



Escuela de Medicina

PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS MÉDICAS

Mención en Biología Celular y Molecular.

**“MECANISMOS MOLECULARES DE DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE COLON
Y LOS EFECTOS DEL ÁCIDO ELÁGICO PRESENTE EN LA GRANADA (*Punica granatum*)
SOBRE LA PREVENCIÓN Y PROTECCIÓN DE ESTA ENFERMEDAD”**

Tesis para optar al grado de:

Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

AUTOR

Rafael Antonio Fernando Peña Cárcamo

Director de tesis: Dr. Juan Villena



Escuela de Medicina
Programa de Magíster en Ciencias Médicas
Mención Biología Celular y Molecular

**“MECANISMOS MOLECULARES DE DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE COLON
Y LOS EFECTOS DEL ÁCIDO ELÁGICO PRESENTE EN LA GRANADA (*Punica granatum*)
SOBRE LA PREVENCIÓN Y PROTECCIÓN DE ESTA ENFERMEDAD ”**

Alumno: RAFAEL ANTONIO FERNANDO PEÑA CÁRCAMO

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Juan Villena en el laboratorio de Biología celular, aprobado por los miembros de la Comisión.

Dr. JUAN VILLENA
Director de Tesis

Dr. IVÁN MONTENEGRO
Comisión Evaluación Tesis

Dr. PABLO MUÑOZ CARVAJAL.
Comisión Evaluación Tesis

Dr. MARIO PARRAGA SAN ROMAN
Comisión Evaluación Tesis

**Valparaíso, Chile
2015**

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres, por la confianza y el apoyo constante que me han dado a lo largo de mi vida, y a mis hijas María Fernanda, María José y María Alejandra por ser mi inspiración en todo lo que emprendo.

A mis hermanos, Danilo, Pilar, María del Carmen y especialmente a Sergio (QEPD) que ha sido la motivación de esta tesis.

A mi Señora, Patricia Cárdenas Sepúlveda y a nuestros niños por incentivar me a seguir estudiando y por toda la ayuda recibida en esta tesis.

A la Sra. Angélica Colvin. Sra. Soledad Jara, y la Sra Mariana Arancibia, por la confianza que depositaron en mí y el apoyo constante en mi desarrollo profesional.

A la directora del Colegio Cervantino de Putaendo, Sra Marcela Salazar Zencovich, por su amistad y todas las facilidades que me dio durante estos años de estudios.

A Joan Villena mi profesor y director de tesis por toda la paciencia, y dedicación que me brindo en el desarrollo de este trabajo.

A los profesores del magister Mario Párraga, Sebastián San Martín, Pablo Olivero, Jenny Llanos y Eva Madrid. Por todos sus conocimientos y cordialidad demostrada durante estos años.

A mis compañeros de curso: Monserrat Olivares, Eduardo De la Vega, Rienzi Díaz, Rodrigo Zúñiga, Eduardo Ross, Aliro Maulén y Ricardo Moreno. Por toda la ayuda, compromiso y amistad que logramos durante estos años.

	INDICE DE CONTENIDOS	Pág.
1.-	Introducción	10
2.-	Metodología	12
3.-	Objetivos	13
4.-	Aspectos generales del cáncer	13
5.-	Aspectos moleculares del cáncer de colon.	16
6.-	Vías moleculares de la oncogénesis colorrectal	24
7.-	Vía supresora de tumores	26
8.-	Vía mutadora	27
9.-	Marcadores moleculares del cáncer de colon	28
10.-	Genes que participan en el cáncer de colon.	33
	10.1 Rol de la APC en la adhesión intercelular	37
	10.2 Papel de la inestabilidad cromosómica en el inicio del proceso tumoral	38
	10.3 La vía de señalización Wnt y su relación con la proliferación celular.	40
11.-	Procesos de migración celular	42
	11.1 Degradación de la matriz	44
	11.2 Metaloproteasas de la matriz extracelular	45
12.-	Invasión celular	47
	12.1 Serin- proteasas involucradas en la invasión tumoral.	47
	12.2 Endoglicosidasas implicadas en el desarrollo de la metástasis.	47
13.-	Angiogénesis	50
14.-	Alimentos y cáncer.	51
15.-	Fenoles	53
16.-	Efectos de los polifenoles	55
17.-	Fitoquímicos de la granada	57
	17.1 Componentes polifenólicos de la granada	58
	17.2 Propiedades del ácido elágico.	62
	17.3 Fuentes de obtención de elagitaninos y de ácido elágico	63
18.-	Acción de los polifenoles de la granada sobre el ciclo celular, proliferación y apoptosis	66
19.-	Efectos hormonales de los polifenoles de la granada	69
20.-	Estudios in vivo sobre los efectos de los polifenoles de la granada	70
21.-	Biodisponibilidad y bioequivalencia	79
22.-	Conclusiones	81
23.-	Bibliografía	86

RESUMEN

El cáncer de colon es la cuarta causa de muerte en Chile, afectando tanto a mujeres como hombres, especialmente, mayores de 50 años (Aravena 2010). Los signos y síntomas más frecuentes de neoplasias de ciego y ángulo esplénico (proximales) incluyen dolor abdominal indefinido, pérdida de peso y sangrado oculto; las neoplasias distales pueden presentar alteraciones en hábitos intestinales, disminución del calibre de la deposición y/o hematoquezia (Galiano de Sanchez 2005). La mayoría de estos síntomas son poco específicos, por lo que el descubrimiento de esta enfermedad se realiza en estados tardíos, aumentando la mortalidad. La secuencias adenoma-carcinoma es el evento más común, ya que el 98% de los casos de cáncer de colon corresponden a adenocarcinomas, existiendo una progresión desde la mucosa normal a adenoma y de este a un tumor maligno, esto se produce por una acumulación de mutaciones en genes supresores, protooncogenes y genes reparadores del DNA.

Desde hace algunos años, ha despertado un gran interés la prevención y protección del cáncer a través de la planificación de la dieta alimenticia, ya que, debido a sus características de enfermedad poligénica, los factores ambientales influyen notablemente en su aparición y desarrollo. Se ha descrito que el aumento de vegetales con alto contenido en fitoquímicos en la dieta, especialmente polifenoles, interfieren en etapas específicas del proceso carcinogénico (Weng 2011). Estos compuestos no sólo han mostrado un importante potencial quimioprotector, sino también terapéutico pudiendo actuar en diferentes fases del desarrollo tumoral, tales como la iniciación, proliferación celular y la apoptosis (Van der Logt 2003, Cruz- Bustillo 2004, Weng 2011). En este estudio

se analizan las causas moleculares del cáncer, los genes, proteínas involucradas y se revisan trabajos realizados con compuestos vegetales, especialmente aquellos presentes en la granada (*Punica granatum*), sobre los procesos de viabilidad, migración e invasión celular en cáncer de colon recopilando y analizando información sobre metodología de la investigación, resultados, y aplicaciones reales de la fitoterapia especialmente del extracto de granada, con algunos de sus componentes, fundamentalmente el ácido elágico y sus metabolitos intestinales la urolitina A y la urolitina B en la quimioprevención, quimioprotección y en terapias de cáncer de colon (Larrosa 2006).

ABSTRACT

Colon Cancer has been diagnosed as the fourth cause of death in Chile, it affects both women and men especially that population over 50 years old (Aravena 2010). The most typical symptoms and signs of the Cecum and splenic flexure (proximal colon) include undefined abdominal pain, weight-loss, and hidden bleeding. Distal neoplasia can cause a change in bowel habits, thinning in the width of the stool and/or hematochezia (Galiano de Sanchez 2005). Most of these symptoms are not very specific, leading to the discovery of this disease usually in the later stages, increasing mortality. The adenoma-carcinoma sequence is the most common event, since 98% of colon cancer cases are adenocarcinomas, there is a progression from normal mucosa to adenoma and from adenoma into a malignant tumor, and this is caused by an accumulation of mutations in suppressor genes, proto-oncogenes and DNA repair genes.

In the last years, the cancer protection and prevention has aroused great interest through diet planning, due to its characteristics as a polygenic disease. Environmental factors significantly influence its appearance and development. It has been described that an increase of vegetables with high content of phytonutrients used in diet, especially

polyphenols, interfere with specific stages of the carcinogenic process (Weng 2011). These compounds have not only shown a significant chemo preventive potential, but also a therapeutic one. They may act at different stages of tumor development, including initiation, cell proliferation and apoptosis (Van der Logt 2003, Cruz- Bustillo 2004, Weng 2011).

This research analyzes the molecular causes of cancer, the genes and the proteins involved and, the work done with vegetal compounds, especially those with phytochemicals existing in the pomegranate (*Punica granatum*), related to the processes of viability, migration, and cell invasion in colon cancer. This has been accomplished by collecting and analyzing information on the methodology of the investigation, results, and actual application of phytotherapy, especially the extract of pomegranate, some of its compounds, mainly the ellagic acid and its intestinal metabolites the urolithins A and B in chemoprevention, and chemo protection of colon cancer therapies.

Palabras claves: Colon Cancer, phytochemical, ellagic acid, pomegranate (*Punica granatum*)

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AINES	antiinflamatorios no esteroideos	MMP-8	Metaloproteasa 8 (colagenasa 2)
APC	adenomatous poliposis coli	MMP-2	Metaloproteasa 2 (gelatinasa A)
AOM	azoximetano	MMP-9	Metaloproteasa 9 (gelatinasa B)
ATX	Autotaxina	MMP-13	Metaloproteasa 13(colagenasa-3)
BCAC	Betacatenina acumuladas en las criptas.	MMR	Mismatch repair (reparación de errores en replicación)
BPDE	Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epóxido.(éteres bifenílicos polibromados)	MDF	agotamiento(depleted) de mucina en la fosa
BRB	liofilizados de frambuesas negras	MMPs	metaloproteinasas de la matriz
CIN	Inestabilidad cromosómica	MSI	inestabilidad en microsatélites
COX-2	Ciclooxigenasa 2	ODC	enzima ornitina descarboxilasa
DFMO	2-difluorometilornitina	NF- κ B	Factor de necrosis Kappa β
dThdpas	timidina fosforilasa/factor de crecimiento celular endotelial	OPCs	oligómeros procianidólicos
e/PD-			
ECGF	derivado de plaquetas		
EGF	factor de crecimiento epidérmico	PGO	Oil pomegranate (Aceite de granada)
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico.	PI3K	fosfoinosítido 3-quinasa
ER- β	receptor de estrógeno β	PPAR	Receptor de peroxisoma activado por proliferador
FAP	poliposis adenomatosa familiar	PSA	antígeno prostático
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos	RXR- α	Receptor reductasa retinoide X
FRAT	Proto-oncogén perteneciente a la familia GSK 3	siRNA	RNA interferente pequeño
GSK-3 β	glicógeno sintetasa quinasa	STAT 3	señales transductoras y

HHDP	grupo ácido hexahidroxidifénico	TCF	activadoras de la transcripción
HIF	factor inducible de hipoxia	TGF - α	factor de células T
HMG-CoA	3-hidroxi-3 metilglutatil coenzimo A	TGF- β	Factor de crecimiento transformante alfa
HNPCC	cáncer de colon hereditario no polipósico	TNF- α	Factor de crecimiento transformante Beta
HO-1	hemoxigenasa	tPA	Factor de necrosis tumoral alfa
IGF-I	factor de crecimiento insulínico tipo I	TPT	Activador de plasminógeno tipo tisular
MCR	Región de mutación de APC	uPA	Extracto de tanino total de granada
MEC	matriz extracelular	VEGF	Activador de plasminógeno tipo uroquinasa
MMP-1	Metaloproteasa 1 (colagenasa-1 o colagenasa intersticial de fibroblastos)	5-LOX	factor de crecimiento de endotelio vascular
			5-lipooxigenasa

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de colon es una de las patologías más frecuentes hoy en día, siendo la segunda causa de muerte en los países desarrollados (Jemal 2005) después del cáncer de pulmón en hombres y del cáncer de mama en mujeres (Ilyas 1999), representando aproximadamente de 20 a 30 fallecimientos por 100.000 habitantes. Cada año, alrededor de 10 millones de personas en el mundo son diagnosticadas con cáncer y aproximadamente 6,2 millones mueren por esta enfermedad. El cáncer de colon es el segundo tipo de cáncer con más alta mortalidad, 492.000 personas por año y la tercera más diagnosticada 945.000 personas por año en hombres y mujeres americanos (Jemal 2005). El cáncer de colon es más prevalente en América del Norte, Argentina, Australia, Nueva Zelanda, partes de Europa, Japón e Israel, siendo considerada como una enfermedad del estilo de vida. En los EEUU, es la segunda enfermedad más maligna y la cuarta causa de muerte (Chen 2003), Aproximadamente el 75% de los pacientes con cáncer de colon representan riesgo leve y se incluye a las personas mayores de 50 años sin ningún otro factor de riesgo. El riesgo-paciente moderado representa entre el 15% al 20% del cáncer de colon, incluyendo a aquellos con una historia familiar positiva de poliposis colorectal adenomatosa o de cáncer, y los pacientes de alto riesgo representan entre el 5% y el 15% de padecer cáncer de colon y son aquellos con poliposis adenomatosa familiar (PAF), cáncer de colon hereditario no polipósico (CCHNP) o inflamatorio de larga data (Young 2005).

Dentro de los diferentes tipos de cáncer, la neoplasia maligna de colon es una patología de suma importancia en Chile, ocupando el segundo lugar entre los cánceres del aparato digestivo después del gástrico y el de vesícula biliar. Cada año mueren en Chile mil personas a consecuencia de ésta enfermedad con una tasa de 6.2/100.000, afectando

a hombres y mujeres, siendo la población mayor de 50 años, donde se concentra más de 90% de la mortalidad (Aravena 2010). Existen factores de riesgo de gran importancia que dependen del estilo de vida y que predisponen a la aparición del cáncer de colon, como por ejemplo, la obesidad, la vida sedentaria y el tabaquismo (Robles-Agudo 2005, Anand 2008, Slattery 2011).

