señales de división celular, cuando hay una mutación en K-RAS, la señal de división es constante; posteriormente surge una delección en un gen supresor de tumor llamado DCC (delección en cáncer de colon) y como último evento la mutación del gen supresor p53 (Galiano, 2005; Zamorano *et al.*, 2008) (Figura 2)

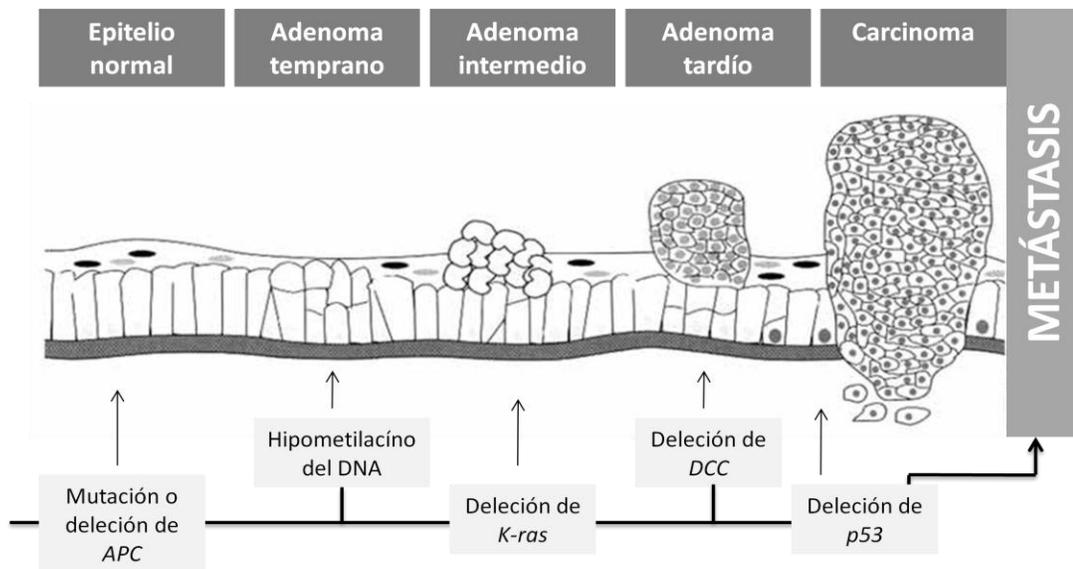


Figura 2. Proceso de cambio del epitelio normal a un carcinoma (Campo y García, 2010).

Factores de Riesgo de Cáncer Colorrectal

Actualmente el 75% de los tumores malignos de colon y recto se presenta en pacientes sin factores de riesgo conocidos y su incidencia es 10 veces mayor en países desarrollados que en aquellos en vías de desarrollo. Se cree que las diferencias en los hábitos alimenticios y el estilo de vida podrían explicar esta observación (Morgan *et al.*, 2008).

Hábitos Alimenticios

Grasas: inducen la excreción de ácidos biliares primarios que se convierten en secundarios por las bacterias del colon, estos últimos son mutagénicos por lo que un alto consumo de grasas en los alimentos puede promover el CCR (Galiano, 2005).

Carnes rojas: Su ingesta aumenta el riesgo de CCR, a mayor temperatura en su preparación, aumenta la cantidad de aminas heterocíclicas y también es importante si se fríe o no. La ingesta de carne con estas características incrementa dos veces la prevalencia de adenomas en el colon (Libuth *et al.*, 2005).

Fibra: El consumo de fibra favorece la disminución del pH intraluminal lo que disminuye la mutagenicidad de los ácidos biliares secundarios, la dilución de los carcinógenos, da lugar a la formación de ácidos grasos de cadena corta a través de la fermentación bacteriana, e induce la fijación de ácidos biliares aumentando su excreción, por lo que la ingesta de alimentos con alto contenido en fibras disminuye la posibilidad de presentar CCR (Morgan *et al.*, 2008).

Frutas y verduras: El consumo de estos alimentos disminuye la incidencia del CCR ya que contienen una amplia cantidad de sustancias potencialmente anticarcinogénicas sobre todo los productos verdes (verdolagas, espinacas, etc.), este efecto se asocia al contenido de vitaminas antioxidantes (A, E y C) y la presencia de carotenoides (β caroteno, licopeno, α caroteno, luteína, β criptoxantina) que funcionan a través de uno o varios mecanismos independientes o co-independientes (Galiano, 2005; Morgan *et al.*, 2008).

El Estilo de Vida

Inactividad física: Un estilo de vida sedentario puede ser un riesgo mayor de padecer CCR, por el contrario disminuye en las personas que hacen ejercicio con regularidad (Howard *et al.*, 2008).

Tabaquismo: El tabaco contiene un número de carcinógenos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, nitrosaminas y aminas aromáticas, los cuales producen daño en el material genético de las células.

Alcoholismo: Induce la proliferación celular, bloquea la donación de grupos metilos e inhibe la reparación del DNA (Sociedad Mexicana de Oncología, 2008).

La Herencia

La herencia es un factor de riesgo importante para el desarrollo del CCR (Cuadro 1). El cáncer hereditario se subdivide en dos grandes síndromes, el vinculado con pólipos y el que carece de ellos.

Poliposis adenomatosa familiar (PAF): se caracteriza por la presencia de múltiples adenomas colorrectales (más de 100 en la forma clásica y entre 10 y 100 en la atenuada), lo que representa un alto riesgo de desarrollar CCR. Esta enfermedad se transmite en forma autosómica dominante en un 95% (Alfaro *et al.*, 2010).

Síndrome de cáncer colorrectal hereditario sin pólipos (CCHSP): se transmite en forma autosómica dominante y explica el 2 a 10% de las neoplasias colorrectales (Granados y Herrera, 2010).

Cuadro 1. Grupos de riesgo para el cáncer colorrectal. (Granados y Herrera, 2010).

Grupos de pacientes y riesgos
I: Pacientes de alto riesgo
Síndromes hereditarios Antecedentes familiares de cáncer Colitis ulcerativa de más de 10 años de diagnosticada
II: Pacientes de riesgo moderado
Antecedentes de cáncer colónico o presencia de pólipos adenomatosos Colitis ulcerativa en los últimos 5 a 10 años Familiares de primer grado con antecedentes de cáncer colónico
III: Riesgo probable
Antecedentes de cáncer de mama y ginecológicos Antecedentes de radioterapia en la pelvis por cáncer ginecológico

Marcadores Tumorales

Los marcadores de tumores son el producto de células normales que en presencia de una alteración celular (cáncer) se producen en concentraciones más altas. Estas sustancias pueden encontrarse en la sangre, orina, materia fecal, tejidos o líquidos del cuerpo y generalmente son enzimas, proteínas, hormonas, entre otros (Instituto Nacional del Cáncer, 2011).

El marcador más utilizado en el CCR es el antígeno carcinoembrionario (ACE), una glicoproteína de 200 KDa. Se encontró en suero de pacientes con CCR en 1956 y se creyó específico del mismo, pero actualmente también se asocia con otros tumores malignos como el gastrointestinal, pulmonar, mama, próstata, páncreas, cuello de útero, vejiga, ovario e hígado (Bucal, 2007).

La principal aplicación del ACE es la vigilancia de individuos con diagnóstico de este tipo de cáncer. Sin embargo debido a la carencia de sensibilidad de ACE para la detección de la enfermedad en etapas tempranas, tiene poco valor a nivel clínico como único diagnóstico (Granados y Herrera, 2010). Por lo anterior, se proponen otros marcadores tumorales para el CCR, como pueden ser las poliaminas (Soda, 2011).

Las Poliaminas

Las poliaminas (PAs) son aminas biogénicas presentes en todas las células y distribuidas ampliamente en todos los organismos vivos, estos compuestos son de bajo peso molecular y de carga positiva a pH fisiológico (Ignatenko *et al.*, 2011).

Las PAs son tres principalmente y se distinguen por su estructura química que depende de los grupos aminos presentes. La putrescina es una diamina, la espermidina una triamina y la espermina una tetramina (Figura 3).

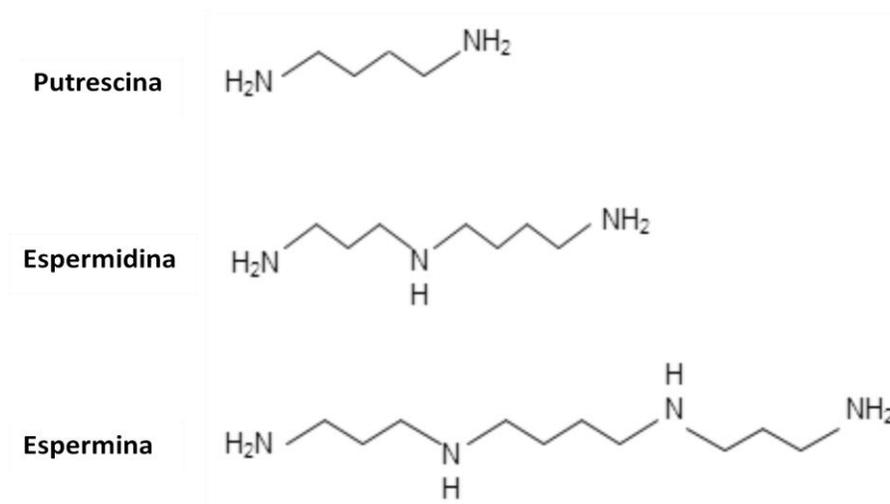


Figura 3. Estructura química de las poliaminas (Modificado de Minois *et al.*, 2011).

Por su naturaleza policatiónica sus principales características son interactuar con un sin número de moléculas cargadas negativamente, tales como DNA, RNA, proteínas, fosfolípidos y ayudar a estabilizar sus estructuras. Dada su versatilidad en la unión con otras moléculas, están implicadas en muchas funciones, en su mayoría vinculadas con el crecimiento celular, la supervivencia y la proliferación (Minois *et al.*, 2011). Estan involucradas en una variedad de procesos celulares fundamentales, incluyendo la transcripción, procesamiento del RNA, la síntesis de proteínas y la modulación de la actividad de las enzimas (Takahashi y Kakehi, 2010). Por lo que sus niveles están estrechamente controlados y se acumulan en alta concentración en células activamente proliferativas (Babbar y Gerner, 2011).

Metabolismo de las Poliaminas

Existen tres fuentes de poliaminas para el organismo: la biosíntesis *in situ* a partir de aminoácidos, la ingesta directa en la dieta y la síntesis por la flora microbiana residente en el tracto gastrointestinal (Gomez *et al.*, 2008).

La síntesis de las poliaminas inicia a partir de los aminoácidos arginina, ornitina y metionina. El primer paso en la vía es la producción de la ornitina que puede ser producto de la arginina por la enzima arginasa mitocondrial o la ingesta directa en los alimentos. La ornitina es descarboxilada por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) para producir la putrescina, que a su vez se convierte en espermidina por la acción de la enzima espermidina sintasa (SPDS) y por último se sintetiza la espermina a través de la enzima espermina sintasa (SMS). Se ha demostrado que la regulación de la síntesis de las poliaminas se realiza mediante la degradación temprana de la ODC, que a su vez es regulada por una proteína específica llamada antizima, que al unirse a los monómeros de la ODC impide la formación de los dímeros

activos. Los monómeros unidos a la antizima son reconocidos por el proteosoma 26S que degrada rápidamente la enzima ODC, liberando al mismo tiempo la antizima independiente de ubiquitina (Algranati *et al.*, 2006).

Por otro lado la metionina se convierte en S-adenosil-L-metionina (AdoMet), a través de la enzima metionina adenosiltransferasa (MAT), la cual es descarboxilada y se convierte en S-adenosilmetionina descarboxilasa (DcAdoMet), esta proteína puede activar a la enzima SPDS para la síntesis de espermidina, o la enzima SMS para la producción de espermina (Ignatenko *et al.*, 2011).

El Catabolismo de las Poliaminas

El catabolismo de las PAs permite la reutilización de las mismas en un proceso reversible, ya que la espermina se convierte directamente en espermidina por medio de la enzima espermina oxidasa (SMO) ó se puede convertir en acetil espermina y después en espermidina por las enzimas espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT) y poliamina oxidasa (PAO) respectivamente. Posteriormente la espermidina se degrada en acetil espermidina por acción de la enzima SSAT, y es oxidada por la PAO para formar la putrescina (Babbar y Gerner, 2011, Minois *et al.*, 2011). Los productos en este proceso son el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y el 2 aminopropanol. La SSAT es absolutamente necesaria para la transformación de espermidina a putrescina por lo que se considera una enzima limitante del catabolismo de las poliaminas (Gamble *et al.*, 2012) (Figura 4).