El cáncer de Colon parece estar asociado principalmente a dietas ricas en grasas y pobres en fibra (Van der Logt 2003). Las grasas en la dieta inducen la excreción de ácidos biliares primarios, (cólico, quenodesoxicólico) los cuales pueden ser convertidos por las bacterias del colon a ácidos biliares secundarios (desoxicolato y litocolato y, en menor proporción ursodesoxicólico). Algunos de estos componentes podrían afectar la mitogénesis epitelial, concentraciones de insulina sérica, niveles de prostaglandinas E2, y la inmunocompetencia del huésped, factores que pueden promover el cáncer de colon (Vargas 1992, Galiano de Sanchez 2005). En contraposición, una dieta rica en vegetales, calcio, fibra, vitamina C o E, disminuyen la concentración de mutágenos de la materia fecal y enlentecen la duplicación celular en el epitelio intestinal.

Se sugiere que el consumo del calcio,(que se une tanto a las grasas como a los ácidos biliares formando compuestos insolubles, facilitando su eliminación) (Vargas 1992), y además, una gran carga en polifenoles, podría tener una excelente acción protectora frente al cáncer de colon, ya que interfieren en etapas específicas del proceso carcinogénico (Gryfe 1997, Norman 2003, Surh 2003). Estos fitoquímicos, no sólo han mostrado un importante potencial quimioprotector, sino también terapéutico pudiendo actuar en diferentes fases del desarrollo tumoral, tales como la iniciación, proliferación celular y la apoptosis (Gryfe 1997, Norman 2003, Cruz- Bustillo 2004). En este ámbito, los trabajos realizados en los componentes de la granada y sus elementos bioactivos como las punicalaginas , el ácido elágico, y otros componentes como flavonoides, antocianidinas, ácidos grasos poliinsaturados, fitoesteroides, triterpenoides, varias

vitaminas y microelementos tales como el hierro, selenio, cobre, calcio y otros (Khan 2007), han demostrado actividades biológicas muy importantes para la salud humana, tales como: un alto poder antioxidante, modulación de las respuestas inflamatorias, regulación de la homeostasis lipídica, prevención frente a varios tipos de cáncer (Syed 2007, Adhami 2009), como el de próstata (Malik 2006, Pantuck 2006, Seeram 2007), de mama (Adams 2006), de piel (Johanningsmeier 2011), y de colon (Norman 2003, Kohno 2004, Adams 2006, Mertens-Talcott 2006, Whitley 2006, Saruwatari 2008, Gonzalez-Sarrias 2009, Kasimsetty 2009, Khan 2009, Umesalma 2009, Kasimsetty 2010, Araújo 2011, Weng 2011).

En este trabajo, abordaremos las vías moleculares que participan en el desarrollo y la progresión del cáncer de colon, las acciones del ácido eláxico presente en la granada (*Punica granatum*) y sus derivados, en la prevención y tratamiento del cáncer de colon, reuniendo y citando las referencias que evidencian que el consumo de los componentes bioactivos de la granada disminuye la morbilidad y la mortalidad de esta enfermedad así como también aquellos que presenten discrepancias al respecto.

2.- METODOLOGÍA

Se recopilará información científica retrospectiva, de investigaciones tanto *in vivo* como *in vitro*. Para obtener de los trabajos se utilizarán buscadores, tales como: www.google.com; <http://scholar.google.es/>, www.pubmed.org; www.Scielo.cl, <http://csi-hub.org/>, usando palabras claves tales como: Ácido eláxico, cáncer, cáncer de colon, aspectos moleculares del cáncer, vías de señalización, procesos de angiogénesis, metástasis celular, vías moleculares de cáncer de colon, genes y proteínas involucradas en el cáncer de colon, polifenoles de la granada (*Punica granatum*) protección y prevención del cáncer de colon a través de fitoquímicos, especialmente del ácido eláxico. Se usó también conectores entre diferentes temas tales como: Cáncer de colon y ácido

elálgico. Los idiomas seleccionados de las investigaciones fueron inglés y español. Se descartaron aquellas investigaciones relacionadas con otros tipos de canceres (pulmón, vejiga, mama, piel) y aquellas relacionadas con polifenoles presentes en grandes cantidades en otros vegetales, tales como el resveratrol en la uva.

3.- OBJETIVO GENERAL.

Recopilar, extraer y analizar información científica sobre los mecanismos moleculares de desarrollo y progresión del cáncer de colon y los efectos del ácido elálgico presente en la granada (*Punica granatum*) en la prevención y protección de esta enfermedad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar una visión integral del cáncer, específicamente del cáncer de colon.
- Generar una base de referencias científicas sobre el consumo del fruto de *Púnica granatum*, y su incidencia en la prevención y protección del cáncer de colon.

4.- Aspectos Generales del Cáncer

Neoplasia o tumor es un crecimiento excesivo e incontrolado de las células que forman los tejidos. Las neoplasias benignas muestran una semejanza morfológica con su tejido de origen, crecen lento en forma expansiva y en forma circunscrita y, generalmente, en asas encapsuladas, e incluso pueden dejar de crecer y entrar en retroceso. Los tumores benignos no se infiltran a través de los tejidos locales y no producen metástasis (Yasui 2009).

El cáncer se define como el crecimiento tisular anormal donde la proliferación celular es relativamente autónoma e incontrolada, conduciendo a un aumento progresivo del número de células en división y la posterior invasión de otros tejidos, sobrepasando

los mecanismos de control y perdiendo la homeostasis celular del organismo. La pérdida del balance entre la apoptosis y la proliferación celular, puede eventualmente promover el desarrollo tumoral (Young 2005). Esta transformación de una célula normal en tumoral, implica una pérdida del control de la proliferación, es decir, las células tumorales se multiplican independientemente del anclaje a la matriz extracelular y de factores de crecimiento, perdiendo la capacidad de responder a factores inhibitorios de crecimiento (Hanahan 2000). La mayoría de los tumores provienen de un reducido número de células progenitoras que adquieren características básicas que las transforman en malignas. En condiciones normales, este proceso es inducido desde la propia célula, gracias a mecanismos de control que actúan regulando la normalidad de la progresión del ciclo celular (Araújo 2011). En estos puntos destacan la presencia de proteínas supresoras de tumores como la p53, que en condiciones normales actúa deteniendo el ciclo y activa mecanismos de reparación de ADN y sólo cuando se completa la reparación permiten la reiniciación del ciclo celular. Las células tumorales tienen defectos en sus sistemas de reparación del ADN (Catalan 2003) lo que aumenta la posibilidad de acumulación de mutaciones en el material genético, esto podría conferirle a las células mutadas, ventaja de crecimiento lo que permitiría la progresión tumoral, por su replicación ilimitada (Hahn 1999). Además, tienen la capacidad de inducir fenómenos de angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos) lo que facilitaría la llegada de nutrientes y oxígeno y, con ello, el crecimiento de la masa tumoral de forma sostenida y la capacidad de invadir otros tejidos, formando metástasis y tumores secundarios (Johnson 2007).

La regulación anormal de la proliferación en las células cancerosas se origina por la acumulación de mutaciones en los genes de procesos claves. Estos cambios genéticos en la secuencia de ADN se pueden producir por translocaciones cromosómicas, eliminaciones, inserciones, amplificaciones o mutaciones puntuales. Los cambios epigenéticos, consisten en la incorporación de grupos metilo o acetilo a residuos de

aminoácidos presentes en las histonas, o directamente al ADN , pudiendo afectar la expresión de los genes de reparación del ADN, de control del ciclo celular o de inducción de muerte celular pero no modifican la secuencia del ADN (Hanahan 2000).

Como se indicaba anteriormente, en Chile, el cáncer es la segunda causa de muerte y sólo un 5 a 10 % de estas, están asociadas a factores genéticos hereditarios (Aravena 2010). La gran mayoría, se debe a factores ambientales generalmente asociados a las dietas alimenticias y la exposición a cancerígenos tales como medicamentos, rayos ultravioletas, consumo de alcohol, cigarrillos y otros (Anand 2008).

Para disminuir la mortalidad, se utilizan dos estrategias, la primera se refiere a seguir con un tratamiento que va desde la cirugía hasta la radio o quimioterapia. La cirugía persigue extirpar parte del órgano afectado o la totalidad de éste, y aunque la resección quirúrgica es beneficiosa, falla en la eliminación de las metástasis aisladas para algunos pacientes, por lo que el 50% de los pacientes tratados con cirugía presenta una reincidencia (Catalan 2003) o la muerte (Bright-Thomas 2002). Los tratamientos con radioterapia o quimioterapia, son poco específicos y altamente tóxicos con las células sanas y en muchos de los casos sólo reactivan otros procesos carcinogénicos. En la actualidad, la eficacia global de la cirugía, la quimioterapia o la radioterapia es muy limitada (Chin 2005).

La segunda posibilidad se plantea desde el punto de vista de la prevención y protección contra el cáncer, en los últimos años se han incrementado las investigaciones al respecto, asociadas fundamentalmente a compuestos naturales que podrían ser utilizados con carácter preventivo. La organización mundial de la salud (OMS) indica que más del 30% de las especies de plantas en el mundo se usan con fines médicos (Farnsworth 1996). De las 250.000 especies de plantas mayores sobre la tierra, más de 80.000 son medicinales. El 50% de las drogas antitumorales aprobadas por la

administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos(FDA),son originarias de fuentes naturales (Vandebroeck 2004).La investigación sobre la asociación entre productos naturales, especialmente las acciones de los 8.000 polifenoles presentes en la dieta y la prevención de enfermedades en humanos continúa siendo intensamente estudiada (Ito 2005).

Las propiedades de los polifenoles, se asocian no sólo a sus capacidades antioxidantes, antiproliferativas, o antiinflamatorias, sino también a sus propiedades de inducción de la apoptosis, de arresto del ciclo celular, de inhibición de proliferación y supervivencia, y supresión de la angiogénesis y metástasis (Van der Logt 2003, Cruz-Bustillo 2004, Larrosa 2006, Weng 2011). Estos compuestos ofrecen una buena oportunidad para posibles terapias para la prevención y/o tratamiento del cáncer (Chin 2005, Ramos 2008).

Los estudios sobre las acciones del ácido elágico un metabolito obtenido del polifenol punicalagina el más abundante en la granada (*Punica granatum*), sus acciones antioxidantes y anticancerígenas, demuestran que mejoran el ambiente celular neutralizando especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS,RNS) evitando la generación de células cancerosas, e impidiendo que las células que ya tienen un daño genético se multipliquen al inducir en ellas apoptosis, evitando la progresión de los tumores (Khan 2007).

5.- ASPECTOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE COLON

En el intestino delgado las criptas y vellosidades confieren suficiente superficie para la absorción de nutrientes. En el caso del intestino delgado, la mucosa está formada por una monocapa de células epiteliales y el tejido conectivo subyacente. Este, a su vez, comprende la membrana basal, sintetizada conjuntamente por los enterocitos y los miofibroblastos, la matriz extracelular y las células propias del tejido conectivo (Figura.1).

Este último, incluye además, células del sistema nervioso autónomo y sus prolongaciones, células musculares lisas, elementos vasculares y del sistema inmune local y otras células que sólo residen en él transitoriamente (Verbeke 2001, Cabrera 2005).

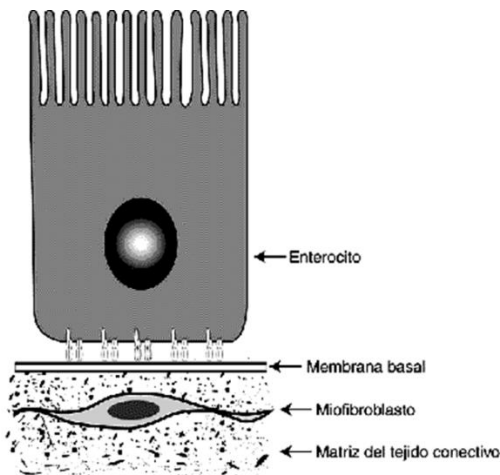


Figura 1. Representación esquemática de la relación entre los enterocitos, su membrana basal, a la que están anclados a través de integrinas, los miofibroblastos y la matriz del tejido conectivo. Modificada de (Verbeke 2001)

El colon está organizado en compartimentos de células que constituyen las denominadas criptas colónicas (Figura 2), que tienen una profundidad de alrededor de 50 células, ya que no es necesaria una gran área, porque la absorción se restringe solamente al agua y algunas vitaminas (Cruz- Bustillo 2004, Yasui 2009).

En el epitelio sano del colon hay una renovación casi constante y normal del epitelio superficial aproximadamente cada seis días mediante proliferación celular y diferenciación de las células madres de la cripta (Bach 2000). Además de renovar el revestimiento del intestino, elaboran moco, que tiene por función lubricar las heces en su camino al recto, ya que a medida que avanzan, contienen menos agua. Está ampliamente aceptado que las lesiones adenomatosas se desarrollan a partir de las células *stem* o células madre localizadas en la base de las criptas por esto el análisis de las aberraciones de la fosa de la cripta puede facilitar la detección temprana de los cambios moleculares que preceden al adenoma (Pretlow 1992).

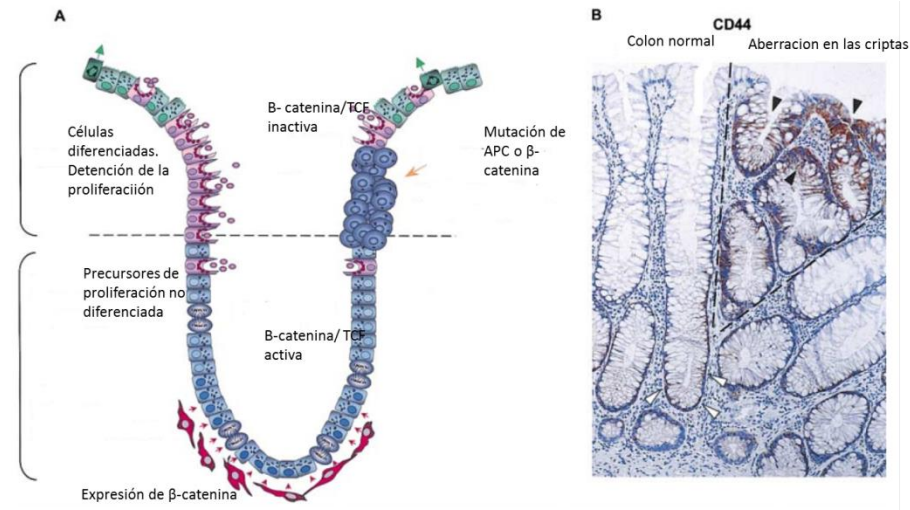


Figura 2. Modelo propuesto del papel de la vía de Wnt, mediada por β -catenina-TCF, en los primeros estadios de la tumorigénesis colorrectal. A) representación esquemática de la cripta y la formación de pólipos. B) Expresión de CD44, uno de los genes blanco de la actividad β -catenina-TCF en criptas colónicas normales y tumorales. Modificada de (Van de Wetering 2002).

La proliferación de los colonocitos se lleva a cabo en la porción inferior de la cripta luego de lo cual, las células del colon migran hacia la parte superior de la cripta alejándose de las células madre (Lipkin 1962, Van de Wetering 2002). En este camino se produce la diferenciación y la maduración de las células recién nacidas. Las células maduras pierden su capacidad de dividirse y finalmente mueren por apoptosis exfoliándose a la luz intestinal (Cruz- Bustillo 2004). Normalmente, la tasa de nacimiento de células epiteliales colónicas iguala a la tasa de pérdida, pero cuando la tasa de nacimiento aumenta o la de pérdida disminuye entonces se origina un desequilibrio que puede ocasionar un proceso neoplásico (Cabrera 2005).

Los tumores malignos como el cáncer de colon crecen rápidamente, (Figura 3) extendiéndose progresivamente a través de los tejidos adyacentes produciendo metástasis a lugares distantes (Deschner 1975, Yasui 2009).

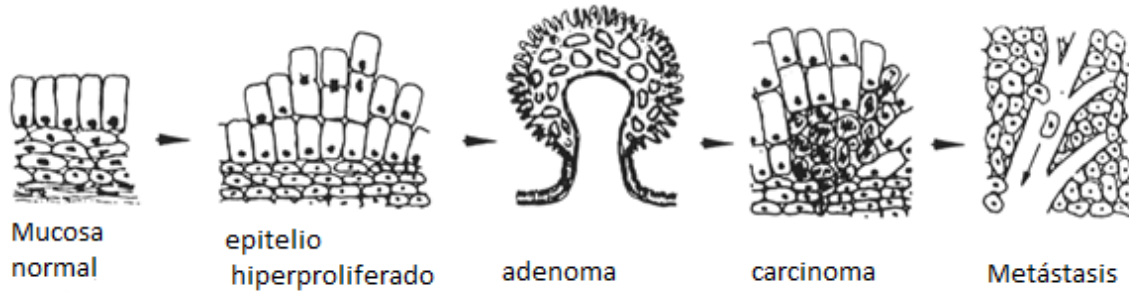


Figura 3: Esquema de la secuencia adenoma , carcinoma, en cáncer de colon. Modificada de (Kinzle 1996)

Este fenotipo invasivo se caracteriza por la expresión de varias clases de moléculas incluyendo receptores de adhesión celular como cadherinas e integrinas, metaloproteinasas de la matriz (MMPs), otras proteasas, o factores de crecimiento y sus receptores (Cairns 2003, Albini 2004). Estas moléculas pueden influenciar en la composición de la matriz extracelular circundante y pueden modular la expresión génica en células vecinas no neoplásicas, lo que a su vez puede facilitar la salida de las células neoplásicas a través de vasos sanguíneos (Albini 2004). Los tumores de colon constituyen un excelente sistema para estudiar la carcinogénesis y algunas alteraciones genéticas involucradas en el desarrollo de un tumor (Figura 4) (Hahn 1999, Cruz- Bustillo 2004).

En las células cancerosas hay dos categorías generales de genes mutados o que se expresan incorrectamente, los protooncogenes y los genes supresores de tumores. Los protooncogenes son genes cuyos productos promueven el crecimiento y la división celular, codifican factores de transcripción, estimulan la expresión de otros genes, y moléculas de transducción de señales que estimulan la división celular y reguladores del ciclo celular que hacen que la célula progrese en este ciclo (Markowitz 2009)(Figura 4).

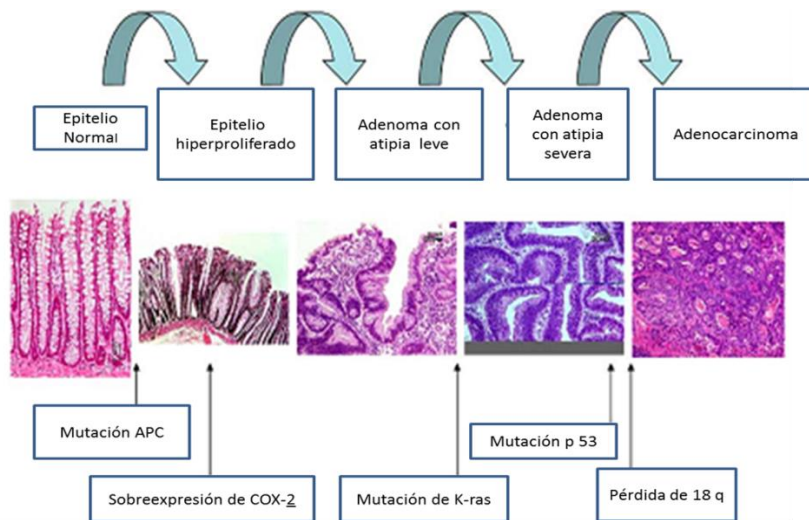


Figura 4. Secuencia Adenoma-carcinoma con los genes involucrados en el desarrollo del cáncer de colon. Modificada de (Yasui 2009)

Los productos de los protooncogenes pueden localizarse en la membrana, el citoplasma y el núcleo y sus actividades se controlan de diversas maneras, incluyendo la regulación a nivel transcripcional, traduccional y posttraduccional.

Cuando las células se convierten en quiescentes y dejan de dividirse (repose proliferativo) reprimen la expresión de la mayor parte de los productos de los protooncogenes (Ciclina D1, c myc, factores de transcripción, CDK). En las células cancerosas uno o más de estos productos están alterados de manera que su actividad no puede ser controlada de manera normal. En otros casos el protooncogen puede codificar productos proteicos normales pero el gen está sobre-expresado y no pueden ser transcripcionalmente reprimidos en el momento correcto, lo que estimula a la célula a dividirse continuamente, en este momento el protooncogen pasa a denominarse oncogen, ya que han sufrido una alteración que le confiere una ganancia de función. En consecuencia un solo alelo mutado o expresado de manera incorrecta es suficiente para

estimular un crecimiento incontrolado, por esto los oncogenes confieren un fenotipo canceroso dominante (Klug 2006).

Los genes supresores de tumores son aquellos, cuyos productos regulan en condiciones normales, los puntos de control del ciclo celular, e inician el proceso de apoptosis. En las células normales las proteínas codificadas por los genes supresores, (p53, p21) detienen la progresión del ciclo celular en respuesta al daño en el ADN o señales de supresión del crecimiento provenientes del medio extracelular. Cuando los genes supresores de tumores están mutados o son inactivos, las células no pueden responder normalmente a los puntos de control del ciclo celular, o son incapaces de inducir la muerte celular programada si el daño del ADN es demasiado importante (Markowitz 2009), esto conduce a un incremento en las mutaciones y a la incapacidad de la célula de dejar el ciclo celular cuando debería convertirse en quiescente. Cuando al menos uno de los dos alelos de un gen supresor de tumores son inactivos, y hay otros cambios en la célula que la mantienen creciendo y dividiéndose, las células pueden convertirse en tumorigénicas (Klug 2006). La inactivación del gen reparador se puede detectar por análisis inmunohistoquímico, pudiendo observar la pérdida de una o más proteínas reparadoras (Markowitz 2009). Las mutaciones críticas ocurren en genes supresores de tumores, asociados con genes reparadores y protooncogenes que alteran el balance entre la proliferación celular y la apoptosis (Hahn 1999).

De acuerdo a la expresión de estos genes, y si sus mutaciones son heredables o no, se ha clasificado desde el punto de vista genético, al cáncer de colon en tres formas fundamentales: esporádica, familiar y hereditaria (Giarnieri 2003, Cruz- Bustillo 2004, Kargozaran 2008), mientras las formas familiares y hereditarias siguen un patrón de herencia en la predisposición familiar a padecer cáncer (Cruz- Bustillo 2004, Benito 2006, Kargozaran 2008), algunos genes factibles de ser heredados en el cáncer hereditario, también juegan un rol importante en el cáncer esporádico (Castellvi-Bel 2005).

Los cánceres de colon hereditarios se desarrollan mediante etapas definidas que van desde lesiones en la cripta del colon a través de adenomas hasta manifestar el cáncer (Takayama 1998, Worthley 2010) se caracterizan por la acumulación de múltiples mutaciones (Finlay 1993), en genes supresores de tumores (Su 1993) y oncogenes que afectan el balance entre la proliferación celular y la apoptosis (Figura 4). La vía del cáncer de colon no es una sola y probablemente existan varios caminos para que se produzca, el inicio, desarrollo y progresión de un tumor en el colon (Cruz- Bustillo 2004).

Otros investigadores clasifican el cáncer de colon en forma esporádicas, hereditarias, y enfermedades inflamatorias del intestino (Deschner 1975, Young 2005). Si bien la proporción de cada uno de ellos en la población varía, la forma hereditaria es la menos común. Hay un porcentaje de 10 a 30% de casos con riesgo familiar y el resto está representado por el cáncer de colon esporádico (Cruz- Bustillo 2004).

En cambio otros autores plantean que el 75% de los casos de cáncer son esporádicos (Kitisin 2006, Kargozaran 2008), y el resto son enfermedades familiares, sin embargo, las mutaciones genéticas que han sido identificadas representan sólo un 5 - 6% de los casos heredados. Las dos vías principales por las cuales se producen mutaciones en los genes involucrados en el cáncer de colon ocurren por inestabilidad cromosómica y microsatelital (Ilyas 1999, Catalan 2003, Cabrera 2005, Kitisin 2006). El término esporádico se utiliza a veces para diferenciar los cánceres que ocurren en personas que no portan una mutación heredada que les confiera susceptibilidad al tumor, de aquellos cánceres que si ocurren en personas que portan una mutación conocida y asociada a la enfermedad. Esta diferencia no es absoluta, ya que el factor genético parece influir en la probabilidad de aparición del cáncer aún en ausencia de una mutación específica heredada (Potter 1999). El término esporádico en otras ocasiones se usa para describir el cáncer que tiene lugar en individuos que no tienen historia familiar de cánceres. La gran mayoría de los casos de cáncer de colon se consideran esporádicos (Cruz- Bustillo 2004).

Estudios poblacionales arrojan un riesgo de dos a tres veces mayor de adquirir un cáncer de colon cuando los familiares de primera consanguinidad han padecido un cáncer esporádico de colon. Se han estudiado múltiples familias que indican que este riesgo familiar es el resultado probable de una susceptibilidad hereditaria con penetración parcial a padecer adenomas y cáncer de colon (Potter 1999).

Los factores hereditarios pueden determinar la susceptibilidad del individuo a padecer de adenomas y cáncer de colon, mientras que los factores ambientales probablemente determinan quiénes de los individuos predispuestos genéticamente desarrollarán adenomas pequeños, adenomas grandes y finalmente, cáncer de colon. Las formas hereditarias de cáncer de colon más conocidas son FAP (Familiar Adenomatous Polyposis) y HNPCC(Hereditary nonpolyposis colorectal cancer) aunque existen otros síndromes asociados a la predisposición a padecerlo (Cruz- Bustillo 2004).

La FAP es una enfermedad autosómica dominante en la que se desarrollan múltiples pólipos adenomatosos en el colon durante la segunda o tercera década de la vida (Kinzle 1996). Estos pólipos son histológicamente idénticos a los que se desarrollan en el cáncer de colon esporádico y aunque poseen un bajo riesgo de malignización, su elevado número aumenta el riesgo de padecer la enfermedad sobre los 40 años (Deschner 1975), el gen responsable de FAP es APC (adenomatous polyposis coli) (Kinzler 1991), este gen fue caracterizado en el año 1991 (Grodin 1991) y codifica una proteína citoplasmática de 300kDa. La mayoría de las mutaciones truncan la proteína APC que es supresora de tumores (Fearnhead 2001). Para el desarrollo de FAP sólo se necesita un alelo mutado, lo que sugiere el efecto dominante negativo de la proteína mutada (Kinzle 1996).

El cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC), se describe como una predisposición autosómica dominante al cáncer de colon que carece de la elevada poliposis característica de FAP. Como características clínicas de HNPCC se incluyen la

asociación con otros tumores, la predisposición por el lado derecho del colon y una alta frecuencia de tumores mucinosos poco diferenciados con alta probabilidad de invasión (Worthley 2010). Se han identificados como los responsables de HNPCC a los genes de reparación de ADN. Mutaciones en el gen hMSH-2 originan el 60% de los casos de HNPCC, el hMLH-1 el 30% y el hPMS-1 el 5% (Fishel 1993).

El cáncer de colon es uno de los tumores sólidos mejor caracterizados gracias a la ventaja de poder disponer de piezas correspondientes a todos los estadios de la enfermedad (secuencia desde la lesión pre-maligna al cáncer invasivo)(Figura 3) lo que ha permitido el estudio de los eventos patológicos y moleculares involucrados (Figura 5), permitiendo establecer un modelo molecular de la carcinogénesis (Catalan 2003).