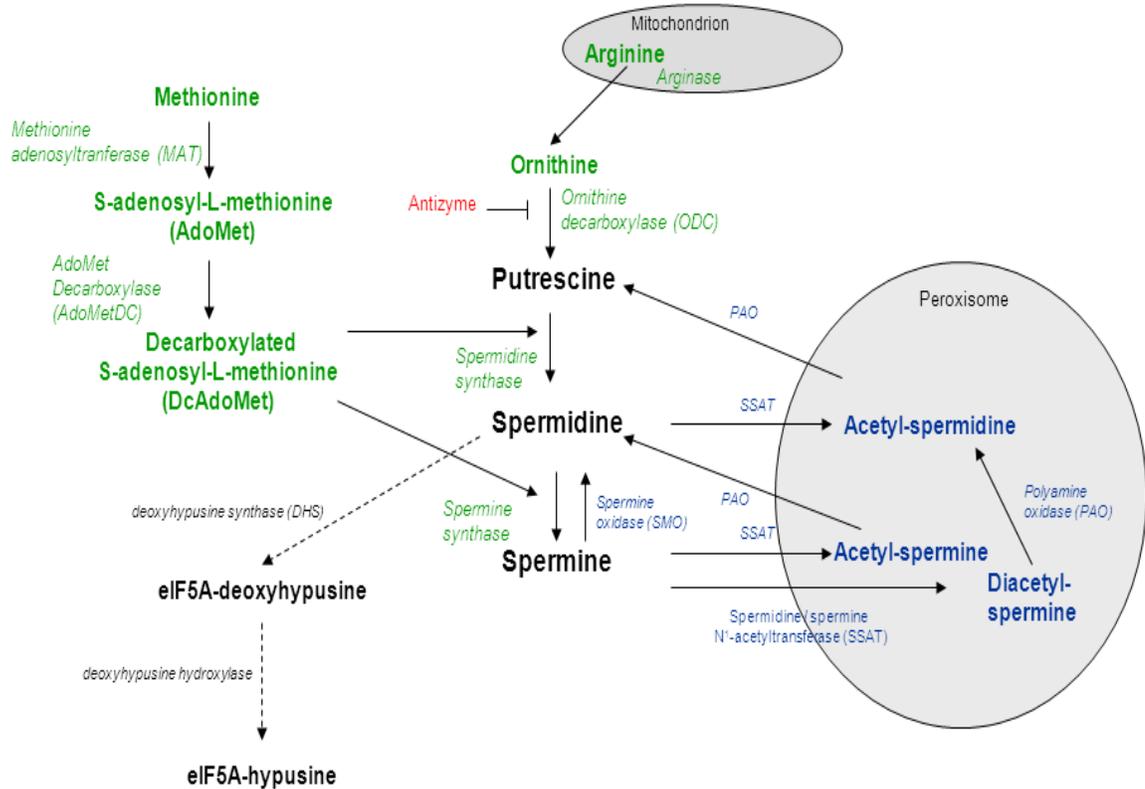


Figura 4. Metabolismo de las poliaminas: Verde: síntesis de poliaminas. Rojo: proteína inhibidora y Azul: catabolismo de las poliaminas (Minois *et al.*, 2011).

Las Poliaminas y el Cáncer

Diversos estudios indican que los niveles de las poliaminas aumentan significativamente en pacientes con cáncer. Estos niveles se pueden atribuir tanto a la secreción a partir de las células en constante proliferación que caracteriza a la enfermedad o a las poliaminas liberadas por las células muertas como consecuencia de la sustitución activa de las mismas. Existe una correlación positiva entre los niveles anormales de las PAs y el desarrollo tumoral en los fluidos biológicos en pacientes con cáncer, las cuales podría ser utilizadas para un diagnóstico oportuno (Gosetti *et al.*, 2012).

Tratamientos para el Cáncer de Colon

El cáncer colorrectal puede ser curable si se detecta en etapas tempranas, por lo que su detección oportuna es fundamental. Entre los tratamientos que se siguen comúnmente se encuentran: la cirugía o extirpación de la zona afectada; la radioterapia o aplicación de rayos de alta energía con la finalidad de destruir las células malignas; la quimioterapia o administración de fármacos que destruyen las células cancerosas y la inmunoterapia o estimulación del sistema inmune del paciente para eliminar las células dañinas. El tratamiento oncológico es multidisciplinario, pero la intervención quirúrgica resulta indispensable para el pronóstico (Calderillo *et al.*, 2010).

En la actualidad no existen tratamientos 100% efectivos para combatir el CCR en etapas más avanzadas, además son de origen sintético y tienen efectos colaterales en el organismo ya que son tóxicos y presentan una baja efectividad. Diversas investigaciones han demostrado que los patrones dietéticos caracterizados por un alto consumo de frutas y verduras, los cuales presentan compuestos funcionales y bioactivos, facilitan los mecanismos que contrarrestan la oxidación y los procesos inflamatorios, jugando un papel importante en la carcinogénesis (Johnson y Pace, 2010). Actualmente las empresas farmacéuticas se enfocan en la búsqueda de moléculas activas de origen natural. Existen extractos vegetales con propiedades anti-inflamatorias y antitumorales, como las hojas de la planta *Ipomoea batatas* (camote dulce) que se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades como el cáncer y diabetes sin efectos colaterales (Truong *et al.*, 2007; Kurata *et al.*, 2007).

Camote Dulce (*Ipomoea batatas*)

La *Ipomoea batatas* es una planta conocida como batata, papa dulce ó camote dulce. Es una planta trepadora herbácea de la familia *Convolvuláceae*. La flor es de color morado con los pétalos soldados en forma tubular, sus hojas son simples, alternas, enteras, pecioladas, persistentes de forma acorazonada, verdes y ocasionalmente moradas. Sus raíces son tubérculos alargados, fibrosas de colores blanquecinas, amarillentas o moradas y son comestibles (McDonald, 1994) (Figura 5).



Figura 5. Flor y hojas de *Ipomoea batatas* (camote dulce).

Las hojas de camote se consumen como hortaliza fresca en muchas partes del mundo principalmente en África y Asia, tienen alta valor nutricional ya que son ricas en vitaminas B, β -caroteno, hierro, calcio, zinc y en fibra, además de ser una excelente fuente de antioxidantes como la antocianina y ácidos fenólicos (polifenoles), tales como el ácido cafeico, monocafeiquico, dicafeico y tricafeico entre otros (Karna *et al.*, 2011).

En estudios previos se ha comprobado que el extracto de las hojas de camote suprime el crecimiento de células en cáncer humano (Kurata *et al.*,

2007). En otros estudios demuestran que inhibe la proliferación celular e induce apoptosis en distintos tipos de cáncer como el de próstata; estos efectos se atribuyen a los polifenoles, los cuales se encuentran abundantemente en esta planta (Karna *et al.*, 2011).

Los Polifenoles

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos a los cuales se les denomina polifenoles. Se originan principalmente en las plantas y se sintetizan en gran cantidad como producto del metabolismo secundario. Los principales grupos de polifenoles son los ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides, estos últimos son los más abundantes dentro del reino vegetal (Quiñones *et al.*, 2012).

Los flavonoides son estructuras hidroxiladas con anillos aromáticos y son por lo tanto estructuras polifenólicas. Estos compuestos pueden localizarse en distintas zonas de la planta como tallo, raíz, flor y fruto, pero principalmente se presentan en las hojas (Ramos *et al.*, 2011). Dentro de este amplio grupo de compuestos se encuentran subgrupos principalmente los flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavonas y antocianinas (Figura 6).

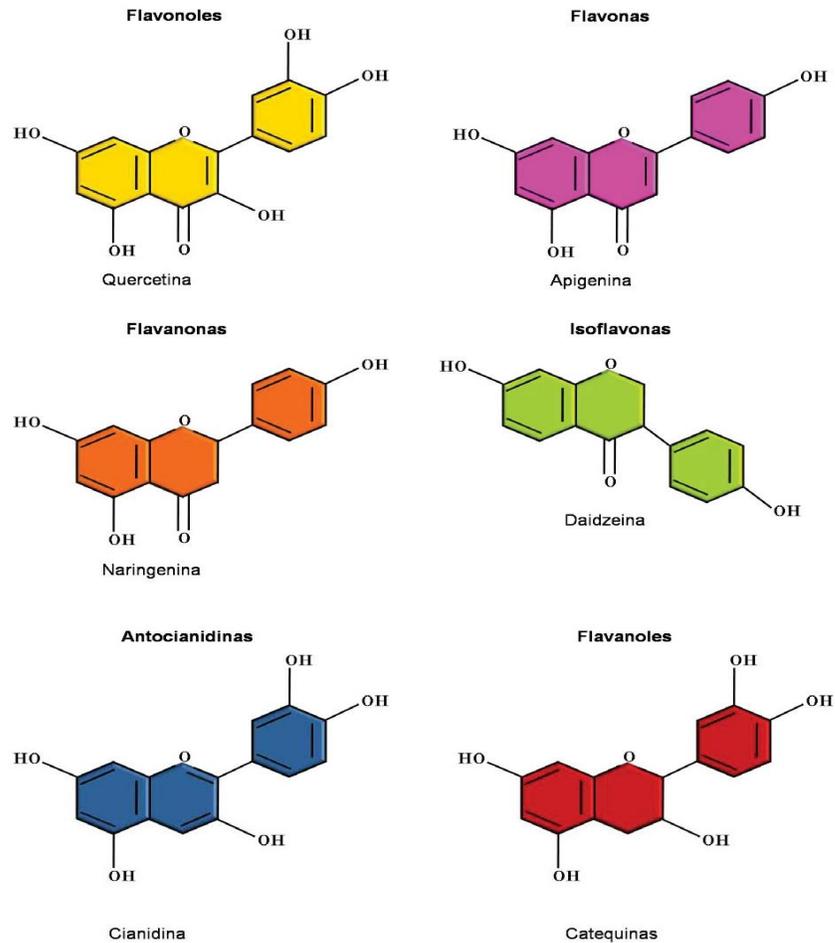


Figura 6. Estructuras de los principales subgrupos de polifenoles (Granado, 2010).

La mayoría de los compuestos fenólicos están presentes en los alimentos como ésteres, glucósidos o polímeros, formas que no pueden ser absorbidas. Estas sustancias deben hidrolizarse por enzimas intestinales como la β -glucosidasa y la lactasa-florizina hidrolasa o deben ser degradadas por la microflora del colon antes de ser asimiladas (D'Archivio *et al.*, 2010). En el proceso de absorción, los polifenoles sufren diversas modificaciones que inician en el intestino delgado, pasan por el colon y terminan en el hígado dando compuestos conjugados que posteriormente sufren procesos de metilación, sulfatación y/o glucuronidación (Figura 7).

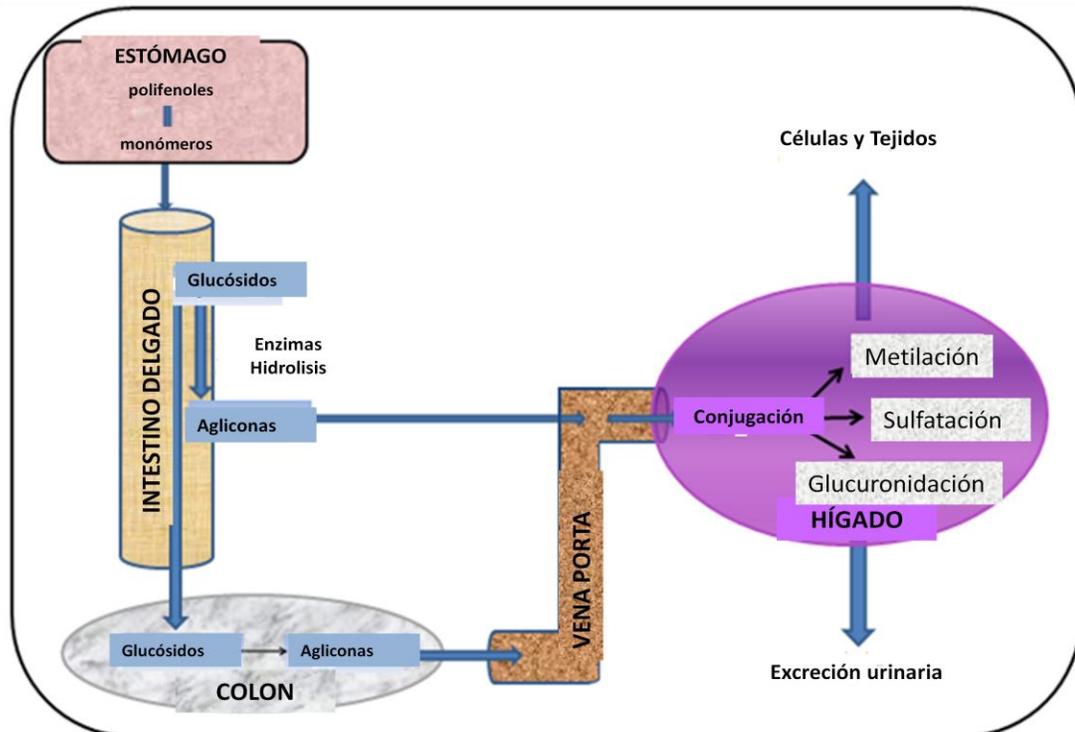


Figura 7. Metabolismo de los polifenoles (Modificado D'Archivio *et al.*, 2010).