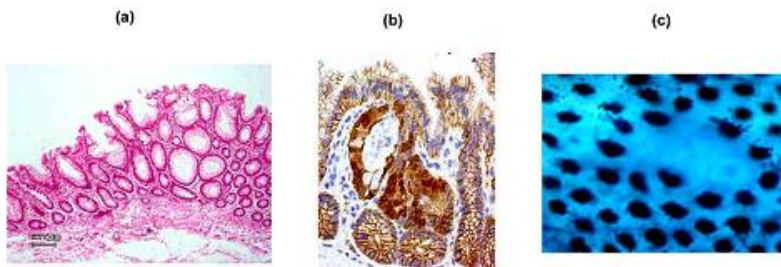


Figura 5. Lesiones precursoras en cáncer de colon. (a) Histopatología de las aberraciones de la fosa de la cripta colónica, (b) acumulación de β -catenina en las criptas.(c) pérdida de mucina en las fosas .Modificado de (Yasui 2009).

6.-VIAS MOLECULARES DE ONCOGENESIS COLORECTAL

El cáncer de colon es el resultado de una progresión y acumulación de diversas alteraciones genéticas (Cabrera 2005). Se consideran varios genes, incluidos oncogenes (reguladores positivos del ciclo celular), genes supresores tumorales (reguladores negativos del ciclo celular) (Hahn 1998), y genes asociados a los mecanismos de reparación del ADN (Catalan 2003, Young 2005). En concreto, el estudio de las neoplasias.

hereditarias, ha permitido establecer actualmente, dos vías moleculares por las que se produce el cáncer de colon, la vía supresora de tumores y la vía mutadora (Gryfe 1997, Catalan 2003, Surh 2003, Young 2005). (tabla 1)

Tabla 1. GENES RELACIONADOS CON CARCINOGENÉISIS DE CÁNCER DE COLON. Modificada de (Catalan 2003)		
GEN	FUNCIÓN	LOCUS
ONCOGENES		
K-Ras	Transducción de señales	12p12.1
CTNNB1	Adhesión celular, transducción de señales	3p21
SRC	Unión de proteínas, transducción de señales.	20q12-q13
Neu/her2	Receptor factor de crecimiento	17q11.2-q12
Myc	Regulación del ciclo celular	8q24.12-q24.13
SUPRESORES TUMORALES		
APC	Adhesión celular	5q21
p53	Detiene el ciclo celular en G1	17p12
DCC	Adhesión celular	18q21.3
MCC	Transducción de señales	5q21
SMAD4	Control de la proliferación (supresor de tumores), común a todas las vías	18q21
SMAD2	Receptor de TGF β	18q21
TGF- β RII	Transducción de señales	22p11.2
REPARACIÓN		
hMSH-2	Reparación del ADN	2p16
hMLH-1	Reparación del ADN	3p21
hPMS-1	Reparación del ADN	2q31-33
hPMS-2	Reparación del ADN	7p22
hMSH6	Reparación del ADN	2p21

7.- VÍA SUPRESORA DE TUMORES. En el caso del cáncer de colon, los genes supresores tumorales son APC, p53, p21, DCC, MCC, SMAD 4, SMAD 2 estos aparecen mutados frecuentemente en la mayor parte de los tumores esporádicos de colon (>80%) y los asociados a FAP (Fearon 2004, Markowitz 2009).

La carcinogénesis en el colon se podría iniciar, por medio de la inactivación del gen APC (Fearon 1990). Las mutaciones generalmente ocurren en la región implicada en la interacción con β -catenina (Su 1993) y con una glicógeno sintetasa quinasa (GSK-3 β) como componente de la vía Wnt. Con esta unión β -catenina, sufre fosforilación, siendo degradada en proteasoma (Rubinfeld 1996, Aberle 1997, Jiang 1998), si esto no ocurre se acumula en el citoplasma y luego migra hacia al núcleo celular donde puede formar un complejo con el factor de transcripción celular (TCF), el que activa la expresión de oncogenes cMyc y ciclina D1 (Tetsu 1999), así como c-jun, fra-1, PPAR δ , MMP-7, uPA (Fodde 2001). Como resultado, se produce inhibición de la apoptosis, y pérdida del control de la proliferación celular (Rubinfeld 1993, Kawasaki 2000), por lo que no habrá diferenciación ni maduración de los colonocitos, provocando que las células madre que están proliferando en la base de la cripta, suban al ápice sin madurar (Potter 1999, Fearnhead 2001). Otra interacción del gen APC, es con la proteína antiapoptótica survivina. La función de survivina en la base de la cripta, es inhibir la apoptosis de las células madres y así regenerar todas las células necesarias que sustituyan aquellas que serán eliminadas en el ápice y que después se exfoliarán a la luz intestinal, (Tanaka 2009). Se postula entonces, que la mayor actividad de APC está asociada a la supresión de la survivina (Mita 2008), esto es coherente con la gran actividad que se ha encontrado en la porción superior de la cripta, de la proteína APC y los bajos o inexistentes niveles de survivina en esta región (Cruz- Bustillo 2004). Cuando APC muta, da lugar a la acumulación anormal de células en el ápice de la cripta que formarán adenomas y después tumores (Ambrosini 1997). También se ha planteado que el gen de survivina podría estar reprimido

transcripcionalmente por p53 y se puede desregular por varios mecanismos tales como la amplificación de genes, la hipometilación y/o la pérdida de la función de la p53 (Mita 2008). En el cáncer de colon aparece sobre-expresada (Bao 2002). Se ha planteado la posibilidad de que survivina, pueda participar en la regulación de la división celular, específicamente en la mitosis, y pueda jugar un papel fundamental en la función de los microtúbulos (Altieri 1999, Fodde 2003). Además se ha descrito la participación de survivina en la promoción de la angiogénesis y la quimioresistencia (Mita 2008).

El oncogen de la vía supresora de tumores, es K-Ras, las mutaciones activantes de K-Ras evitan que la actividad intrínseca de Ras funcione hidrolizando correctamente el GTP a GDP, esto consigue que la proteína permanezca en una activación constante, independiente del estímulo de su receptor EGFR. Esta independencia de las señales exógenas del crecimiento confiere a las células modificadas una autonomía respecto al control correcto de la proliferación celular. A su vez, las proteínas Ras activan múltiples rutas de señales, siendo las de Raf-MEK-MAPK y fosfoinosítido (PI) 3-quinasa las más conocidas y relevantes en los procesos tumorales (Fearon 2004).

8.- VÍA MUTADORA. Esta se caracteriza por la presencia de mutaciones en los genes reparadores del ADN,(hMLH1 y hPMS-1 principalmente) lo que se manifiesta por la acumulación de errores y la formación de lazos durante la replicación. Los tumores formados por esta vía son en su mayoría diploides o pseudodiploides. Se observa en ellos, además, una ausencia de mutaciones en los genes tumorales habituales de la vía supresora. Pertenecen a ésta vía una parte de los tumores esporádicos de colon (20%) y la mayor parte (80%) de los tumores hereditarios no polipoides (Fearon 2004). Estas dos vías de carcinogénesis manifiestan diferencias claras en su fenotipo no sólo a nivel celular, sino también en sus manifestaciones clínicas. La transformación tumoral se inicia en la mucosa del colon a nivel de las criptas y durante la progresión tumoral, las células neoplásicas atraviesan la membrana basal e infiltran la capa muscular propia y la serosa, pudiendo

identificar etapas bien definidas a nivel histológico, que van desde lesiones en la cripta del colon a través de la formación de pólipos o adenomas hasta manifestar el cáncer (Kinzle 1996).

9.- MARCADORES MOLECULARES DEL CANCER DE COLON.

El estudio de aberraciones de las criptas del colon en roedores y humanos han permitido identificar tempranamente precursores en el desarrollo del cáncer de colon, y los cambios que estos tienen previo al desarrollo del cáncer, siendo una potencial herramienta para la quimioprevención (Pretlow 1992), por ejemplo la acumulación de β -catenina en las criptas, así como el agotamiento de mucina en la fosa (Tabla 2), sin embargo, la detección de estas lesiones en humanos no es simple en laboratorio (Mori 2005). Diversas estrategias de quimioprevención se pueden ver beneficiadas de las observaciones vinculadas a la identificación de compuestos intermedios y de biomarcadores o de diversos nutrientes y/o drogas, con blancos moleculares específicos implicadas en el desarrollo del cáncer, actualmente, la información genética, la señalización molecular y las vías metabólicas sobre el cáncer, se han usado en ciertas terapias dirigidas a moléculas específicas para la prevención del cáncer (Ebert 2007).

Tabla 2. Patrones de diferentes biomarcadores de carcinogénesis de colon expresados en roedores y humanos. Modificada de (Yasui 2009).

	Lesiones	Biomarcadores expresados								
		B-catenina	COX-2	iNOS	HMG-CoA reductasa	RXR- α	ER- β	5-LOX	STAT-3	NF- $\kappa\beta$
Colon en roedores	Normal *	1+	-	-	1+	4+	1+	+/-	1+	1+
	ACF	2+	+/-	+/-	1+	2+	2+	2+	-	2+
	AD	3+	3+	2+	3+	1+	3+	3+	3+	3+
	ADC	4+	4+	4+	4+	-	4+	4+	4+	4+
Colon en Humanos	Normal *	1+	-	-	1+	4+	1+	+/-	1+	?
	ACF	2+	?	?	1+	?	-	?	-	?
	AD	3+	3+	2+	2+	1+	3+	3+	3+	?
	ADC	4+	4+	-	3+	-	4+	4+	4+	?

Normal *(sin lesiones en las criptas) (?) aún no determinado,(-)negativo o nula sobre-expresión ;(+/-) muy débil sobre expresión ; (1+) débil sobre expresión; (2+)fuertemente sobre-expresado;(3+) muy fuertemente sobre-expresado y (4+) intensamente sobre-expresado.

Los principales estudios moleculares sobre marcadores biológicos involucrados en las vías de señalización son: Poliaminas (ornitina decarboxilasa) (Wallace 2003); ciclooxigenasa (COX-2) (Eberhart 1994, Williams 1999, Prescott 2000, Takahashi 2000), oxidonitrosintetasa inducible (iNOS) (Crowell 2003, Rao 2004); 3-hidroxi-3 metilglutatil coenzima A (HMG-CoA) (Goldstein 1990, Crisby 2003); receptor reductasa retinoide X (RXR- α) (Charla 2001, Shulman 2005); receptor de estrógeno (ER- β) (Deroo 2006); β catenina;5-lipooxigenasa (5-LOX) (Ghosh 1999); señales transductoras y activadoras de la transcripción (STAT 3) (Ramos 2008); factor nuclear Kappa β (NF-K β) y la hemoxigenasa (HO-1)(Li Volti 2005).La participación de algunos de estos marcadores biológicos y las vías en que se encuentran involucradas, se pueden apreciar en las figuras 6, 7.

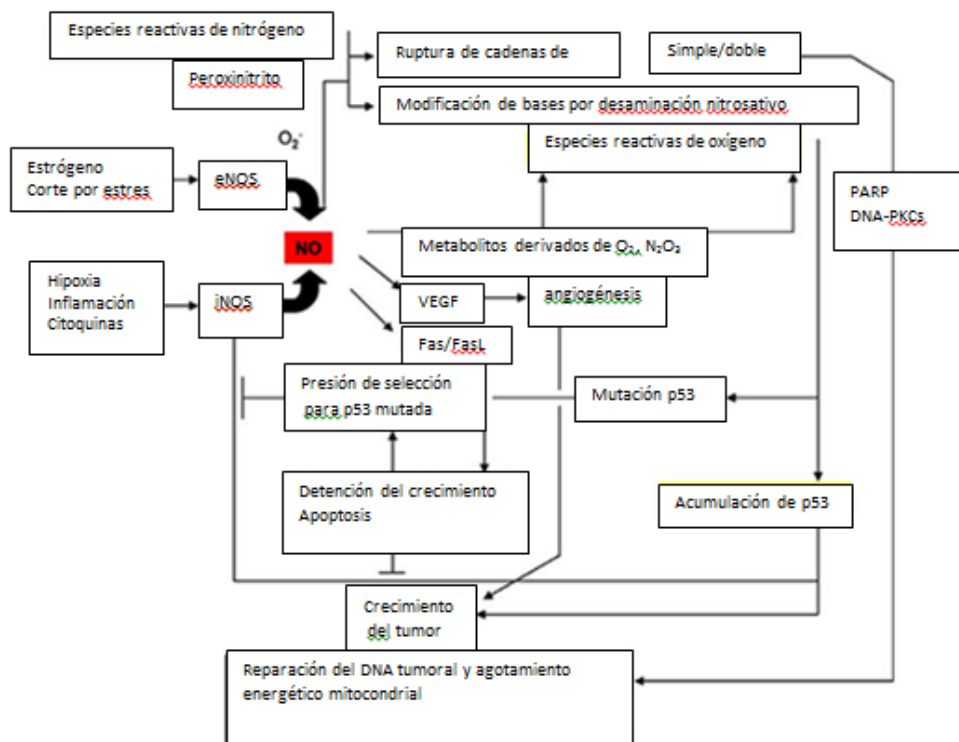


Figura 6. Vía iNOS .Modificada de (Yasui 2009).

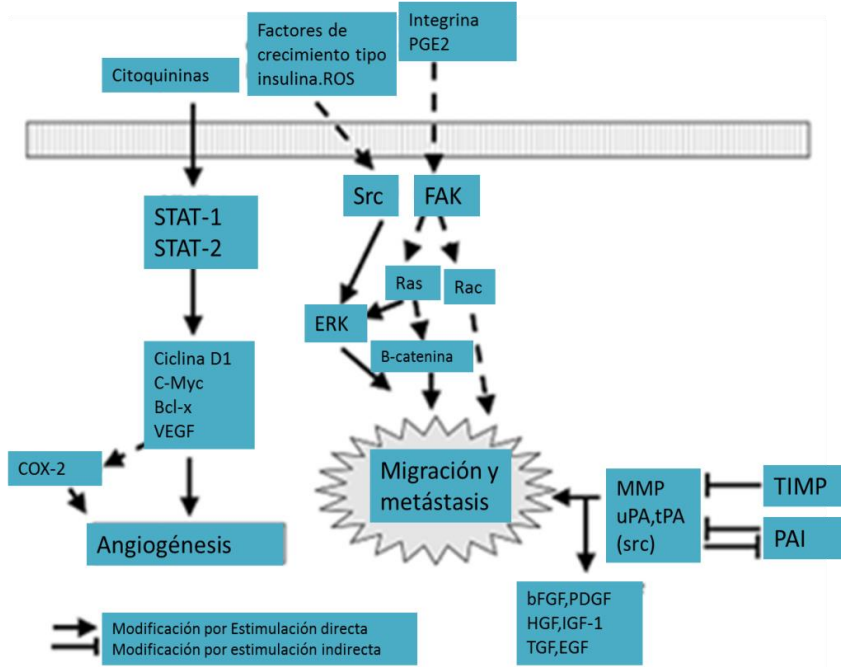


Figura 7. Pasos en la metástasis, mecanismos de invasión tumoral. Regulación en la formación de redes vasculares en tumores a través de STAT. Modificada de (Ramos 2008)

Otro de los marcadores biológicos del cáncer nombrado anteriormente son las poliaminas, moléculas de naturaleza policatiónica presentes en plantas, animales y microorganismos. Ejemplos de estas son: putrescina, espermidina y espermina. Debido a su naturaleza policatiónica, y alcalinizante son requeridas por las células eucariontes para su crecimiento, frecuentemente su expresión está desregulada en el cáncer (Huang 2005), proporcionando una buena posibilidad para detectarlo e iniciar tempranamente la terapia quimiopreventiva (Wallace 2003).

Las poliaminas pueden unirse y estabilizar a polímeros ricos en cargas negativas como el DNA, fosfolípidos y proteínas. Cuando la síntesis de poliaminas está inhibida, el ciclo celular se detiene o se retarda, por esto la mayoría de las células

eucariontes poseen un sistema de transporte ubicado en la membrana plasmática que facilita la captación de las poliaminas exógenas (Wallace 2001, Wallace 2003).

En mamíferos, los ejemplos más importantes de poliaminas son sin duda la espermina (cuatro grupos amino) y la espermidina (tres grupos amino), ambas formadas a partir de la descarboxilación de la ornitina, esta reacción se produce por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) que es la enzima que limita la velocidad de la biosíntesis de poliaminas(figura 8), y que está sobrerregulada en células preneoplásicas (Wallace 2003), tales como adenocarcinomas, leucemias, linfomas y melanomas (Jäne 1978, Suzanne 2008). El aumento de las poliaminas en el cáncer y su fácil identificación en el suero y la orina, podrían ser un excelente método para detectar las neoplasias, sin embargo, es decepcionante el poco uso que se da a este descubrimiento (Jäne 1978, Wallace 2001). En este ámbito varios modelos han demostrado que la inhibición de la actividad de ODC es una estrategia para la quimioprevención y la quimioterapia (Morgan 1998). Algunos de los inhibidores específicos de ODC más notables como la 2-difluorometilornitina (DFMO) han sido usados experimentalmente y validados en la estrategia antineoplásica, sin embargo, múltiples limitaciones bioquímicas y clínicas minimizan su valor como herramienta terapéutica, esto incluye la biodisponibilidad del inhibidor, el aumento del metabolismo de las poliaminas y de sus transportadores que permiten que la célula escape a los inhibidores específicos del crecimiento (Seiler 2003).

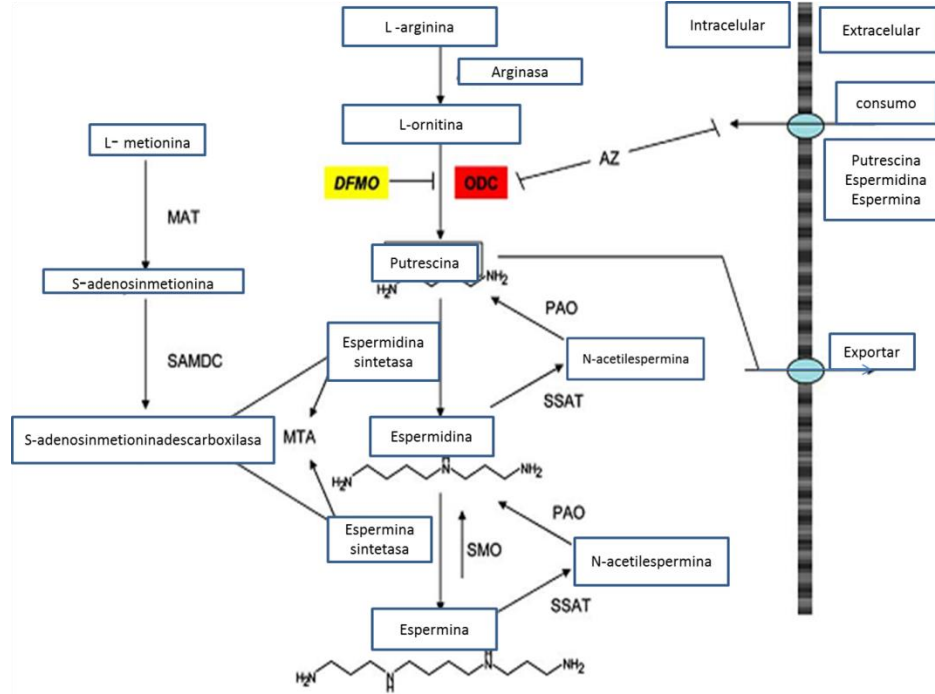


Figura 8. Vía metabólica de poliaminas en mamíferos:

MAT: metionina adenosiltransferasa; SAMDC: S-adenosilmetionina descarboxilasa, ODC: ornitina decarboxilasa; DFMO: difluorometilornitina; MTA: 5' metiltioadenosina, SSAT: espermidina/espermina acetyltransferasa; PAO: poliamina oxidasa; SMO, espermina oxidasa, AZ: antizima. Modificada de (Yasui 2009).

Otros biomarcadores para la carcinogénesis son los RNA no codificantes (Tomari 2005), como microRNA (miRNA) (Taylor 2008), que pueden servir de base para el desarrollo de nuevos agentes quimiopreventivos o terapias anticáncer (Kumar 2005, Vásques-Ortiz 2006, Melo 2010). Recientemente se ha descrito un defecto en el tráfico de miRNA en tumores murinos y células tumorales humanas, de colon, estómago, y endometrio que afecta a la exportina -5 (XPO5) proteína clave en el transporte de miRNAs, este hallazgo podría tener aplicaciones terapéuticas que deberían ser exploradas (Melo 2010).

10.- GENES QUE PARTICIPAN EN EL CÁNCER DE COLON.

Un gen importante es el DCC (del inglés deleted in colorectal Cancer) ubicado en el cromosoma 18q, la pérdida de esta región contribuye a la inactivación de este gen, cuyo producto proteico, posee la estructura de un receptor de superficie de la membrana celular que reconoce algunos componentes no identificados de la matriz extracelular, el contacto con estos compuestos parece representar una señal que comunica a las células normales del colon la detención de la proliferación. Como las células tumorales de colon pierden este receptor, se vuelven insensibles al contacto con los componentes de la matriz, y continuarán proliferando, formando un tumor, por esto el gen DCC es considerado un gen supresor de tumores (Catalan 2003), la pérdida alélica en el cromosoma 18q, también inactiva a otros genes supresores como el DPC4 y MADR2.

Otro gen importante es el gen supresor de tumores p53, como producto de este gen se genera la proteína p53 que controla el paso G1/S en el ciclo celular, esta proteína actúa en respuesta al daño del ADN intensificando la producción de la proteína P21 que inhibe al complejo quinasa dependiente de ciclina G1/S frenando el paso hacia S, y estimulando la apoptosis. La mutación de este gen ubicado en el cromosoma 17p parece ser un fenómeno tardío en la carcinogénesis colorrectal, permitiendo que el tumor siga creciendo con múltiples alteraciones genéticas y a la vez pueda evadir la detención del ciclo celular y la apoptosis (Bright-Thomas 2002).

Recientemente, se han implicado en el cáncer de colon, una tercera clase de genes, denominados genes de reparación del ADN, cuya función normal es reparar las mutaciones producidas especialmente por apareamiento incorrecto de bases, que pueden ocurrir durante el periodo S del ciclo celular previo a la mitosis (Galiano de Sanchez 2005). La deficiencia o inactivación de los genes de reparación conducen a la mutación e inactivación de los genes del receptor tipo II TGF- β , (que actúa como inhibidor del

crecimiento) , del receptores del factor de crecimiento insulina tipo II (Souza 1996) y de BCL 2 asociado a proteína X (BAX) (Markowitz 2009). Otra alteración genética que permite a las células tumorales evadir la apoptosis se produce por un aumento de la actividad de la telomerasa, esta enzima está presente en casi todos los cánceres incluyendo el cáncer de colon, pero rara vez en las lesiones benignas tales como los pólipos adenomatosos o los tejidos normales. Además, mecanismos epigenéticos tales como La metilación del ADN (Gryfe 1997), esta es una modificación caracterizada por la incorporación de grupos metilos en la citosina dentro de los islotes de dinucleótidos CpG. La regulación epigenética de la función génica juega un rol relevante en el desarrollo y la metilación es el mecanismo que asegura la expresión específica de tipos celulares de un limitado grupo o espectro de genes. Diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer, presenta patrones alterados de metilación que cambian el balance perfecto epigenético que existe en las células normales (Bird 1986). En las células tumorales, el patrón aberrante de metilación está caracterizado por una hipometilación global del ADN genómico que conduce a una inestabilidad genómica y por hipermetilación de las áreas promotoras, que conducen a silenciamiento génico (Esteller 2002). La represión transcripcional asociada a metilación aberrante de los islotes CpG en áreas promotoras es la consecuencia de intensos cambios de la estructura de la cromatina, producida por la interacción de metilcitosinas con diferente complejos proteicos que reclutan enzimas que modifican histonas, como las acetilasas y metilasas de histonas (Esteller 2006).

Pero sin lugar a dudas, uno de los genes fundamentales en la proliferación del epitelio de colon es APC (adenomatous polyposis coli) (Thliveris 1996), que se localiza en el cromosoma 5q21-q22 (Grodén 1991, Nishisho 1991, Thibodeau 1993) y está formado por 8535 pares de bases distribuidos en 15 exones, aunque posteriormente fue descrito como un gen dividido en 21 exones (Fearnhead 2001). En más del 60% de los casos de cáncer colorrectales esporádicos existen mutaciones inactivadoras del gen APC. También

se han descrito una frecuencia menor (12.5% en adenomas esporádicos pequeños) de mutaciones en β -catenina, que impiden la fosforilación de esta en los residuos Ser/Thr (Figura 9), y por tanto, su degradación en proteosoma (Bright-Thomas 2002). Se han descrito también mutaciones en la axina y otros componentes de la vía de señalización de Wnt (Figura 10), mediada por β -catenina-TCF, que es esencial para el mantenimiento del estado proliferativo/no diferenciado de las células del epitelio de colon (Wong 2002).

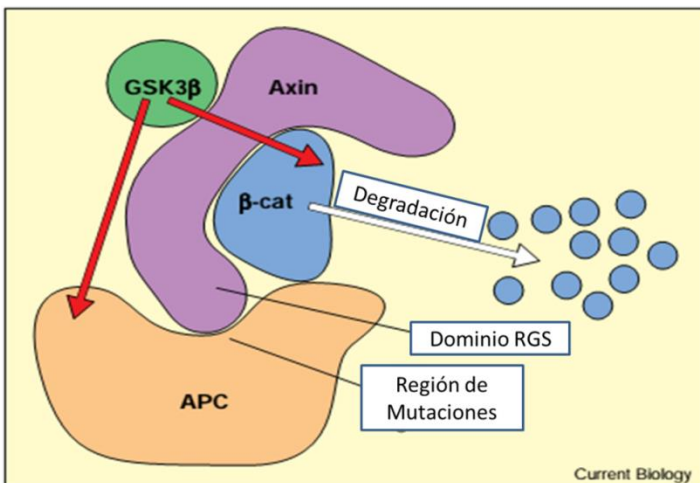


Figura 9. Interacción de β catenina y el gen APC. Modificado de (Hart 1998).

El exceso de β - catenina implica la unión de esta con el factor TCF4 que es el miembro predominante de esta familia de factores de transcripción en células epiteliales de colon; mediante la activación de esta vía se aumenta la expresión de oncogenes como *c-Myc* y ciclina D1 (Rubinfeld 1996, Tetsu 1999), como también ciclooxygenasa COX-2, MMP-7, proteína CD44 (Wong 2002). Además produce proliferación y transformación de las células epiteliales colónicas (Wong 2002, Catalan 2003, Cruz- Bustillo 2004). En este contexto es importante recalcar que las mutaciones que producen ganancia de función génica de β -catenina han sido identificadas en una gran cantidad de tumores de colon en los cuales el gen APC no se encuentra mutado, pudiendo actuar, por lo tanto, β -catenina como un oncogen (Cabrera 2005).

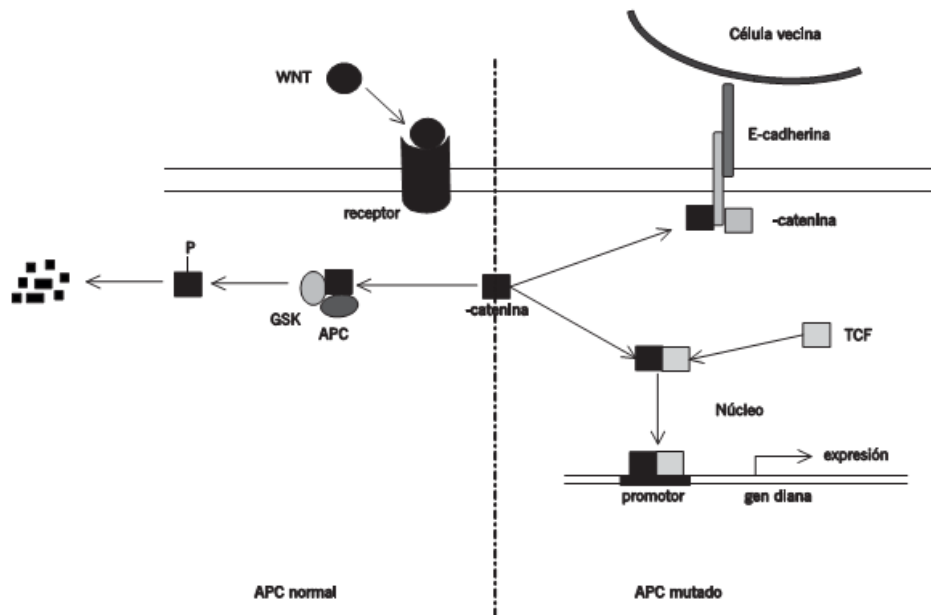


Figura 10. Vía WNT, comparación entre APC normal y mutado. Modificado de (Catalan 2003).