Los Polifenoles y el Cáncer

Actualmente se ha demostrado que los polifenoles presentan una variedad de propiedades biológicas, incluyendo anticancerígena, anti-inflamatoria, protector del daño al DNA e inhibición/inducción de la apoptosis (Yagi *et al.*, 2012). Estudios epidemiológicos sugieren que la ingesta de alimentos ricos en polifenoles como las frutas, verduras o cualquier derivado de las plantas en la dieta diaria, reduce el riesgo de tumores de mama, colon, pulmón, próstata y páncreas. Sin embargo, estos efectos son un tema permanente de estudio (Dong y Qin, 2011).

La capacidad principal de los polifenoles es la antioxidación y se puede considerar como la actividad biológica responsable del efecto preventivo que

se les atribuye sobre determinadas enfermedades, frecuentes en los países desarrollados como el cáncer.

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) forma parte del metabolismo normal de una célula, pero el desequilibrio entre su generación y su neutralización puede conducir a un estado de estrés oxidativo, que causan daño al DNA y provoca la transformación cancerosa de las células. Sin embargo, una de las estrategias más efectivas frente a la carcinogénesis consiste en el bloqueo del daño genotóxico mediado por el sistema de defensa antioxidante/detoxicante de la célula mediante antioxidantes no enzimáticos como los polifenoles, los cuales son captadores de ROS; este efecto es potenciado por la presencia de enlaces y grupos hidroxilo libres así como de un grupo carbonilo (Zavaleta *et al.*, 2005).

Los polifenoles además de ser captadores de ROS, en una acción simultánea inducen las enzimas antioxidantes y detoxificantes como las glucoronidasas, sulfatasas y metilasas, limitando así el daño oxidativo dentro del organismo (Granado, 2010).

Además de la función antioxidante de los polifenoles se le atribuyen otros mecanismos de acción, como es la inducción de la apoptosis la cual se encuentra desregulada en las células tumorales. Los polifenoles activan a las proteínas involucradas en la cascada apoptótica como son las caspasas 3 y 7, o a la caspasa 9 y al citocromo *c* liberados por la mitocondria (D'Archivio *et al.*, 2008). También los polifenoles inhiben la proliferación celular, al bloquear el ciclo celular en las fases G1 y G2, impidiendo así la formación de tumores. Además, modulan a la proteína fosforilada de retinoblastoma (pRb) y algunas vías de proliferación. Por otro lado, activan enzimas anti-

inflamatorias como la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y las proteínas de choque térmico Hsp-70/90 e impiden la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) los cuales suministran sangre a los tumores y también ayudan a bloquear a las proteínas β -catenina y claudina que tienen la función de adhesión de una célula con la otra (Donato *et al.*, 2012) (Figura 8).

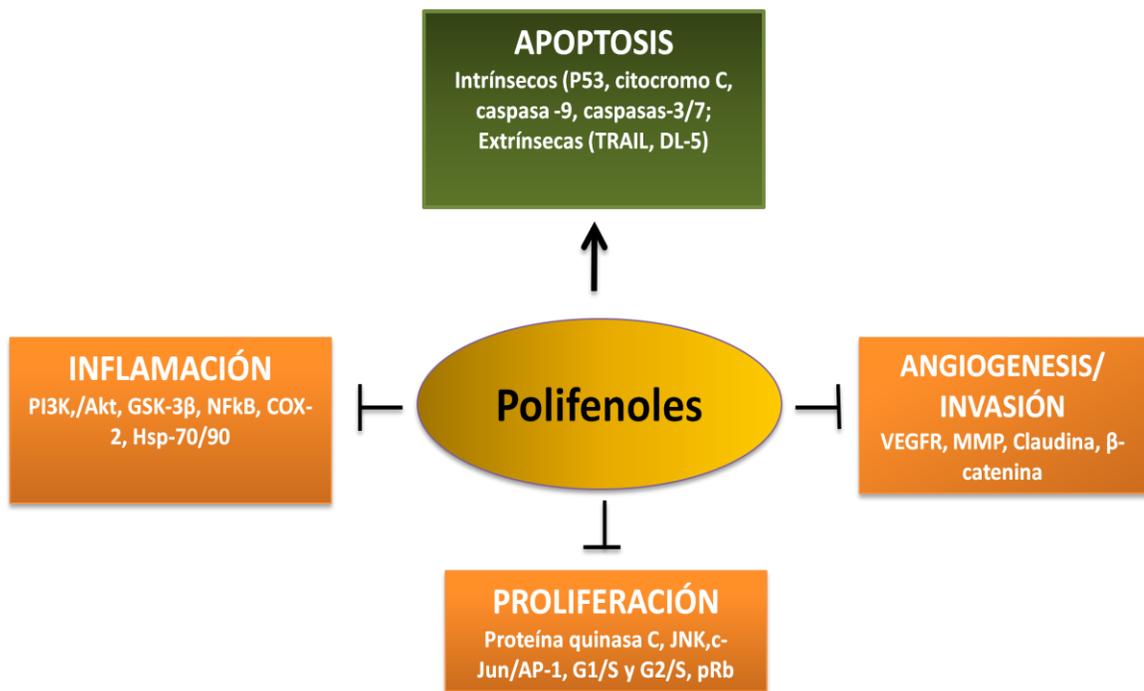


Figura 8. Mecanismos de acción de los polifenoles

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es un fenómeno caracterizado por cambios en los mecanismos de regulación del ciclo celular. Es la segunda causa de muerte a nivel mundial que cobra la vida de aproximadamente 7.6 millones de personas al año. El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los más diagnosticados, es un tumor maligno del epitelio del colon y recto; constituye un problema de salud pública ya que su incidencia aumenta con el estilo de vida sedentario, los malos hábitos alimenticios y la predisposición genética. Este tipo de cáncer es curable si se detecta en etapas iniciales, desafortunadamente la mayoría de los casos se diagnostican cuando existe metástasis en órganos adyacentes al colon, por lo que es fundamental la búsqueda de marcadores tumorales efectivos como las poliaminas para el diagnóstico oportuno. Los tratamientos para combatir el cáncer colorrectal consisten principalmente en cirugía, radioterapia y quimioterapia, los cuales son agresivos, presentan efectos colaterales y en etapas avanzadas tienen poca efectividad. Actualmente se estudian los extractos vegetales entre ellos, las hojas de camote (*Ipomoea batatas*) que contienen compuestos activos como los polifenoles, los cuales presentan actividad antioxidante, antitumoral y podrían reducir el riesgo del CCR.

III HIPÓTESIS

Los niveles de las poliaminas en orinas de ratones Balb/c con cáncer colorrectal son marcadores del efecto preventivo y antitumoral del extracto de hojas de *Ipomoea batatas* (camote dulce).

IV. OBJETIVOS

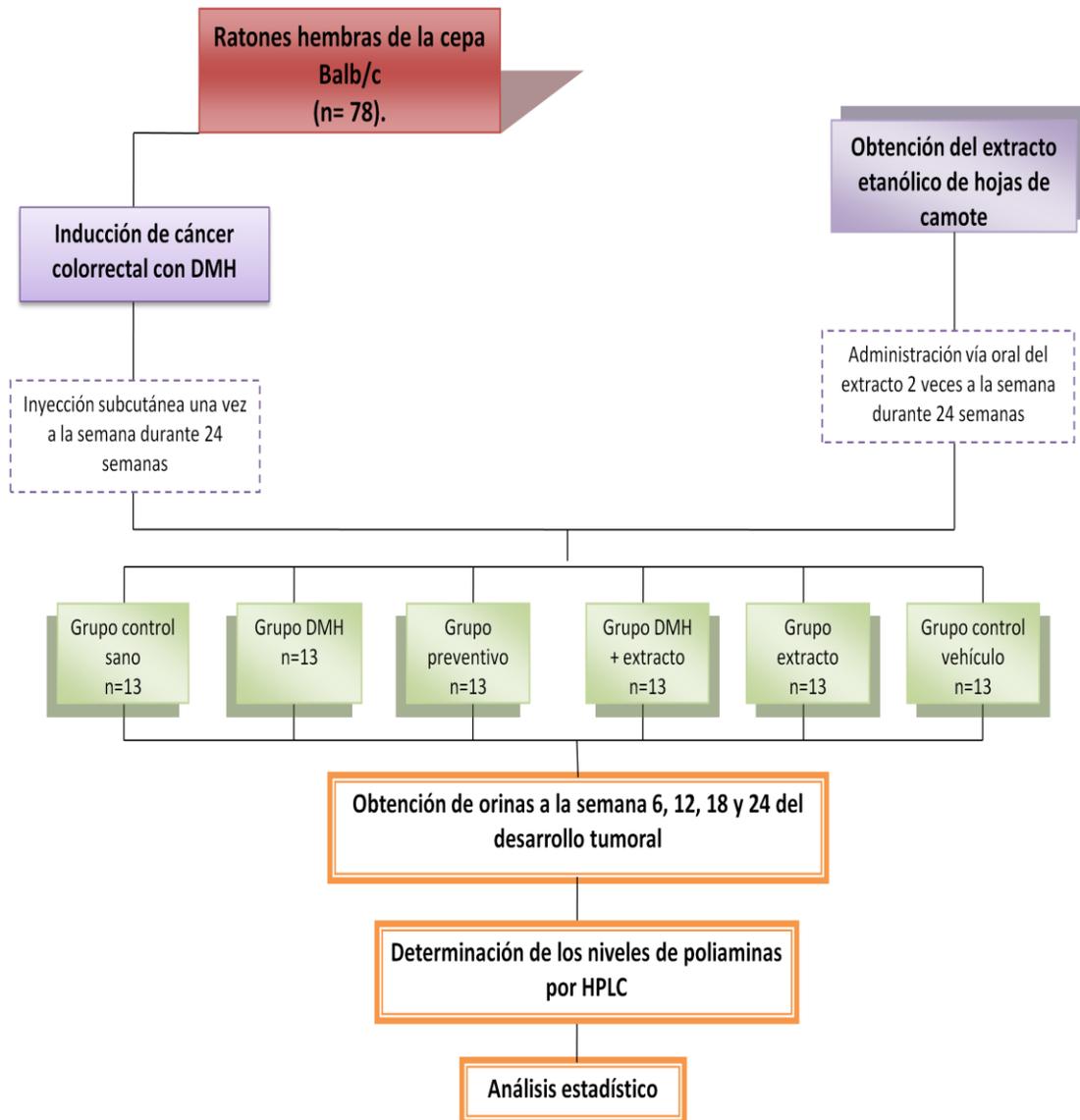
Objetivo General

Evaluar el efecto preventivo y antitumoral de *Ipomoea batatas* (camote dulce) a través de la determinación de los niveles de poliaminas en un modelo murino de cáncer colorrectal.

Objetivos Particulares

- Obtener el extracto etanólico de las hojas de *Ipomoea batatas*.
- Cuantificar los polifenoles presentes en el extracto de las hojas de *Ipomoea batatas* con la técnica de Folin-Ciocalteu.
- Inducir el cáncer de colon en ratones Balb/c con el carcinogénico 1,2 dimetihidracina (DMH).
- Obtener orina de los ratones Balb/c durante el desarrollo tumoral.
- Medir por HPLC los niveles de poliaminas en orina de ratones Balb/c durante el desarrollo tumoral.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL



VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención del Extracto Etanólico

Con la finalidad de obtener las hojas para la preparación del extracto etanólico, se cultivó la planta de camote en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). Una vez obtenidas 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 rotavapor 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.

Determinación de los Fenoles Totales

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. 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.

Administración del Extracto Etanólico de Hojas de Camote

El liofilizado del extracto vegetal se disolvió en solución salina de fosfato (PBS) y Tween 80 al 0.1% que se administró a los ratones Balb/c a una concentración de 200 mg/Kg de peso corporal. Se suministraron 100 μ L de la solución antes preparada, con una cánula por vía oral.