La proteína APC se encuentra en diferentes tejidos epiteliales, normalmente en células que experimentan procesos post-mitóticos, se distribuye difusamente en el citoplasma celular, aunque también se ha encontrado en las regiones apicales y laterales de las células epiteliales sanas. APC participa en diversos procesos celulares que incluyen proliferación, diferenciación, apoptosis, adhesión, migración y segregación cromosómica (van Es 2001), además se postula en cáncer de colon la inhibición de la angiogénesis y la disminución de la quimioresistencia a través de su acción sobre survivina (Mita 2008).

10.1.-ROL DE LA PROTEÍNA APC EN LA ADHESIÓN INTERCELULAR

APC en unión a β -catenina también participa en la adhesión celular epitelial. Ya que se asocian con las cadherinas, proteínas de membrana dependientes de calcio generando adhesión y comunicación intercelular (Yagi 2000). E-cadherina sirve también de anclaje al citoesqueleto de actina siendo por esto considerada supresora de la invasividad (Bracke 1996) . La interacción de la E-cadherina y la β -catenina está regulada por la fosforilación de esta última, proceso que sólo se puede realizar luego de formado el complejo con el homodímero de la proteína APC (Rubinfeld 1993, Su 1993, Rubinfeld 1996) . Por otra parte, APC contribuye a la migración ordenada de las células intestinales dentro de la cripta donde β -catenina juega un papel fundamental en esta función (Fearnhead 2001).

En el extremo amino-terminal (N), APC presenta la región conservada de repeticiones armadillo, que interacciona con la subunidad reguladora B56 de la proteína fosfatasa-2A y con el factor intercambiador de guanina (Kawasaki 2000). Estas dos proteínas están implicadas en la vía de señalización Wnt (Rubinfeld 1993, Huelsken 2001). Igualmente la proteína APC presenta sitios de unión con axina y conductina, dos proteínas inhibitoras de la ruta de señalización Wnt (Kinzle 1996).

Otros estudios han demostrado que el extremo carboxi-terminal (C) de la proteína APC está implicado en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica durante el proceso de mitosis (Green 2003), APC se localiza en los cinetocoros de los cromosomas en metafase, y participa en la unión a microtúbulos esta localización y función depende de su interacción con la proteína EB1 (Su 1995, Fodde 2003, Cabrera 2005). Debido a esto, aquellas células mutantes para APC tienen una gran abundancia de microtúbulos que son incapaces de unirse al cinetocoro (Green 2003) y por lo tanto son responsables del fenotipo de inestabilidad cromosómica (CIN) observado en estas células (Su 1995). La vía CIN, no sólo se asocia con la mutación de APC o la pérdida del cromosoma 5q que incluye

el gen APC, sino también la mutación de KRAS o la pérdida del cromosoma 18q y la supresión del cromosoma 17p que contiene el gen TP53, se requiere sólo una de estas anomalías moleculares para el desarrollo del cáncer colorrectal (Worthley 2010).

10.2.-PAPEL DE LA INESTABILIDAD GENÓMICA EN EL INICIO DEL PROCESO TUMORAL

Existen dos tipos fundamentales de inestabilidad genómica en el cáncer de colon: la inestabilidad en microsatélites (MSI) y la inestabilidad cromosómica (CIN).

Una de las causas de la MSI es el sistema de reparación MMR (del inglés, mismatch repair) la función de este sistema es eliminar errores en el apareamiento entre bases, especialmente en el ADN no repetitivo así como los lazos de inserción-delección que afectan al ADN repetitivo, estos lazos surgen como consecuencia de que la ADN polimerasa posee poca procesividad durante la replicación (Peltomäki 2001) estas fallas traen como consecuencias ganancias o pérdidas de unidades cortas repetitivas dentro de los microsatélites, lo que se conoce como MSI (Levitt 2002). Tanto en tumores colorrectales esporádicos como hereditarios (HNPCC), se puede encontrar MSI, pero es una característica distintiva de tumores colorrectales HNPCC (Benito 2006). La mayoría de los tumores que presentan MSI es producto de la inactivación de uno de los genes MMR, hMLH1, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 o genes hPMS2 que contribuyen al desarrollo de cáncer de colon hereditario no polipósico (Kinzle 1996, Gryfe 1997, Peltomäki 2001). La inactivación de hMLH1, es resultado mayoritariamente de la hipermetilación y no de mutaciones somáticas o pérdida de heterocigosis, lo que actualmente conocemos como epigenética (Markowitz 2009). La imposibilidad de reparar el ADN produce que la mayoría de los tumores de cáncer de colon presenten inestabilidad de microsatélites, también conocida como error de replicación fenotipo positivo (Thibodeau 1993, Peltomäki 2001, Levitt 2002). La carcinogénesis por esta vía, provoca un aumento de 100 a 1.000 veces la

velocidad de mutación en comparación con una célula normal. Además, las mutaciones en los microsatélites recaen sobre genes que regulan la proliferación celular, especialmente aquellos que contienen secuencias repetitivas como diana de mutación (Levitt 2002). En HNPCC además de la mutación heredada en los genes MMR, se requiere de otra mutación somática para que se inactiven ambas copias del gen. Debido al error en el sistema MMR las fallas que ocurren normalmente durante la replicación del ADN permanecen sin corregirse y de esta manera se acumulan mutaciones provocando alteraciones del genoma, que pueden desencadenar el cáncer colorectal y otros tipos de cáncer, por esto, la iniciación de dicho tumor está seguida de una rápida progresión gracias a la aceleración de la velocidad de mutación (Hahn 1999). La probabilidad de que un individuo con un defecto en el sistema MMR desarrolle un adenoma pudiera no ser mayor que el de la población general, sin embargo, una vez que se origine el adenoma, su progresión a cáncer será más rápida (Cruz- Bustillo 2004). MSI conduce a una alta velocidad de mutaciones puntuales, mientras que la CIN se refiere a un aumento de la velocidad en la acumulación de desórdenes cromosómicos (Peltomäki 2001, Cruz- Bustillo 2005, Michor 2005).

En concreto, se han detectado mutaciones heterocigotas del gen regulador hBUB1 en una pequeña porción de tumores colorrectales con fenotipo de inestabilidad cromosómica, tanto en ratón como en células humanas (Cahill 1998). Estos resultados se han confirmado igualmente, mediante estudios de fusión celular que indican que el fenotipo CIN tiene un efecto dominante que requeriría un único evento mutacional o "*hit*" para producir un fenotipo CIN (Cahill 1998).

En estudios realizados en el modelo de ratón APC¹⁶³⁸ que presenta una mutación sin sentido del codón 1628 del gen APC, pero que retiene la región de regulación dependiente de β -catenina, se aislaron células madres, que presentaron inestabilidad cromosómica (Fodde 2001), sin embargo, los ratones que se desarrollaron fueron viables y

no presentaron tumores. En contraposición, en el modelo clásico APC^{Min} que lleva una mutación sin sentido en el codón 850 que trunca la región amino-terminal necesaria para la función dependiente de β -catenina, los animales heterocigotos APC+/Min desarrollan numerosos adenomas en el intestino. Estas observaciones ponen de manifiesto la ventaja selectiva que presentan las células tumorales de colon cuando pierden la función dependiente de β -catenina, por lo tanto, la inestabilidad cromosómica resultante es una consecuencia de esta pérdida y no el proceso desencadenante del tumor. Otros autores, realizan un estudio sistemático del espectro de mutaciones específicas en series de la Vía APC (APC, β catenina, y Axina), de la Vía (p53, Mdm 2 y Bax) como de la Vía RAS (Kras y Braf) ,concluyendo que 1/3 de los cánceres con Inestabilidad de microsatélites, contiene mutaciones en β catenina y no en el APC. Esto sugiere que CIN se produce antes que la inactivación de APC (Michor 2005).

10.3.- LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN Wnt Y SU RELACIÓN CON LA PROLIFERACIÓN CELULAR

El desarrollo de tejidos y órganos en embriones está controlado por varias vías de señalización que interactúan para ofrecer información e inducir la especificación del destino celular. Uno de los sistemas principales de señalización es la vía Wnt (Huelsen 2001). Las proteínas Wnt dirigen la diferenciación de varios tipos de célula desde embriones de insectos hasta vertebrados (Cruz- Bustillo 2004). También se ha demostrado que esta vía es esencial para mantener el compartimiento de las células madre en las criptas intestinales, y que están implicados en el cáncer de colon (Liu 1992, Wielenga 1999, Polakis 2000, Boon 2002). Las proteínas de Wnt, provenientes probablemente de células mesenquimales o epiteliales de la parte inferior de la mucosa (debajo de la cripta) son las encargadas de mantener el potencial proliferativo (Huelsen 2001), garantizando por una parte la supervivencia y/o mantenimiento del nicho de células madres, y frenando por otra, la transición de proliferación a diferenciación. Así pues, los genes activados por la

vía de Wnt (Figura 11), se expresan en el compartimento proliferativo de la cripta y en la mayoría de los casos se encuentran sobre-expresados en tumores colorrectales (Wielenga 1999), mientras que los genes reprimidos por esta vía están restringidos al compartimento terminalmente diferenciado (Van de Wetering 2002).

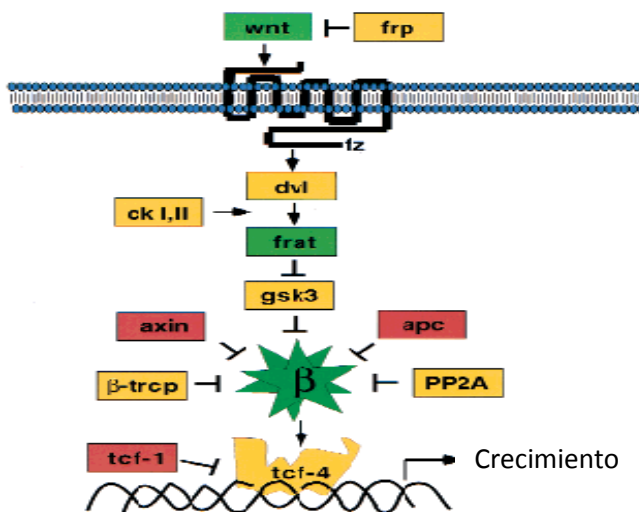


Figura 11. Los oncogenes y supresores de tumor en la vía de señalización de Wnt. Líneas que terminan con flechas o barras indican efectos activadores o inhibidores, respectivamente. Verde y rojo indican protooncogénica y actividad supresora de tumores, respectivamente, en el cáncer humano y animales transgénicos. Modificada de (Polakis 2000).

Todas estas alteraciones contribuyen a la activación constitutiva del complejo β -catenina-TCF en las criptas, un bloqueo de la migración/diferenciación así como la proliferación descontrolada que contribuyen a la formación de pólipos, una de las primeras alteraciones neoplásicas durante la carcinogénesis del colon.

La expresión de algunos de los genes diana de β -catenina-TCF se encuentra alterada en tumores colorrectales. Por ejemplo: C-myc que contribuye a la supresión de la salida del ciclo celular al reprimir la expresión de p21 (Rubinfeld 1993, Corzo 2003).

Se han descrito niveles elevados de Ciclina D1, tanto en adenocarcinomas humanos como en pólipos adenomatosos (Tetsu 1999, Wong 2002). CD44, es otro mediador importante de la interacción célula-matriz extracelular y cuya sobreexpresión conduce a

un incremento en la movilidad celular, progresión tumoral y metástasis. Otra proteína, la Matrilisina (MMP-7), metaloproteínasa se encuentra sobre-expresada en más del 90% de tumores colorrectales, y aunque se ha asociado su expresión a la invasión estromal y metástasis, también se piensa que pueda tener un papel importante en etapas tempranas de la carcinogénesis (Adachi 1999).

Otro de los oncogenes relacionados con la proliferación del cáncer colorrectal es el c-Src, que codifica una proteína tyrosina Kinasa que está asociada a receptores de superficie celular, el aumento de su actividad sugiere progresión del cáncer ya que promueve otras señales proliferativas (Liu 1992, Boon 2002). Para estudiar las consecuencias de los aumentos en los niveles de c-Src y la actividad con el crecimiento de las células de cáncer de colon, en etapas posteriores de carcinogénesis de colon humano, se han desarrollado líneas celulares de cáncer de colon en las que los niveles y la actividad c-Src podría ser inducible, aumentando el control en una expresión salvaje cSrc o de los mutantes constitutivamente activos (Welman 2006). Los resultados indican que, en etapas más avanzadas de carcinogénesis de colon, los aumentos en los niveles y actividad de c-Src es probable que tengan funciones distintas de la promoción directa del crecimiento del tumor (Welman 2006). Los niveles y la actividad de c-Src en las células de cáncer colorrectal aumentan de manera uniforme durante el curso de carcinogénesis colorrectal y son más elevados en enfermedad metastásica avanzada.

11.- PROCESOS GENERALES DE MIGRACIÓN CELULAR.