Inducción de Cáncer Colorrectal

En nuestro laboratorio previamente se estandarizó el modelo murino de CCR (Cazares, 2010). Este modelo consiste en la utilización de ratones de la cepa Balb/c, los cuales se inyectaron subcutáneamente en la parte ventral con el carcinógeno 1,2 dimetilhidracina (DMH, Sigma), el cual se preparó al momento de suministrarse en una relación de 20 mg/Kg de peso corporal y se disolvió en solución salina isotónica. La inducción se realizó una vez a la semana por un periodo de 24 semanas. El manejo del carcinógeno DMH se realizó con los debidos cuidados en campana de extracción (Figura 9).

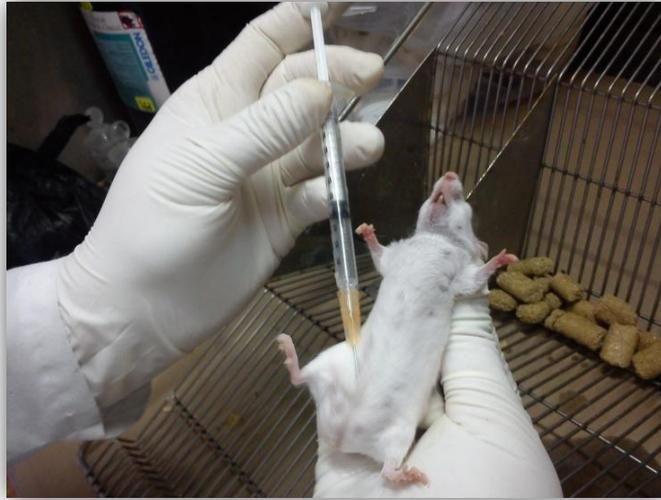


Figura 9. Inyección subcutánea del DMH para la inducción de cáncer colorrectal.

Animales de Experimentación

Se trabajó con ratones hembras de la cepa Balb/c de 23 ± 2 g de peso corporal, divididas en seis grupos experimentales con una $n=13$, en cajas de policarbonato en condiciones de bioterio, a temperatura de 22 a 24°C, humedad constante y fotoperiodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad. La alimentación fue en base a una dieta comercial (Purina) y el agua a consumo voluntario.

Grupos Experimentales

1. Grupo control sano: se les inyectó 200 μ L de solución salina subcutáneamente una vez a la semana durante 24 semanas.
2. Grupo DMH: el DMH se inyectó subcutáneamente (200 μ L) en la parte ventral del ratón una vez a la semana durante 24 semanas.

3. Grupo preventivo: se administró el extracto etanólico de hojas de camote dos veces a la semana vía oral 4 semanas antes de la primera inyección del carcinogénico DMH y se siguió administrando durante 24 semanas.

4. Grupo DMH y extracto: Se les administró el extracto etanólico de hojas de camote vía oral dos veces a la semana y el DMH subcutáneamente una vez a la semana, ambos fueron administrados durante 24 semanas.

5. Grupo extracto: se les suministró el extracto etanólico de hojas de camote vía oral dos veces a la semana durante 24 semanas.

6. Grupo control vehículo: Se les administró una solución de Tween 80 al 0.1% en Solución Salina de Fosfatos (PBS) durante 24 semanas.

Obtención de Orina de Ratón

La orina se obtuvo mediante la estimulación de los riñones de los ratones. Se tomaron muestras a las semanas 6, 12, 18 y 24 del desarrollo tumoral (figura 10). Las muestras se almacenaron en refrigeración a -20°C hasta su análisis por HPLC por duplicado y se procesaron tres muestras por grupo experimental por semana analizada.



Figura 10. Obtención de orina de los ratones experimentales.

Procesamiento de la Orina de los Ratones

Las muestras de orina se descongelaron a temperatura ambiente y se prepararon a una proporción 1:3, con una solución de TCA (ácido tricloacético) (5%) y HCl (0.05 N), con la finalidad de precipitar las proteínas. Se dejaron reposar por 20 min, se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 minutos, se recuperó el sobrenadante de cada muestra y se filtró (0.20 μm millex LG, Millipore).

Determinación de los Niveles de Poliaminas

Se analizaron las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para la separación de las moléculas se utilizó una columna (Eclipse Plus C18 de 4.6 x 150mm, 3.5 μm) y la derivatización post-columna con O-ftalaldehído (OPA) a través de una bomba de HPLC (Touzart Matignon), con un flujo de 1.6 mL/min. Se utilizó un

detector de fluorescencia (Shimadzu RF-530) con una lámpara de xenón de 75 Watts a una emisión de 455 nm y excitación de 345 nm. Para la determinación de la concentración de las poliaminas, se utilizó el programa Galaxie 1.5 (Varian), previamente se realizó una curva de calibración (0.0125 - 1mM) con estándares comerciales para cada una de las poliaminas (Sigma).

Sistema de Elución

La separación de las poliaminas, se realizó con base al reporte de Farkas y Hajós (1998) con algunas modificaciones en particular en la estandarización de los tiempos de elución de los amortiguadores (Cuadro 2). Se utilizó una bomba (Waters) a un flujo de 0.5 mL/min. El amortiguador A se preparó con acetato de sodio 0.1 M (J.T Baker), octano sulfonato 10 mM (Caledon) y agua Mili-Q, se homogenizó y se ajustó a pH 4.5 con ácido acético y por último se filtró con membrana de 0.45 μ m (Millipore). El amortiguador B se preparó con acetato de sodio 0.2 M, octano sulfonato 10 mM y acetonitrilo (380mL/1000mL), se homogenizó y se ajustó a pH 4.5 con ácido acético, por último se filtró con membrana de 0.45 μ m (Millipore). Con los amortiguadores A y B se preparan los amortiguadores AB, que contiene 60% del amortiguador A y 40% del B, y el BA que contiene 40% del A y 60% del B.

Cuadro 2. Programa de elución de las poliaminas por HPLC con el gradiente de los amortiguadores A y B.

Operación	Elución (tiempo en minutos)	Amortiguador A%	Amortiguador B%
Equilibrio	0	100	0
Periodo de elución	12.5	100	0
	1.6	0	100
	9	60	40
	6	40	60
	31	0	100
Regreso al equilibrio	15	100	0

Preparación de O-ftalaldehido (OPA)

La preparación del OPA se realizó con ácido bórico 0.4 M (Fermont), se ajustó el pH a 10.4 con KOH. Por otro lado se disolvió 800 mg de OPA en 10 mL de etanol y se agregó a la solución antes preparada, posteriormente en campana de extracción, se colocó 3 mL de brij-35 (Sigma) al 30% (previamente en baño maría) y 2 mL de 2-mercaptoetanol (Sigma) y por último se agitó lentamente. Todo lo anterior se aforó a 1L.

Análisis Estadístico

El análisis se realizó con el paquete estadístico SPSS (versión 17.0), los resultados se expresaron en medias \pm desviación estándar y se llevo a cabo un análisis de ANOVA de una vía y post-hoc de DUNCAN con un nivel de significancia $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

Cultivo de camote (*Ipomoea batatas*)

La planta fue clasificada taxonómicamente por el M. en C. Gregorio Nieves Hernández del Laboratorio de Etnobotánica, Departamento de Botánica y Zoología de la Universidad de Guadalajara (Figura 11).



Figura 11. Cultivo de camote dulce (*Ipomoea batatas*) en las instalaciones del CUCBA.

Determinación de fenoles totales

Los fenoles totales se determinaron mediante la técnica de Folin-Ciocalteu (Pochapski *et al.*, 2011). La curva de calibración con el ácido gálico mostró una $r=0.95$ (Figura 12). Con base en la curva estándar y las diluciones seriadas del extracto de las hojas de camote, el contenido de los fenoles totales en el extracto etanólico fue de 2,720 mg/100 g.

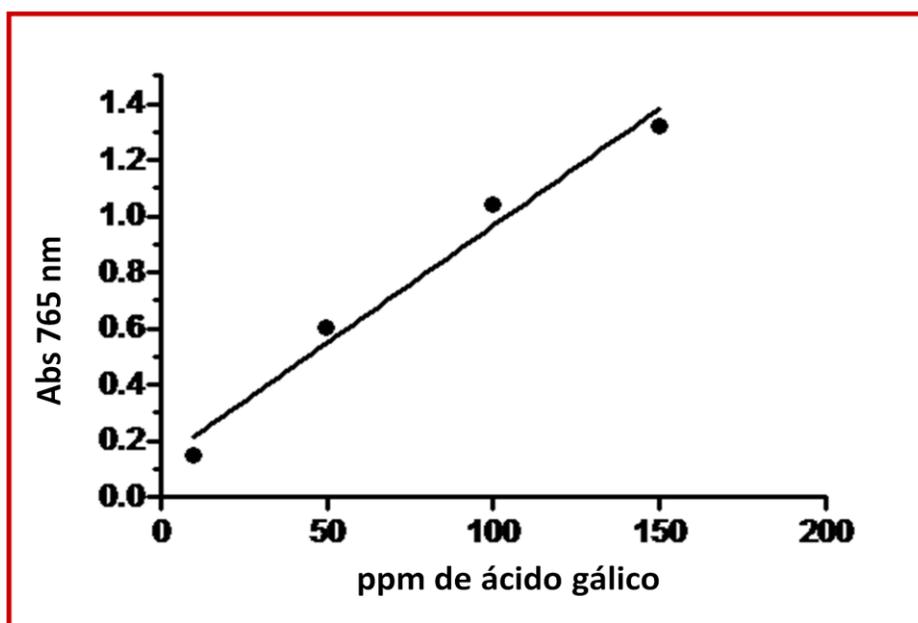


Figura 12. Curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.

Determinación de las poliaminas por HPLC

Para la cuantificación de las poliaminas, fue necesario establecer los tiempos de retención de los estándares comerciales de putrescina, espermidina y espermina, así como de 1,7-diaminoheptano (DAH) utilizado como control interno. El tiempo de retención de la putrescina fue de 32 min, del DAH a los 35 min, la espermidina a 37 min, y por último la espermina a 41 min como se observa en la figura 13.

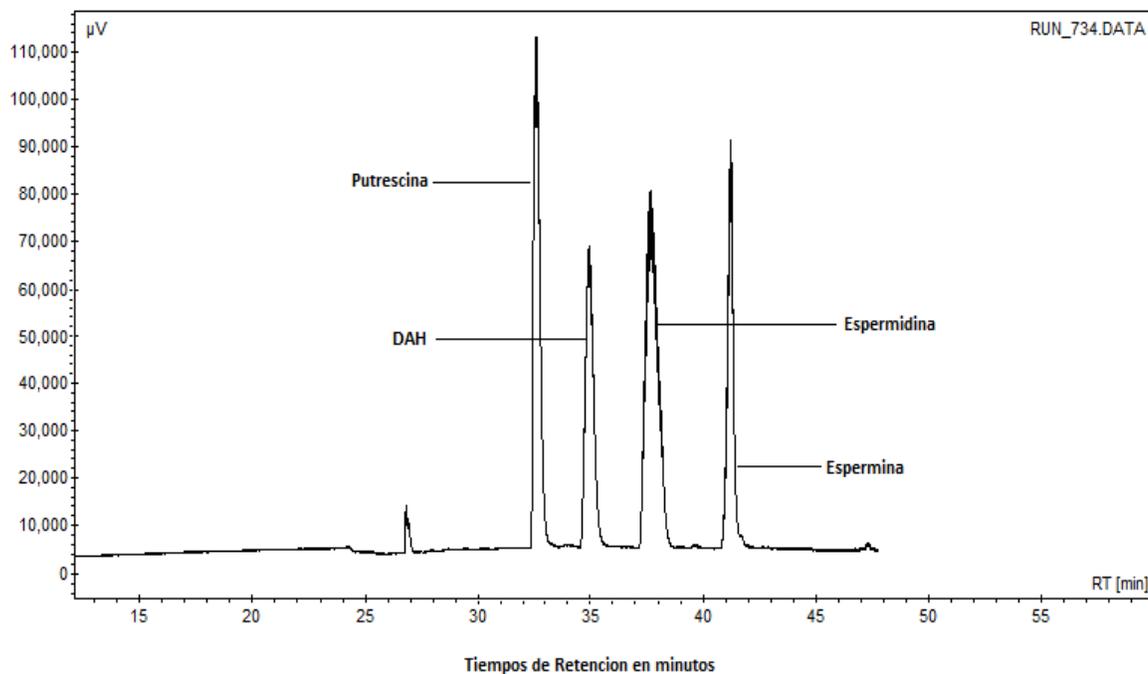


Figura 13. Cromatograma representativo de la separación de los estándares de putrescina, DAH, espermidina y espermina.

Una vez establecidos los tiempos de retención para cada poliamina se realizó la curva estándar para la determinación de la concentración de cada una. Se realizó una curva para putrescina (Figura 14), espermidina (Figura 15) y espermina (Figura 16) obteniendo una $r=0.99$ de cada poliamina.

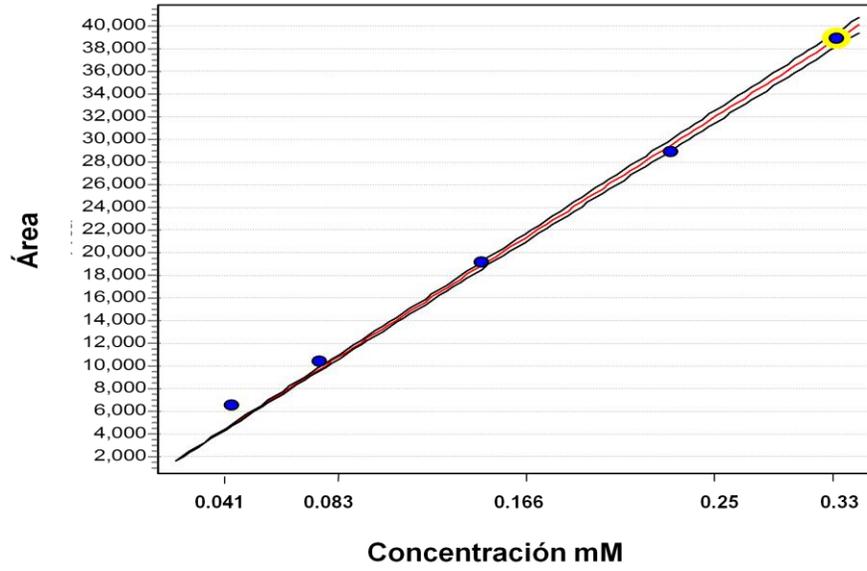


Figura 14. Curva estándar de la putrescina.

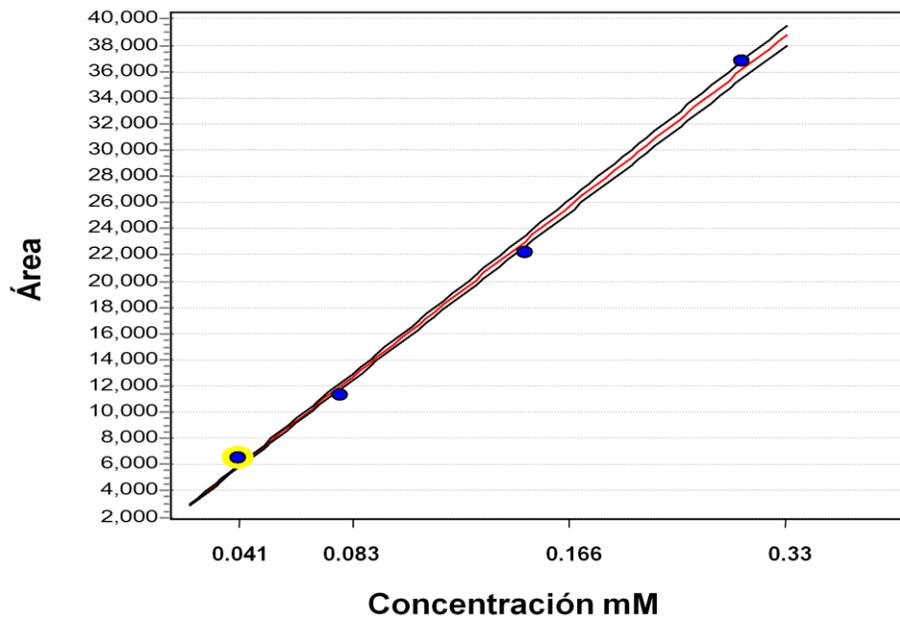


Figura 15. Curva estándar de la espermidina.

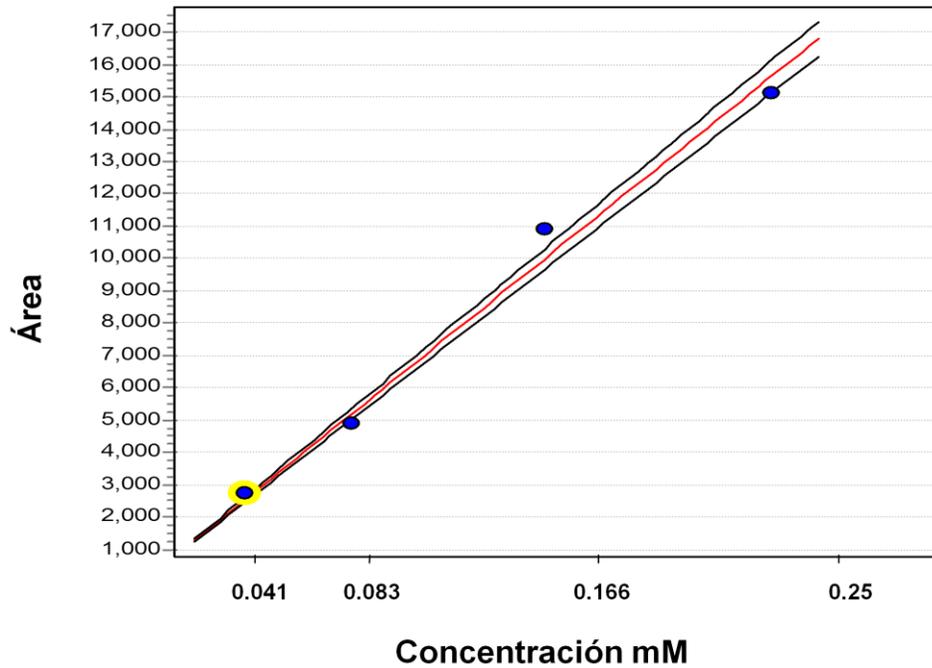


Figura 16. Curva estándar de la espermina.

Una vez establecidas las condiciones experimentales, se determinaron las concentraciones de cada una de las poliaminas en orina de los ratones. Cabe mencionar que no se logró la detección de espermidina en las muestras biológicas.

Cuantificación de los Niveles de Putrescina

Semana 6:

El grupo 1 presentó niveles de putrescina de 0.146 nm/μL, el grupo 4 de 0.169 nm/μL y el grupo 5 de 0.138 nm/μL, no se encontraron diferencias significativas entre estos grupos. En los grupos 2, 3 y 6 los niveles de putrescina fueron de 0.292 nm/μL, 0.260 nm/μL y 0.283 nm/μL respectivamente, no se encontraron diferencias significativas entre estos grupos. Sin embargo si hubo diferencias significativas entre los primeros grupos mencionados y los anteriores (Figura 17).

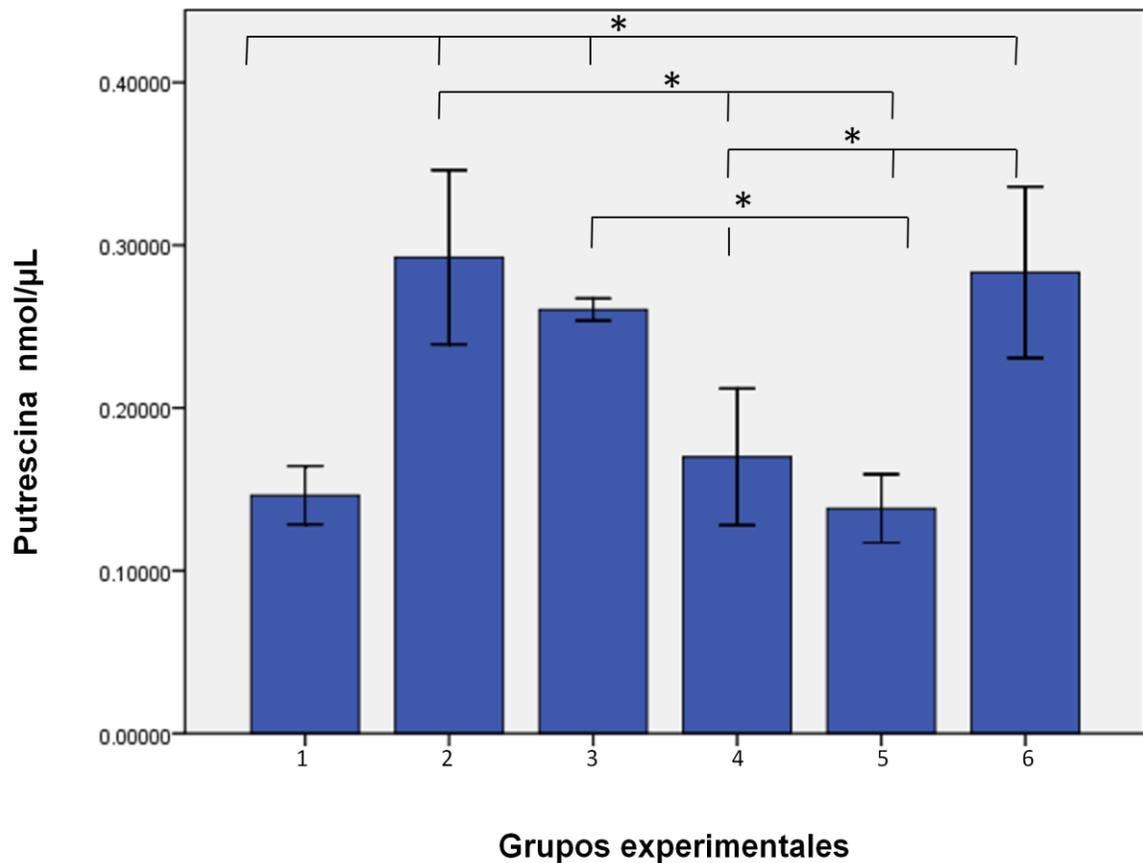


Figura 17. Niveles de Putrescina en orina de los ratones Balb/c de los diferentes grupos experimentales a la semana 6 de experimentación (* p<0.05).

Semana 12:

En el grupo 1 los niveles de putrescina fueron de 0.173 nm/μL y en grupo 2 de 0.245 nm/μL con diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. Entre los grupos 3 (0.166 nm/μL) y 6 (0.137 nm/μL) no se encontraron diferencias estadísticas significativas comparados con el grupo 1. El grupo 5 (0.203 nm/μL) no presentó diferencias significativas con ningún otro grupo (Figura 18).

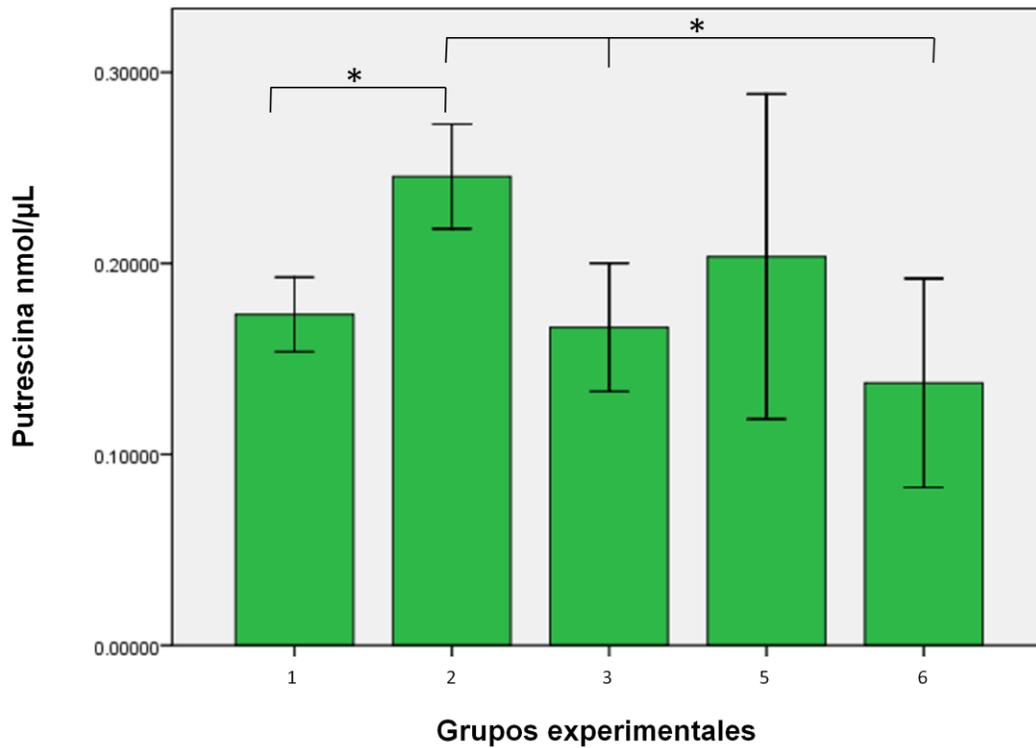


Figura 18. Niveles de Putrescina en orina de los ratones Balb/c de los diferentes grupos experimentales a la semana 12 de experimentación (* p<0.05).