En algunos tumores, las células malignas se mezclan con las normales o las pueden reemplazar en un espesor de varios milímetros sin romper la membrana basal ni pasar al tejido adyacente. Estos tumores se denominan carcinomas *in situ*, pero que con el tiempo, y de no diagnosticarse ni tratarse, pueden romper la membrana basal y crecer en el estroma que los rodea, transformándose en carcinomas infiltrantes (Liotta 1977, Liotta

1986). De esta manera, el cáncer de colon progresa, desde una lesión simple en la cripta hasta producir metástasis (Michor 2005), una de las características más indeseadas del cáncer (Liotta 1991, Powell 1996, Chin 2005). Sin embargo, el proceso de metástasis es ineficiente, y sólo una pequeña proporción de células progresan en nuevos sitios amenazando la vida, el descubrir las razones de esta ineficiencia podría ser importante en el diseño de una terapia antimetastásica (MacDonald 2002).

La invasión tumoral es un proceso mediado por proteasas, que degradan la matriz extracelular y facilitan la progresión tumoral, entre ellas las MMPs (Chambers 1997, Sardinha 2000). Particularmente, MMP-2 y MMP-9 presentan actividad proteolítica contra proteínas de la membrana basal tales como colágeno tipo IV, contribuyendo al desarrollo del tumor (Bjorklund 2005).

La metástasis es un proceso de varias etapas en una cascada, donde se relacionan varios pasos incluyendo invasión, migración, adhesión, infiltración, colonización de nuevos sitios distantes y la formación de nuevos capilares (Liotta 1986, Liotta 1991, Woodhouse 1997, Weng 2011). Por esto la activación de las MMPs es un factor clave en el proceso metastásico, y los agentes con actividad inhibitoria tienen un gran potencial en el tratamiento y prevención del cáncer (Chambers 1997, Ko 2005)

El potencial invasivo de las células malignas depende de tres fenómenos: Alteración en la adhesión celular; degradación proteolítica localizada en la matriz extracelular y ; movilidad de las células tumorales (Liotta 1977, Liotta 1986). De ahí que en la metástasis, las células malignas de un tumor primario deben atravesar e invadir a través de las células de los tejidos del huésped y la matriz extracelular (MEC), entrar a la circulación, llegar a un lecho vascular distante, extravasar y penetrar la MEC para pasar a los intersticios de un órgano blanco, proliferar como una nueva colonia e inducir la

formación de nuevos vasos que hagan posible mantener su crecimiento (Chambers 1997, Weng 2011).

11.1.- DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.

La superación de esta barrera por las células invasivas implica la degradación localizada de los distintos componentes de la matriz extracelular, tales como laminina, fibronectina, vitronectina y colágeno, así como la modulación de las enzimas proteolíticas de vías intracelulares que regulan la organización de su esqueleto y la expresión de genes (Weng 2011). El incremento de la actividad proteolítica puede ser debido al aumento en la producción de las proteasas, la estimulación de los mecanismos de activación de las mismas o a una disminución de los niveles de sus inhibidores (Chambers 1997, Balbin 1999, Brew 2000).

Las proteasas pueden clasificarse en 5 grupos:

- 1.-aspartil-proteasas (como la catepsina D o el pepsinogeno C),
- 2.-cistein-proteasas (como las calpaínas y las catepsinas del tipo B, C, H, K, L, O, S o Z
- 3.- Serin- proteasas, (como la tripsina, quimiotripsina y subtilisina)
- 4.-treonin-proteasas (como proteasoma, MAPK (ERK))
- 5.-metaloproteasas, (como la matrilisina MMP-7)

Los grupos 1,2, 3 y 4 según el elemento esencial de su centro activo son un residuo de ácido aspártico, cisteína, serina, treonina y en el grupo 5 un catión Zn^{+2} (Powell 1996). En la degradación proteolítica de la matriz extracelular participan fundamentalmente proteasas pertenecientes a los grupos: metaloproteasas (MMP, matrix metaloproteasas) y serin-proteasas (Cadiñanos 2009). Dentro de las primeras se encuentra la matrilisina (MMP-7) que juega un rol en la invasión celular (Chambers 1997) y está sobreexpresada en el cáncer gastrointestinal (Adachi 1999). La degradación de la membrana basal y la matriz

extracelular aumenta la morbilidad del cáncer, la invasión y la metástasis (Powell 1996, Chambers 1997, Bjorklund 2005, Weng 2011).

11.2.- METALOPROTEASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.

Estas proteasas son sintetizadas como precursores inactivos que requieren la eliminación proteolítica de un propéptido para su activación. Su pH óptimo es neutro y son inhibidas por agentes quelantes, como por un grupo de proteasas denominadas TIMPs ("tissue inhibitors of metallo-proteinases") (Powell 1996, Chambers 1997). Dentro de las metaloproteinasas de la matriz celular, se encuentran, colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas y metaloproteasas de membrana o MT-MMPs. Se han descrito tres grupos de colagenasas humanas, la colagenasa-1 o colagenasa intersticial de fibroblastos (MMP-1), la colagenasa-2 o de neutrófilos (MMP-8) y la colagenasa-3 (MMP-13). Estas enzimas degradan los colágenos fibrilares, generando fragmentos de 3/4 y 1/4 del tamaño original de la molécula, estos fragmentos se desnaturalizan a la temperatura corporal, convirtiéndose en gelatina (Knäuper 1996). La expresión tumoral de la colagenasa-3 se ha asociado con la invasividad local de los tumores (Bjorklund 2005).

El grupo de las gelatinasas está integrado por dos enzimas, la gelatinasa A (MMP-2) y la gelatinasa B (MMP-9), ambas enzimas son capaces de degradar el colágeno tipo IV que forma parte de las membranas basales de los epitelios (Chambers 1997), esto sugiere un papel decisivo en la capacidad de las células tumorales de origen epitelial para atravesar dichas membranas basales e invadir el estroma de los tejidos circundantes (Adachi 1999). Las primeras evidencias de la participación de gelatinasas y estromelinas en la invasión tumoral derivaron del aumento de su expresión en las células tumorales más agresivas. Posteriormente, han sido estudiadas mediante el análisis de cohortes de tumores, transfecciones de líneas celulares tumorales, ensayos de invasión *in vitro*, y

finalmente, mediante el desarrollo de modelos animales transgénicos y "knock-out" (Powell 1996). Las matrilisinas son las MMPs más simples estructuralmente, y presentan una potente actividad frente a diversos componentes de la matriz extracelular (Uria 2000, Bjorklund 2005).

Durante el proceso de invasión tumoral la degradación de la matriz extracelular debe ser de manera controlada, tanto temporal como espacialmente, de forma que el estroma no sea una barrera que impida el avance de las células tumorales (Brew 2000), pero que al mismo tiempo le proporcione los puntos de apoyo necesarios para su locomoción (Chambers 1997). En algunos casos las proteasas no son secretadas por las células tumorales, sino por las células estromales localizadas en sus cercanías, quienes las sintetizan en respuesta a factores expresados por las células tumorales, como parece ser el caso de la colagenasa-3 (Uria 1997). actualmente se sabe que desempeñan un papel significativamente más complejo, que sólo destruir la matriz extracelular, participando también en el crecimiento de las tumores primarios y de sus metástasis (Chambers 1997, Cairns 2003).

La función de las MMPs , especialmente la MMP 7 o matrilisina en la invasión tumoral de cáncer de colon, sugiere como alternativa terapéutica, la posibilidad de controlar su expresión o su actividad (Friedl 2003). Se han obtenidos resultados prometedores utilizando inhibidores sintéticos de metaloproteasas, algunos de estos compuestos se encuentran actualmente en ensayos clínicos de fase II y III, y los resultados publicados indican que pueden ser de utilidad como terapia adyuvante en pacientes con metástasis (Brown 1999).

12.- INVASIÓN CELULAR

12.1.- SERIN-PROTEASAS IMPLICADAS EN INVASIÓN CELULAR.

Además de las MMPs, también se ha observado que las serin- proteasas, constituyen el sistema activador de plasminógeno-plasmina , participando en la invasión tumoral (Brew 2000). Se han descrito dos tipos de estos activadores, tipo tisular(tPA) y tipo uroquinasa (uPA) que procesan plasminógeno para generar plasmina, una serin-proteasa capaz de degradar fibrina y componentes de la matriz extracelular como fibronectinas, laminina y proteoglicanos (Weng 2011). Además, la plasmina puede activar los precursores de diversas metaloproteasas iniciando así una cascada proteolítica, de tal manera que la activación de pequeñas cantidades de Plasmina conduce a la obtención de elevadas concentraciones de proteasas activas (Weng 2011). El sistema está regulado por inhibidores específicos, como los denominados PAI- 1 y PAI-2. La activación de las MMP se inicia con la activación de uPA, a través de la unión con el receptor del activador uroquinasa (uPAR) (Andreasen 1997), uPA fue la primera proteasa a la que se le asignó utilidad como marcador de mal pronóstico en carcinomas humanos (Weng 2011). Se ha observado, los activadores del plasminógeno también participan en la degradación de la matriz extracelular perivascular, facilitando así la invasión de las células endoteliales y promoviendo la angiogénesis (Andreasen 1997).

12.2.-ENDOGLICOSIDASAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DE METASTASIS.

Además de las proteínas, cuya degradación es llevada a cabo por las MMPs y las serin-proteasas, hay que considerar que la matriz extracelular está formada por otros compuestos tales como los glicosaminoglicanos, y principalmente los proteoglicanos como heparan sulfato (Eccles 1999). Debido a esto, las enzimas que los degradan, desempeñan un papel similar y complementario al que tienen las MMPs y los activadores del plasminógeno en la progresión tumoral. La sobreexpresión del gen que codifica esta

enzima es suficiente para aumentar el potencial metastásico de las células tumorales (Hulett 1999, Vlodavsky 1999). La heparanasa, junto con las MMPs y los activadores del plasminógeno, son capaces de eliminar la barrera física que las láminas basales de los epitelios y la matriz extracelular suponen para la diseminación de las células tumorales, además participan en la regulación de los niveles de factores de crecimiento y citoquinas. Los heparan sulfatos mantienen secuestrados a factores de crecimiento como el bFGF, de donde pueden ser liberados por acción de la heparanasa. Esta enzima también puede liberar tPA y uPA de reservorios similares, incrementando una cascada proteolítica y mitogénica (Eccles 1999).

El fenotipo invasivo de las células tumorales implica la capacidad de moverse activamente, correlacionando este movimiento con su potencial metastásico (Volk 1984). Las células invasivas pueden moverse en respuesta a factores extracelulares solubles de una manera direccional (quimiotaxis), aleatoria (quimiocinesis), o en respuesta a componentes inmovilizados en la matriz extracelular (haptotaxis) (Lauffenburger 1996). Este movimiento es de tipo ameboide, e implica constantes reordenaciones del citoesqueleto y continuas modificaciones en los puntos de unión con la matriz extracelular (Bottaro 1991). Este proceso está regulado por las proteínas G monoméricas, Cdc42, Rac y Rho, todas ellas pertenecientes a la superfamilia de proteínas Ras (Lauffenburger 1996), que participan en cascadas comunes de señalización intracelular, además en los puntos de unión participan las integrinas presentes en la membrana plasmática de las células tumorales con sus ligandos de la matriz extracelular, proporcionando la fijación para el desplazamiento de la célula (Keely 1997). Las moléculas que regulan estos mecanismos podrían actuar como promotores o como supresores de metástasis, según estimulen o inhiban la movilidad celular (Gómez 1997). Otra proteína Nm23 ha sido identificada como supresora de metástasis en diversos tipos celulares, ya que su sobreexpresión es capaz de suprimir la movilidad de células de melanoma y de

cáncer de mama (Freije 1996). Su mecanismo de acción, podría estar relacionado con su capacidad de fosforilar a proteínas de la cascada de señalización intracelular en residuos de histidina (Kantor 1993, Freije 1996).

Los factores extracelulares capaces de estimular la movilidad de las células tumorales se clasifican generalmente en tres grupos: (1) factores autocrinos, secretados por las propias células tumorales; (2) factores paracrinos, secretados por las células del huésped, (3) proteínas de la matriz extracelular. Los factores autocrinos son los principales responsables de la capacidad invasivas de las células tumorales (Bottaro 1991).

Los tres factores de movilidad autocrinos mejor caracterizados son: el factor de crecimiento de hepatocitos, también conocido como "scatter factor" (HGF/SF), la autotaxina (ATX) y el IGF-II (factor de crecimiento tipo insulina). El HGF/SF es el ligando del protooncogen c-Met, una tirosina quinasa (Bottaro 1991), y posee capacidad de inducir la separación de las células epiteliales (Stracke 1992). La autotaxina (ATX) es una fosfodiesterasa, potente estimulador de la movilidad celular, que parece actuar a través de un receptor de membrana acoplado a proteínas G (Murata 1994). El segundo grupo de factores de movilidad solubles, los factores paracrinos, son secretados por las células del huésped, y se conocen también como "homing factors" porque estimulan la migración de las células invasivas hacia los órganos que los producen facilitando así el establecimiento de metástasis en los mismos. Entre estos factores se pueden incluir moléculas como el IGF-I, la interleuquina-8 o la histamina. Además, diversos componentes de la matriz extracelular pueden estimular la movilidad de las células cancerosas, como por ejemplo, fibronectina, laminina, o el colágeno tipo IV, ya sea cuando están inmovilizadas en la matriz o luego de ser solubilizadas por proteasas de los tumores (Klominek 1993).

13.- ANGIOGENESIS

La formación de nuevos vasos sanguíneos es indispensable para el crecimiento de un tumor maligno, demostrándose una correlación entre el incremento del número de vasos sanguíneos y la prognosis del tumor (Araújo 2011), esto se debe a que el tumor no puede crecer más de 2mm debido a la falta de oxígeno y otros nutrientes esenciales, de ahí que la angiogénesis es fundamental para el paso de un tumor latente a uno maligno (Weng 2011).