Semana 18:

El grupo 1 presentó niveles de putrescina de 0.085 nm/μL se encontraron diferencias significativas al compararlo con los grupos 2, 3 y 4 con niveles de 0.176 nm/μL, 0.158 nm/μL y 0.226 nm/μL respectivamente; a su vez el grupo 4 presentó diferencias significativas con los grupos 5 y 6 con niveles de 0.116 nm/μL en ambos grupos (Figura 19).

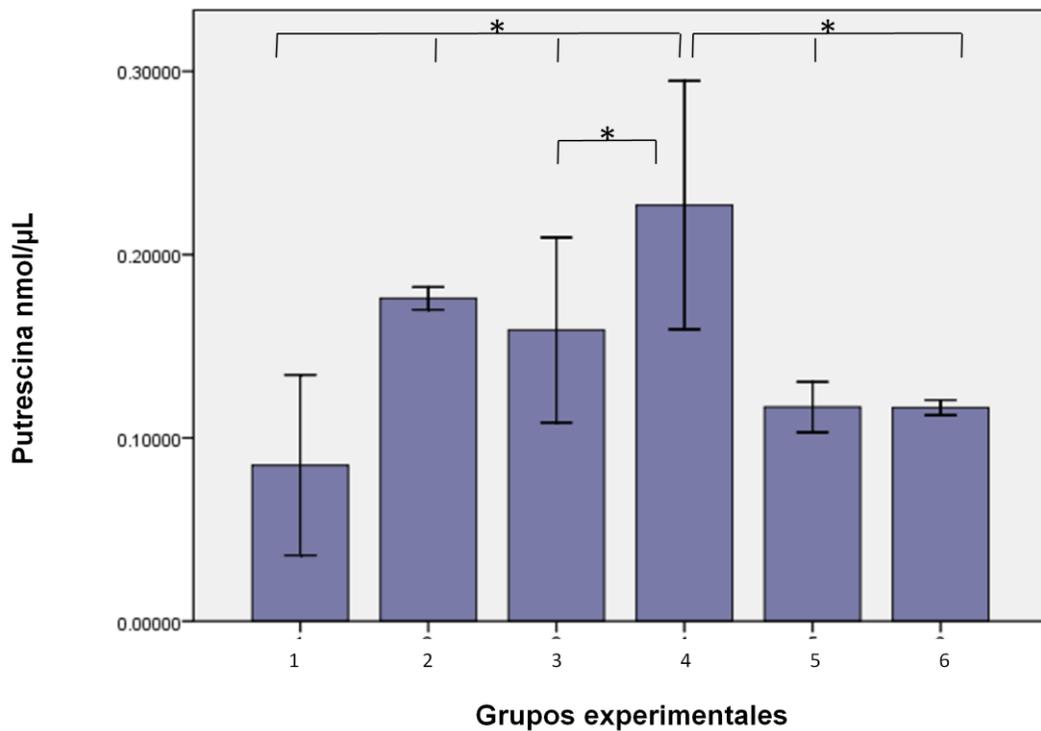


Figura 19. Niveles de Putrescina en orina de los ratones Balb/c de los diferentes grupos experimentales a la semana 18 de experimentación (* p<0.05).

Semana 24:

Los niveles de putrescina en el grupo 2 fueron de 0.227 nm/μL, con diferencias significativas comparado con los grupos 1 (0.133 nm/μL), 3 (0.099 nm/μL) y 6 (0.111 nm/μL). En el grupo 4 los niveles de putrescina fueron de 0.205 nm/μL presentando diferencias significativas con los grupos 1, 3 y 6 (Figura 20).

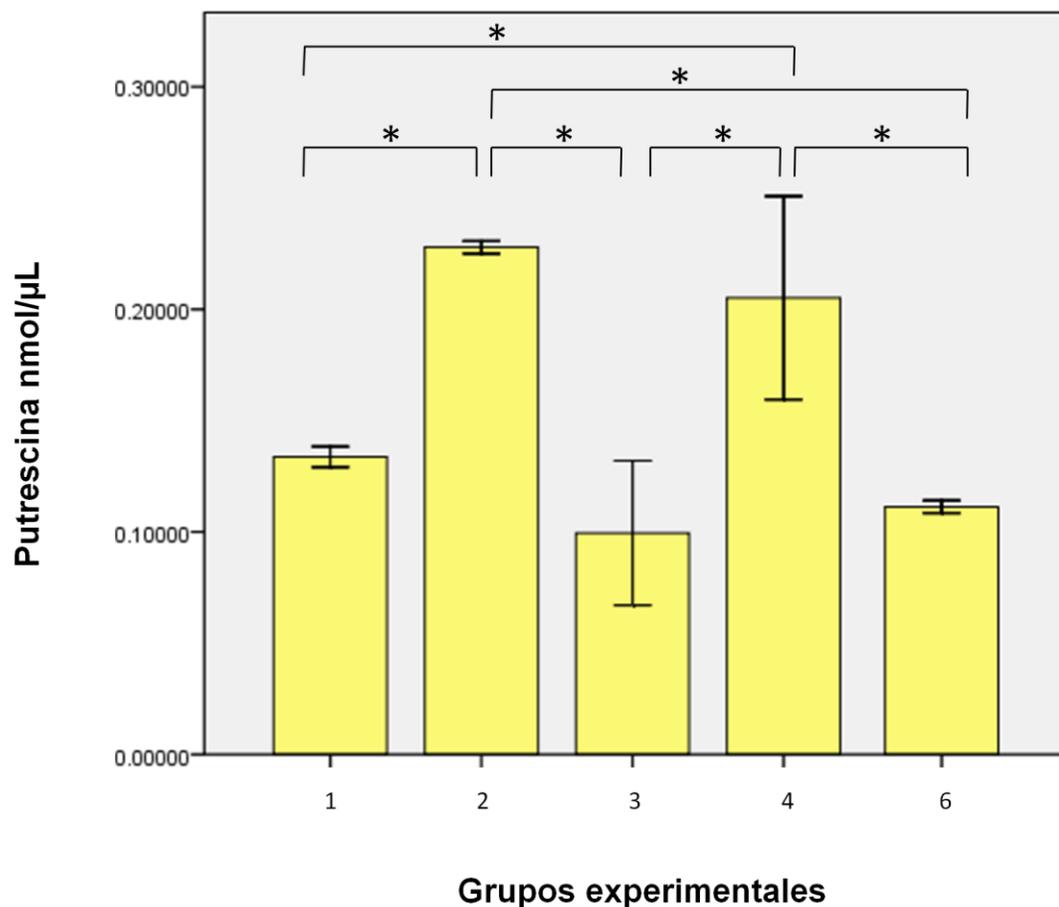


Figura 20. Niveles de Putrescina en orina de los ratones Balb/c de los diferentes grupos experimentales a la semana 24 de experimentación (* p<0.05).

Determinación de los Niveles de la Espermina

Semana 6:

Al comparar los niveles de espermina en los grupos 1 (0.141 nm/μL), grupo 2 (0.171 nm/μL), grupo 4 (0.121 nm/μL) y el grupo 5 (0.129 nm/μL), no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, entre los grupos 3 (0.246 nm/μL) y grupo 6 (0.234 nm/μL) sí hubo diferencias significativas (Figura 21).

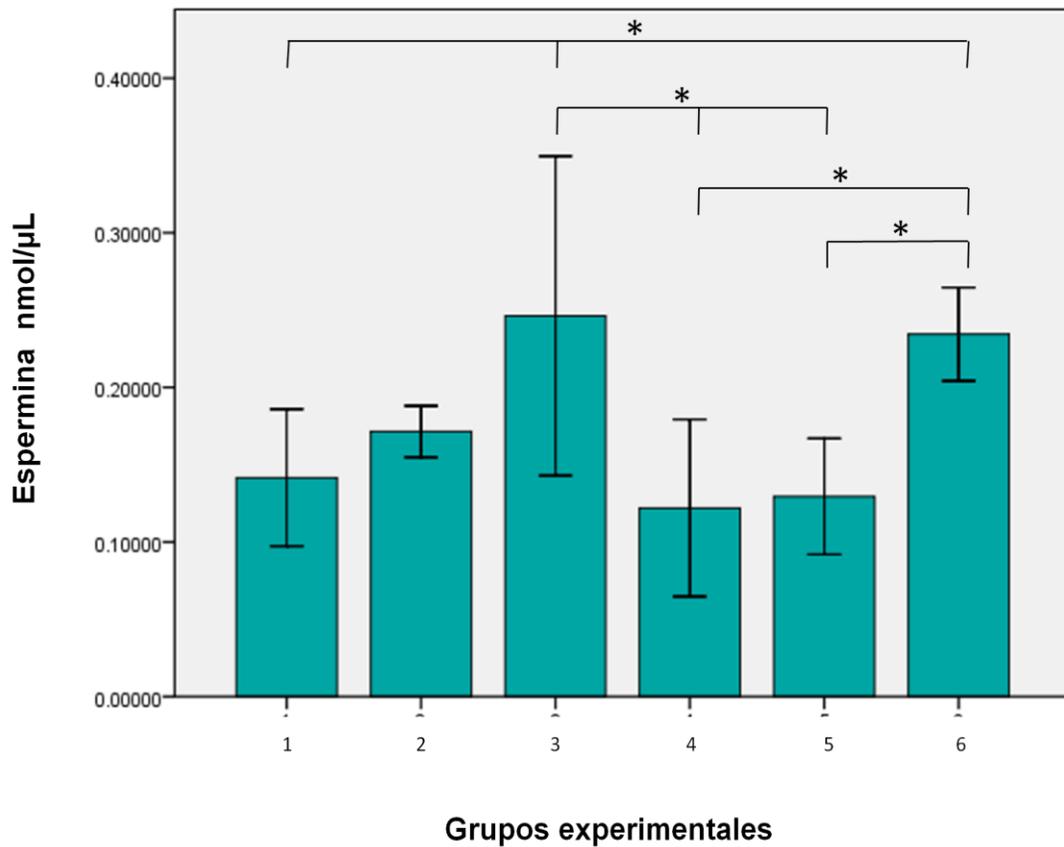


Figura 21. Niveles de Espermina en orina de los ratones Balb/c de los diferentes grupos experimentales a la semana 6 de experimentación (* $p < 0.05$).

Semana 12:

En esta semana en el grupo 1 los niveles de espermina fueron de 0.153 nm/ μ L, y en los grupos 2, 3, 5 y 6 fueron de 0.213 nm/ μ L, 0.199 nm/ μ L, 0.209 nm/ μ L y 0.191 nm/ μ L respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 22).

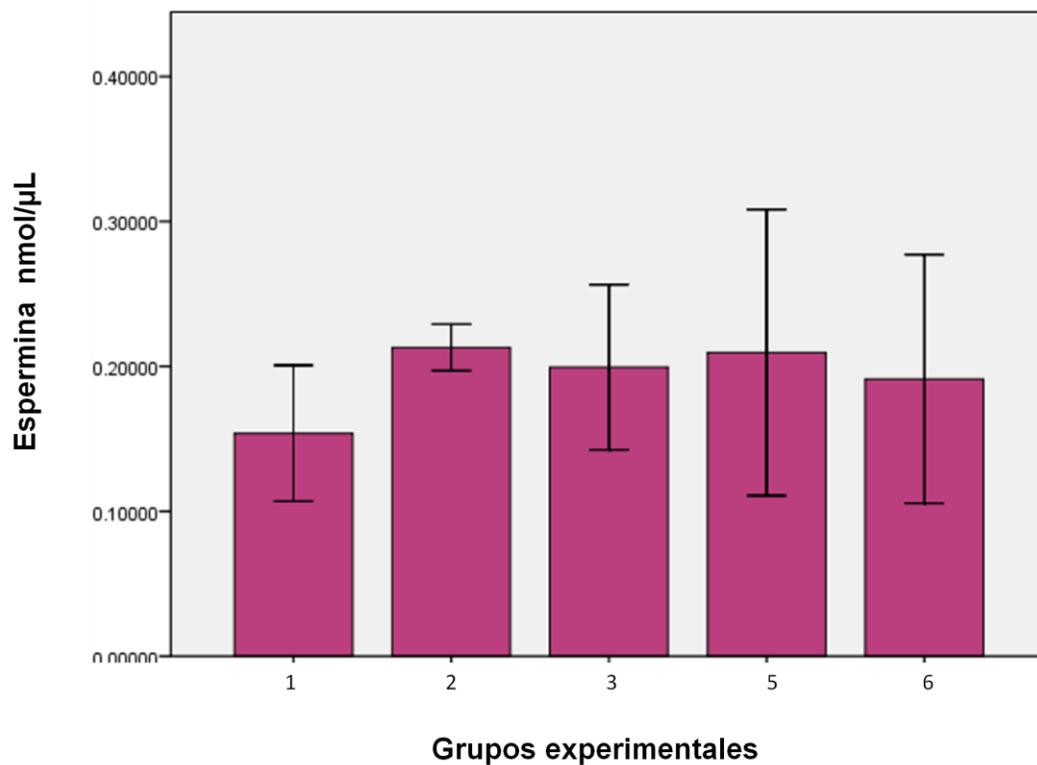


Figura 22. Niveles de Espermina en orina de los ratones Balb/c de los diferentes grupos experimentales a la semana 12 de experimentación (* $p < 0.05$).

Semana 18:

Los niveles de la espermina fueron los siguientes: grupo 1 (0.174 nm/ μ L), grupo 2 (0.152 nm/ μ L), grupo 3 (0.211 nm/ μ L), 4 (0.217 nm/ μ L), grupo 5 (0.220 nm/ μ L) y en el grupo 6 (0.224 nm/ μ L). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 23).

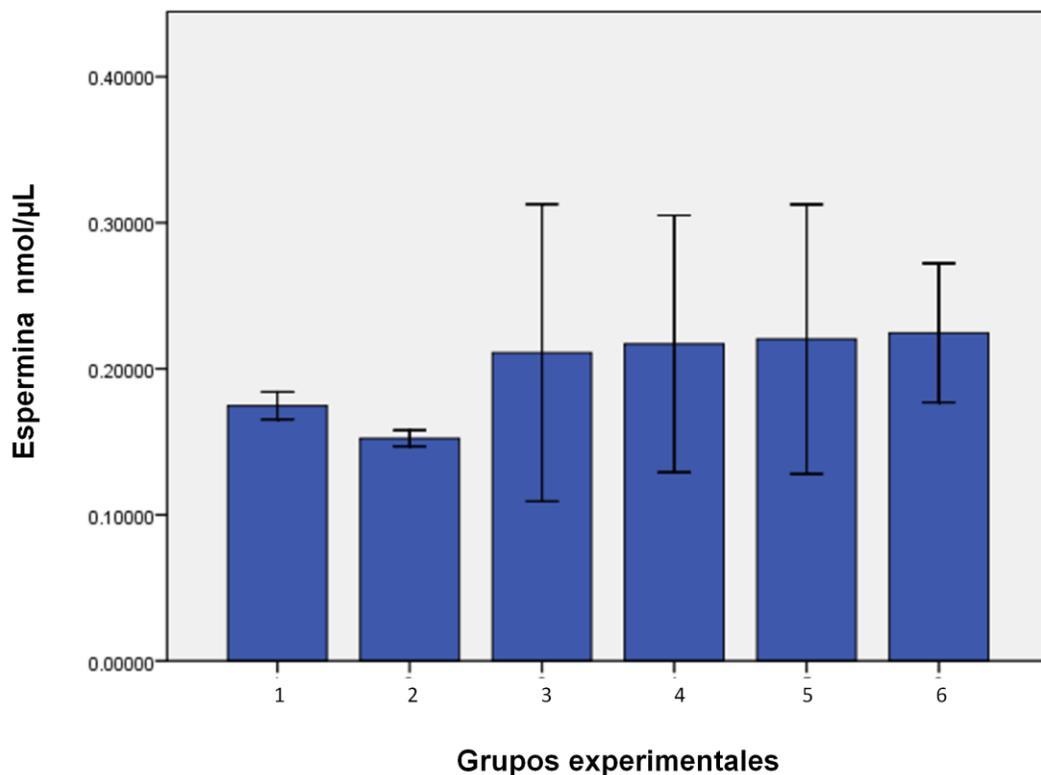


Figura 23. Niveles de Espermina en orina de los ratones Balb/c de los diferentes grupos experimentales a la semana 18 de experimentación (* $p < 0.05$).

Semana 24:

Los niveles de la espermina en el grupo 1 fueron de 0.189 nm/μL, en el grupo 3 de 0.155 nm/μL y en el grupo 5 de 0.180 nm/μL, estos grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, mientras que los niveles en el grupo 2 fueron de 0.370 nm/μL y presentaron diferencia estadísticamente significativas cuando se compararon con los grupos antes mencionados (Figura 24).

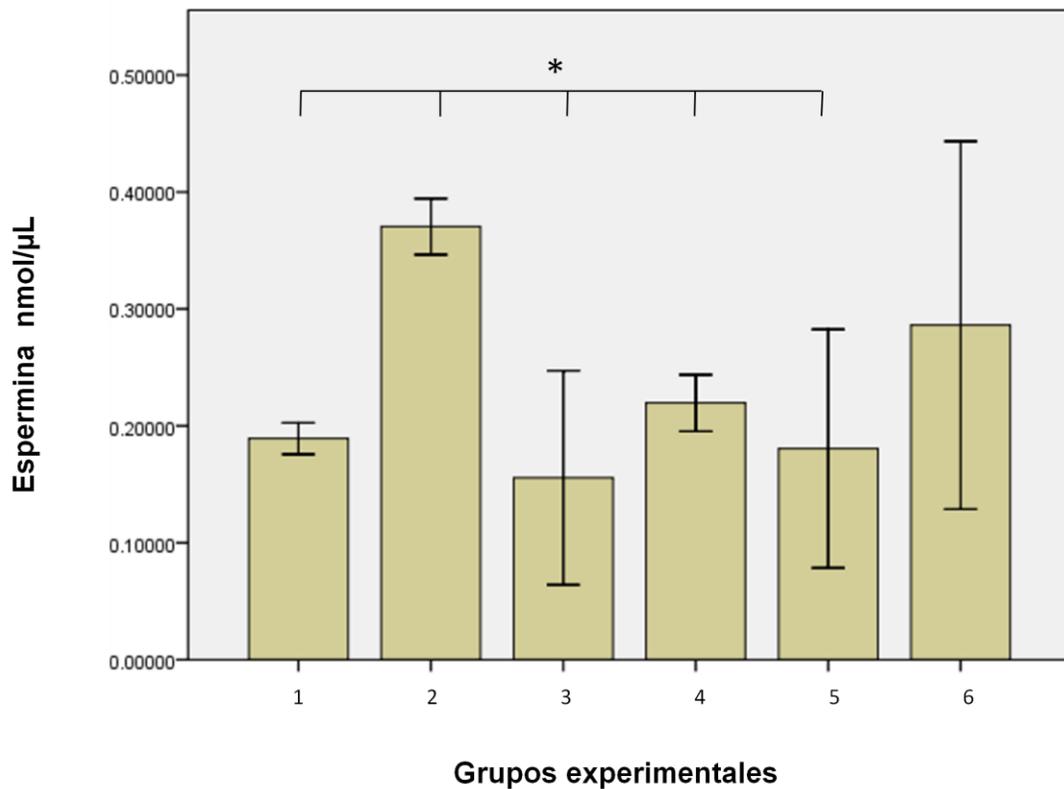


Figura 24. Niveles de Espermina en orina de los ratones Balb/c de los diferentes grupos experimentales a la semana 24 de experimentación (* p<0.05).

VIII. DISCUSIÓN

El CCR es un problema de salud pública, sin embargo, los tratamientos actuales no son 100% efectivos, además presentan una alta toxicidad para el organismo y afectan la calidad de vida del paciente, por lo que la investigación actualmente se enfoca en la búsqueda de nuevos tratamientos de origen natural con moléculas activas provenientes de extractos vegetales. Entre los compuestos activos con mayor énfasis se encuentran los polifenoles, los cuales tienen diversos mecanismos de acción para la prevención o tratamiento del CCR (Quideau *et al.*, 2011). En el presente trabajo se evaluó el efecto antitumoral del extracto etanólico de hojas de camote (*Ipomoea batatas*), a través de la determinación de los niveles de las poliaminas como moléculas biomarcadoras del CCR.

Para esto se obtuvo un extracto etanólico de las hojas de camote y se evaluó su contenido de fenoles totales. El extracto presentó una concentración de 2,702 mg/100 g. Este valor es superior a los reportados por Troung *et al.* en 2007 (1,249 mg/100 g) y por Pochapski *et al.* en 2011 (662.02 mg/100 g) en hojas de camote. Sin embargo, estos autores utilizaron protocolos de extracción diferentes al propuesto en el presente trabajo como el uso de metanol y el tiempo de reposo con las hojas, por lo que es posible que la diferencia en el contenido de fenoles en el extracto vegetal dependa del protocolo de extracción. Se conoce que los fenoles se encuentran en cualquier parte de la planta; Rumbaoa *et al.* (2009) reportaron que el contenido de fenoles en el tubérculo de camote es de 193 a 1,159 mg/100g, mientras que Troung *et al.* (2007) reportan concentraciones de 57 a 80 mg/100 g, en tubérculo fresco y de 50 a 90 mg/100g en tubérculo cocido. En la cáscara del tubérculo, estos autores reportan valores bajos de 145 a 182 mg/100g, así la mayor concentración de estos compuestos se presenta en las hojas (Ramos *et al.*, 2011).

La dosis de extracto vegetal utilizada en el presente estudio fue de 200 mg/Kg de peso corporal, semanal, vía oral y se determinó con base en la literatura (Karna *et al.*, 2011). Cabe mencionar que en un estudio preliminar administramos dosis crecientes del extracto de 500– 2000 mg/Kg de peso corporal (datos no mostrados) sin observar efectos adversos o mortalidad de los ratones a las 96 horas, lo que indica que el extracto no presentó toxicidad aparente. Karna *et al.* (2011) no observaron daño histológico a intestino, hígado, bazo, pulmón, testículo y médula ósea de ratones con cáncer de próstata tratados con un extracto similar por 6 semanas, sugiriendo que el extracto de camote no afecta al tejido normal.

El CCR es curable si se detecta en etapas iniciales y es fundamental la búsqueda de moléculas biomarcadoras como las poliaminas ya que están implicadas en la proliferación celular descontrolada (Ignatenko *et al.*, 2011). Con la finalidad de investigar el efecto antitumoral del extracto de las hojas de camote se evaluaron los niveles de las poliaminas en orina de ratones Balb/c tratados con el carcinógeno DMH. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que en ratones Balb/c las inyecciones semanales subcutáneas de DMH (20 mg/Kg de peso) por 24 semanas provocan la formación de lesiones pre-neoplásicas, a partir de la semana 7 del desarrollo tumoral (atipias regenerativas con inflamación crónica) y a la semana 24 presentan un número elevado de lesiones y alteraciones en la estructura histológica del colon distal como son las displasias multifocales y la inflamación crónica exacerbada (Cazares, 2010).

En el presente trabajo se encontraron niveles elevados de putrescina en ratones tratados con DMH en comparación con ratones sanos, en las semanas 6, 12, 18 y 24. Estos datos muestran que el carcinógeno DMH induce el desarrollo del CCR y afecta al metabolismo de las poliaminas. Por

lo que se propone a la putrescina como una molécula biomarcadora del desarrollo temprano del CCR. Este resultado coincide con Reynoso *et al.* (2008) quienes reportaron un incremento en los niveles de la putrescina urinaria en un modelo murino con linfoma L5178Y. De la misma manera Liu *et al.* (2011) reportaron que la poliamina más abundante en orina de pacientes con cáncer es la putrescina.

Se observó que a la semana 6 los niveles de putrescina disminuyeron en el grupo DMH y extracto a la par (grupo 4) y en el preventivo (grupo 3) en comparación con el grupo DMH (grupo 2) lo que indica que en etapa temprana del desarrollo tumoral la administración del extracto es eficaz para mantener los niveles de esta poliamina. La administración del extracto solo (grupo 5) no afectó los niveles de putrescina durante toda la fase experimental.

Es importante destacar que a la semana 24 de desarrollo tumoral los niveles de putrescina en el grupo tratado preventivamente con el extracto vegetal (grupo 3) disminuyeron en comparación con el grupo tratado con el carcinógeno (grupo 2) y estos niveles fueron similares a los del grupo control sano (grupo 1). Sin embargo, cuando el extracto se administró a la par con el carcinógeno (grupos 4) este efecto no fue tan marcado, por lo que se sugiere que el extracto vegetal presenta mayor efecto protector contra el CCR cuando se administra de manera preventiva. Por lo que nuestros resultados concuerdan con los reportados por Baffoni *et al.* (2011) que mencionan que una estrategia eficaz contra el desarrollo del CCR es la prevención.

Por otro lado se observó que a la semana 24 los tratamientos con el extracto vegetal tanto preventivo como a la par (grupos 3 y 4) fueron capaces de

disminuir los niveles de espermina en comparación con el grupo DMH (grupo 2), lo que significa que el extracto probablemente es capaz de inhibir la proliferación celular y mantener a niveles basales la concentración de esta poliamina. Se sugiere a la espermina como un marcador tardío del CCR útil para estudiar el efecto antitumoral del extracto etanólico de las hojas de camote.

IX. CONCLUSIONES

Los niveles de putrescina en orina de ratones Balb/c aumentan a partir de la semana 6 de inducción de CCR con DMH, por lo que es una molécula biomarcadora temprana del CCR.

Los niveles de espermina aumentan a la semana 24 de inducción de CCR con DMH, por lo que es una molécula biomarcadora del CCR en fase tardía.

Los niveles tanto de la putrescina como de la espermina sugieren que el extracto etanólico de las hojas de camote es menos efectivo si se administra a la par con el carcinógeno.

Los niveles de putrescina disminuyen significativamente a la semana 24 en el grupo preventivo lo que indica, que el extracto etanólico de hojas de camote presenta una actividad antitumoral por lo que se recomienda su utilización preventivamente.

X. GLOSARIO

Adenocarcinoma: tumor canceroso que aparece en las células glandulares que revisten algunos órganos internos.

Adenoma: Tumor de estructura semejante a la de las glándulas.

Aglicona: Es el compuesto sin azúcares que queda tras reemplazar por un átomo de hidrógeno el grupo glicosil de un glucósido.

Aminas: Compuestos químicos orgánicos que se consideran como derivados del amoníaco y resultan de la sustitución de los hidrógenos de la molécula por los radicales alquilo. Según se sustituyan uno, dos o tres hidrógenos, las aminas serán primarios, secundarios o terciarios, respectivamente.

Biogenico: Proceso que forma parte de los organismos vivos y es necesario e indispensable para su desarrollo.

Biomolécula: Molécula constituyente de los seres vivos; está compuestas mayormente de carbono, hidrógeno, oxígeno o nitrógeno.

Biosíntesis: Proceso celular mediante el cual los organismos vivos elaboran sustancias químicas complejas a partir de otras más sencillas, con el consecuente gasto de energía metabólica.

Carcinogénesis: Es el proceso por el cual una célula normal se convierte en una célula cancerosa.

Carcinogénico: Agente químico, físico o biológico capaz de transformar un tejido normal a uno canceroso.

Célula cancerosa: Célula con cambios o mutación en el DNA incapaz de realizar sus funciones normales.

Compuestos bioactivos: Tipo de sustancias químicas que se encuentran en pequeñas cantidades en las plantas o ciertos alimentos (frutas, verduras, aceites y granos), cumplen funciones en el cuerpo que pueden promover la salud.

Ésteres: Son compuestos orgánicos derivados de ácidos orgánicos o inorgánicos oxigenados en los cuales uno o más protones son sustituidos por grupos orgánicos alquilo.

Glucósido: molécula compuesta por un glúcido (molécula encargada de la energía) y un compuesto no glucídico.

Metástasis: Propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició; ocurre generalmente por vía sanguínea o linfática.

Monómero: Compuesto de bajo peso molecular cuyas moléculas son capaces de reaccionar entre sí o con otras para dar lugar a un polímero.

Neoplasia: Formación patológica de un tejido cuyos componentes sustituyen a los de los tejidos normales.

Polímeros: Macromoléculas generalmente orgánicas formadas por moléculas más pequeñas llamadas monómeros.

Pólipo: crecimiento que sobresale de una membrana mucosa.

Proliferar: Multiplicarse abundantemente.

Proteosoma: Complejo macromolecular cuya función es la degradación de proteínas.

Sedentario: Se dice de la persona o animal que se establece a vivir de manera permanente en un sitio.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro I, Ocaña T, Castells A, Cordero C, Ponce M, Ramón Y, Cajal T, Andreu M, Bujanda L, Herráiz M, Hervás A, Fernández F, Riestra S, Gargallo C, Ruiz A, Bustamante M, Blanco I, Martínez F. Characteristics of patients with familial adenomatous polyposis in Spain. First results of the Spanish Registry of Familial Adenomatous Polyposis. *Med clin Barcelona*. 2010;135(3);103-108.
- Algranati I D, Serra M P, Carrillo C, González N S. Biología molecular del metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos. Expresión de genes heterólogos de ornitina y arginina descarboxilasa en *Trypanosoma cruzi*. *Química viva*. 2006;2(5);76-82.
- Babbar N, Gerner E. Targeting Polyamines and Inflammation for Cancer Prevention. *Recent Results in Cancer Research*. 2011;188:49-64.
- Baffoni L, Gaggia F, Di Gioia D, Biavati B. Role of intestinal microbiota in colon cancer prevention. *Ann Microbiol*. 2011;62;15-30.
- Bucal C A. Marcadores tumorales de cáncer de colon. *Rev Asoc Coloproct del Sur*. 2007;2(2);90-113.
- Calderillo G, Ruiz J, Moreno J, Trejo G, Padilla A. Manual de Oncología Procedimientos Médicos Quirúrgicos. Cáncer colorrectal. Capítulo 45. 2010;595-611.
- Campos L, García A. Fisiopatología y patogenia del cáncer colorrectal. Capítulo 1. 2010;1-17
- Cazares A. Estandarización de un modelo experimental de cáncer de colon en ratones Balb/c inducidos con 1,2-dimetilhidracina. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Departamento de Biología Celular y Molecular. Tesis de licenciatura en Biología. 2010

-
- D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B y Masella R. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11;1321-1342.
- D'Archivio M, Santangelo C, Scazzocchio B, Vari R, Filesi C, Masella R y Giovannini C. Modulatory Effects of Polyphenols on Apoptosis Induction: Relevance for Cancer Prevention. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008;9;213-228.
- Donato F, Romagnolo P, Ornella I, Selmin P. Flavonoids and Cancer Prevention: A Review of the Evidence. *Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics*. 2012;31;206-238.
- Dong J Y, Qin L Q. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;125(2):315–23.
- Farkas S , Hajós D . Monitoring of Biologically Active Amines in Cereals and Cereal Based Food Products by HPLC. *Chromatographia*. 1998;48(1/2);37-42.
- Galiano M. Cáncer colorrectal (CCR). *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2005;20(1);43-52.
- Gamble D,Hogarty M, Liu X, Ziegler D, Marshall G, Norris M, Haber M. Polyamine pathway inhibition as a novel therapeutic approach to treating neuroblastoma. *Frontiers in oncology*. 2012;2(162);1-3.
- Gómez G, Ros B, Bernal C, Pérez C, Periago C. Papel de las poliaminas en la alimentación. Importancia de las poliaminas en la alimentación infantil. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2008;58 (2);117-119.
- Gosetti F, Mazzucco E, Gennaro M y Marengo G. Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chemical*. 2012;405(2/3);907-916.

-
- Granado A. Estudio de los mecanismos de acción molecular de polifenoles de la dieta en cultivos celulares y animales de experimentación. Tesis de doctorado. Facultad de ciencias biológicas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Madrid. 2010;15-16.
- Granados G, y Herrera G. Manual de oncología. McGraw-Hill capitulo 45 cáncer colorectal. 2010;595-611.
- Hanahan D y Weinberg R. Hallmarks of cáncer: the next generation. Cell. 2011;144(5);646-674
- Howard R A, Freedman D M, Park Y, Hollenbeck A, Schatzkin A and Leitzmann M F. "Physical activity, sedentary behavior, and the risk of colon and rectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study." Cancer Causes and Control. 2008;19(9);939-953.
- Ignatenko N A, Gerner E W, Besselsen D G. Defining the role of polyamines in colon carcinogenesis using mouse models. Journal Carcinogenesis. 2011;10(10).
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Mortalidad de 1990-2011. Datos consultados en marzo 2013. http://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/Proyectos/bd/continuas/mortalidad/MortalidadGeneral.asp?s=est&c=11144&proy=mort_mg.
- Instituto Nacional del Cáncer. Marcadores de tumores. 2011. Datos consultados en marzo 2013. <http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/deteccion-diagnostico/marcadores-de-tumores>.
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin. 2010;60(5);277–300.
- Johnson M, Pace R. Sweet potato leaves: properties and synergistic interactions that promote health and prevent disease. Nutrition Reviews. 2010;68;604–661.

-
- Karna P, Gundala S R, Gupta M V, Shamsi S A, Pace R D, Yates C, Narayan S y Aneja R. Polyphenol-rich sweet potato greens extract inhibits proliferation and induces apoptosis in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*. 2011;32 (12);1872-1880.
- Karp G. *Biología celular y molecular, Capítulo 16 cáncer*. McGraw-Hill. 1998; 671-700.
- Kurata R, Adachi M, Yamakawa O, Yoshimoto M. Growth Suppression of Human Cancer Cells by Polyphenolics from Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) Leaves. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2007;55;185-190.
- Libuth S K, DeVita V T, Hellman S, Rosenberg S. Cancer of the colon. *Cancer Principles and Practice of Oncology*. Lippincott Williams and Wilkins, 2005;1;1061-1065.
- Liu R, Cheng W, Ling J, Liu L, Bi K, Li Q. Determination of polyamines in human urine by precolumn derivatization with benzoyl chloride and high-performance liquid chromatography coupled with Q-time-of-flight mass spectrometry. *Talanta*. 2011;83(4);751-756.
- McDonald A. *Flora de Veracruz. Convolvulaceae II*. 1994;fascículo 77;19-23.
- Minois N, Carmona G D, Madeo F. Polyamines in aging and disease. *Aging*. 2011;3(8);1-17.
- Morgan G, Silva A, Sat D. Factores de riesgo para cáncer de colon. *Sociedad mexicana de oncología*. 2008;7(4);12-15.
- Nussbaum R L, McInnes R R, Willard H F. *Genética en medicina*. 7ª Ed. España: Thompson & Thompson. 2008;469-470.
- Organización Mundial de la Salud. *Cáncer, datos y cifras*. 2013. Nota descriptiva N°297. Documento revisado marzo 2013.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

-
- Pochapski M T, Fosquiera E C, Esmerino L A, Dos Santos E B, Farago P V, Santor F A, Groppo F C. Phytochemical screening, antioxidant, and antimicrobial activities of the crude leaves' extract from *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Pharmacognosy Magazine. 2011;7(26);165-170.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. Angew Chem Int Ed Engl. 2011;50(3); 586-621.
- Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición Hospitalaria. 2012;27(1);76-89.
- Ramos M, Fernández J, Hernández E, Arvizu M G, Mendoza S, Reynoso R, Loarca M G. Efecto de plantas comestibles mexicanas en el desarrollo de cáncer de colon inducido con 1,2-dimetilhidrazina en ratas sprague-dawley. Ciencia Universidad de Queretaro. 2011;4(2);56-69.
- Reynoso R, Santerre S, Delgado J, Casas J, Velazquez S, Puebla A. Polyamines as biomarkers of the antitumoral activity of *Bursera fagaroides*. Interciencia. 2008;33(5);384-388.
- Rodriguez R, Castañeda A, Ordáz M. Conceptos básicos de genética. Universidad autónoma de México. Capitulo 14 Biología Molecular del Cáncer. 2007;177-185.
- Rumbaoa RG, Cornago DF, Geronimo IM. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (*Ipomoea batatas*) varieties. Food Chemistry. 2009;113:1133-1138.
- Sociedad Mexicana de Oncología A.C. Cáncer de colon. 2008;7(4);1-73.
- Soda K. The mechanisms by which polyamines acceleratetumor spread. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2011;30(95);2-9.

-
- Takahashi T y Kakehi J. Las poliaminas: policiones ubicuos con funciones únicas en las respuestas de crecimiento y estrés. *Annals of Botany*. 2010;105(1);1-6.
- Troung V D, McFeeters R F., Thompson R T., Dean L L., Shofran B. Phenolic acid content and composition in leaves and roots of common commercial sweetpotato (*Ipomea batatas* L.) cultivars in the United States. *J of Food science*. 2007;6;343-349.
- Yagi H, Tan T, Tuan R S. Polyphenols Suppress Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in Human Bone-Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2012;10;1-38.
- William G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestión. *Molecular Nutrition Food Reserch*. 2013;57;48-57.
- Zamorano P, Lagos M, Rivera C, Fernández R. Un modelo experimental inducible en ratón para conducir estudios en quimioprevención y anticarcinogénesis. *Theoria*, 2008;17(1);71-86.
- Zavaleta J, Muñoz A, Blanco T, Alvarado C, Loja B. Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres*. 2005;7;1-10.