Se han identificado y caracterizados reguladores positivos (promotores) de la angiogénesis, incluyendo factores de crecimiento tales como VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular), FGF α , FGF β (factor de crecimiento de fibroblastos), EGF (factor de crecimiento epidérmico), TGF $-\alpha$, TGF β , SDF1/CXCL12 (factor derivado del estroma), TNF- α , angiopoyetina, angionina, interleuquina-8, entre otros. Estos activan cascadas de transducción de señales que convergen a nivel de las GTPasas de la familia Rho (Dvorak 1995, Weng 2011) . Estos procesos, representan blancos terapéuticos potenciales para el desarrollo de agentes anticancerígenos (Dvorak 1995, Slattery 2011).

El factor inducible de hipoxia (HIF) 1A y 2A también está involucrado en la inducción del fenotipo invasivo y metástasis. El HIF1A es degradado por una ligasa de ubiquitina E3 en condiciones normóxicas, sin embargo, este factor se acumula debido a un aumento de estabilidad de la proteína durante la hipoxia, el HIF1A regula numerosos genes blanco que están involucrados en la angiogénesis (Weng 2011). En contraste varias proteínas incluyendo a la trombospondina 1, endostatina, y tumstatina tienen una actividad que previenen la angiogénesis y por lo tanto se clasifican como inhibidores de la angiogénesis (Weng 2011). La inactivación de P53 en las células tumorales bloquea la expresión de la trombospondina facilitando la angiogénesis (Hanahan 1996).

Se ha visto que compuestos que se encuentran en alimentos de origen vegetal como polifenoles de la dieta actúan en diferentes fases del desarrollo tumoral, específicamente en los procesos de migración, invasión y angiogénesis, no solo mostrando un importante potencial quimioprotector, sino también terapéutico (Surh 2003, Azios 2005, Lu 2008, Adhami 2009).

14.- ALIMENTOS Y CÁNCER

La función del colon es principalmente, absorber agua, las sales de las heces (Potter 1999) y propulsarlas al recto previo a la defecación (Tanaka 2009). A medida que las heces avanzan por el colon se van deshidratando por lo que el moco producido por las glándulas intestinales adquiere gran importancia en la lubricación, esta producción es de aproximadamente 3 litros al día (Tanaka 2009). Junto con los compuestos no degradados, las heces también contienen sustancias tóxicas en algunos casos, derivadas del metabolismo de los pigmentos biliares primarios, por la microbiota intestinal, esos pigmentos biliares secundarios pueden actuar como procarcinógenos desencadenando desarrollo tumoral (Viñes 2003), de ahí que el cáncer de colon parece estar asociados a dietas ricas en grasas y pobres en fibra (Van der Logt 2003). También se piensa que una baja periodicidad de la evacuación intestinal podría ser una variable que aumenta el tiempo de exposición del epitelio a los tóxicos y por lo tanto la probabilidad de cáncer de colon.

La suma de diferentes conductas aumenta el riesgo de padecer cáncer. Esta enfermedad multifactorial o poligénica cuenta con muchos factores que influyen en su inicio y desarrollo. El consumo de alcohol, cigarrillos y otros (Anand 2008), junto a una mala dieta generan el ambiente propicio para el cáncer (Robles-Agudo 2005).

Los alimentos incluidos en la dieta ayudan a prevenir o proteger del cáncer, ya que según datos epidemiológicos el riesgo de cáncer, es menor en aquellas poblaciones

con un alto consumo de frutas y hortalizas (Davis 2009), sin embargo, otros alimentos generan las condiciones para el desarrollo tumoral, en estos casos hablamos de alimentos que contienen sustancias carcinógenas como los hongos que producen Micotoxinas, durante el proceso de almacenamiento del maíz, o las aflotoxinas que atacan principalmente al hígado (Hardisson 1998), como también los compuestos N-Nitrosos (nitrosaminas y nitrosamidas), que aunque no están en forma natural en los alimentos, se forman como una reacción entre las aminas y el nitrito sódico.

Los alimentos que han sido cultivados en zonas con elevada contaminación ambiental presentan hidrocarburos aromáticos policíclicos debido a la combustión de derivados del petróleo y, también, los encontramos en alimentos preparados a las brasas o ahumados, esto es debido a que las temperaturas muy altas en la preparación de los alimentos producen sustancias inductoras del cáncer por pirólisis de los hidratos de carbono y las grasas (Who 2003). También durante el cocinado de carnes y pescados se forman aminas aromáticas heterocíclicas debido a la reacción entre proteínas y los azúcares (Robles-Agudo 2005).

Además se asocia el consumo elevado de carnes rojas y cáncer de pulmón, de alimentos ahumados y adobados con cáncer de esófago y estómago, y del consumo elevado de conservas de carnes y pescados con el cáncer colorrectal (Who 2003). Por el contrario la asociación sería inversa con el consumo de productos lácteos (Breslow 2000). El consumo de alimentos vegetales trae consigo una gran cantidad de compuestos protectores del cáncer y se ha asociado el consumo de algunos de ellos con la prevención específica del cáncer (Bingham 2003, Kaur 2006, Adhami 2007, De Kok 2008, Davis 2009, Lea 2010). Sin lugar a dudas la presencia de los polifenoles en la dieta genera un punto de estudio importante en la protección de varias enfermedades incluyendo el cáncer (Weng 2011), sin embargo, la forma de consumo es fundamental, ya que el consumo de frutas y

vegetales sometidos a altas temperaturas disminuye el efecto quimioprotector (Robles-Agudo 2005).

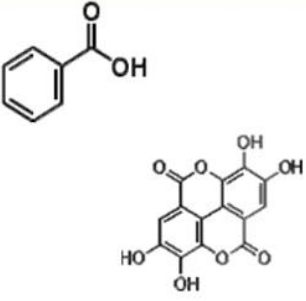
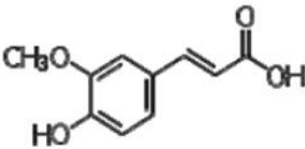
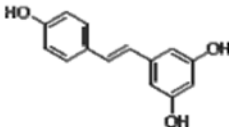
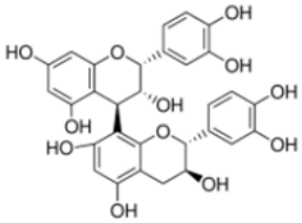
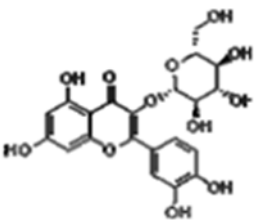
15.- FENOLES

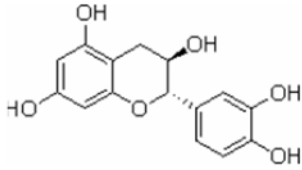
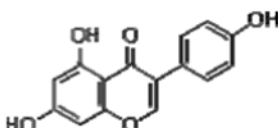
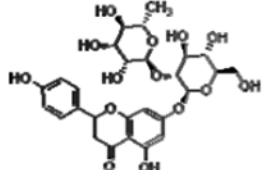
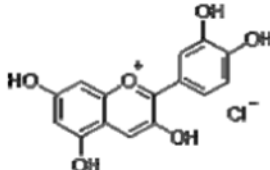
Químicamente, los compuestos fenólicos poseen diversas estructuras pero pueden ser definidos como sustancias que poseen un anillo aromático con uno o varios grupos hidroxilos ,pudiendo ser categorizados como ácidos fenólicos, monofenoles, polifenoles (Ramos 2008).

Los polifenoles son fitoquímicos derivados de la fenilalanina y contienen anillos aromáticos con grupos reactivos hidroxilos (Signorelli 2005), pueden ser divididos en diferentes clases, dentro de los cuales están los flavonoides y los ácidos fenólicos (Signorelli 2005, Weng 2011). Como agentes quimiopreventivos restauran el crecimiento celular anormal por modulación de la proliferación, apoptosis, angiogénesis, metástasis, antiinflamación y la modulación de blancos moleculares tales como ciclina D1,CDK 4, receptores de estrógeno, TNF α , proteínas antiapoptóticas etc. Además modulan vías bioquímicas implicadas en la motilidad, diferenciación y viabilidad, obteniendo un efecto final tanto preventivo como terapéutico del cáncer de colon (Ramos 2008).

El resto de grupos incluye a: fenoles simples, fenilpropanoides, derivados del ácido benzoico y estilbenos. Estos poseen una fuerte actividad antioxidante y, actualmente, se sugiere una efectiva inhibición del cáncer tanto en la invasión y la metástasis (Weng 2011). Los diferentes grupos de polifenoles extraíbles se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Polifenoles extraíbles. Modificada de (Arranz 2010).

POLIFENOLES EXTRAÍBLES (PE)		ESTRUCTURA
ÁCIDOS BENZOICOS	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	
	Ácido gálico Ácido protocatéquico Ácido vanílico Ácido siringico Ácido elágico Ácido tánico Ácido gentísico	
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS	Ácido clorogénico	
	Ácido cafeico Ácido ferúlico Ácido sinápico Ácido <i>trans</i> -cinámico	
ESTILVENOS	Resveratrol	
PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍBLES	Dímeros A, B Oligómeros (GP 3-10) Polímeros	
FLAVONOLES	Rutina Quercetina Miricetina Kaemferol Glicosidos de quercetina	

FLAVANOLES	Catequina Epicatequina Galocatequina Epicatequin galato Epigallocatequin galato Galocatequin galato	
ISOFLAVONAS	Daicina Genistina Daiceína Genisteína	
FLAVANONAS	Naringenina Naringina Hesperetina Hesperidina Floridcina	
ANTOCIANIDINAS	Malvidina Cianidina Delphinidina Petunidina Glicósidos de antocianidinas	

16.- EFECTOS DE LOS POLIFENOLES.

Diferentes estudios han demostrado que los polifenoles tienen efectos antiproliferativos *in vitro* y específicamente, en células de cáncer de colon (Seeram 2004). También hay pruebas que los polifenoles presentes en la fruta y verduras pueden prevenir enfermedades como el cáncer y otras (Kaur 2006, De Kok 2008, Davis 2009, Johanningsmeier 2011).

Los Flavonoides se originan a partir de la fenilalanina y la tirosina en muchas clases de plantas (Figura 12) y sus derivados o metabolitos secundarios son ampliamente

conocidos por sus propiedades farmacológicas (Weng 2011).

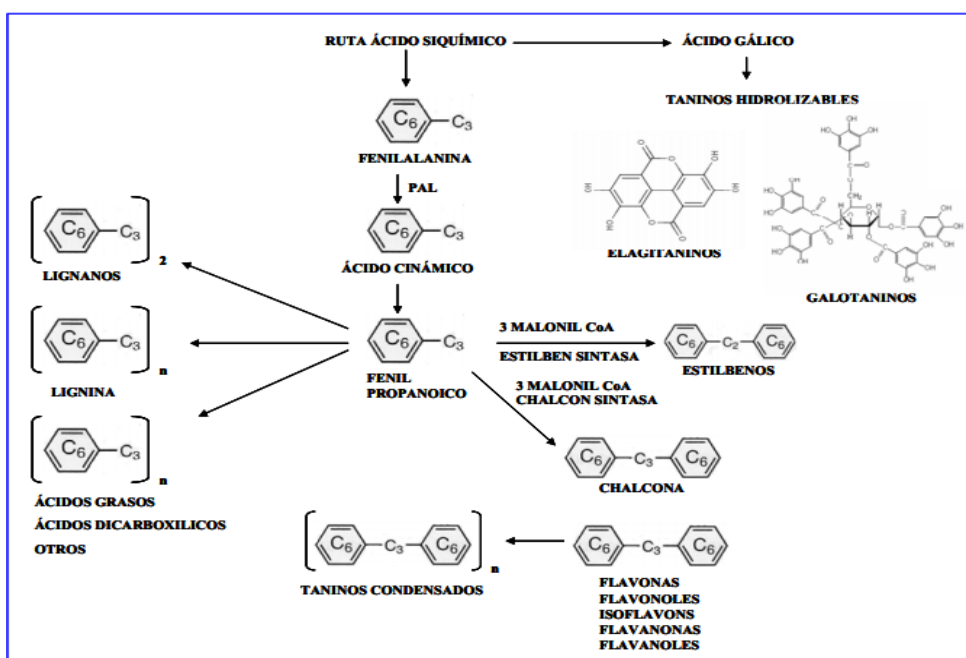


Figura 12. Producción de flavonoides y estilbenos a partir de cumaril CoA y malonil CoA .
Modificada de (Nacz 2004).

También, poseen virtudes protectoras contra los síntomas del envejecimiento y disminuyen la incidencia de infecciones (Weng 2011). Catequinas o catecoles son derivados polihidroxiados incoloros de la flavona. Las más comunes son los ésteres gálicos, llamados epicatequina (EC), galato de epicatequina (GEC) y galato de epigalocatequina (EGCG), la principal aplicación clínica es suprimir la activación de carcinógenos , detoxificar y atrapar a los agentes causantes del cáncer (Khan 2007). Además, diferentes estudios demuestran que EGCG presentes en el jugo y la cáscara de granada, inhibe la actividad de β -catenina/TCF y reduce niveles de expresión de β -catenina aumentados en el cáncer de colon, también se han demostrado efectos antiangiogénicos de EGCG y antocianinas inhibiendo VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y metaloproteasas (MMPs) (Annabi 2002). El uso combinado de

diferentes sustancias tanto de origen natural en los alimentos y de productos sintéticos no carcinogénicos, pueden prevenir el desarrollo de tumores (Rao 1991).

Otros compuestos importantes en la protección del cáncer y otras enfermedades son los taninos. Estos se clasifican en taninos complejos, taninos condensados, galotaninos y elagitaninos. Dentro de los taninos condensados encontramos: Proantocianidinas (PACs) y oligómeros procianidólicos (OPCs) (Khanbabaei 2001).

En general, el conocimiento sobre la protección y/o prevención del cáncer, especialmente de colon a través del uso de fitoquímicos como los polifenoles, es aún limitado, aunque existe muchos estudios *in vitro* y un interés creciente en estudios enfocados en las diferentes vías moleculares y, cómo el consumo de estos polifenoles, ya sea a través de extractos o consumo de vegetales y frutas, interfieren en la iniciación, promoción y progresión tumoral (Adhami 2007, Ramos 2008, Lea 2010).

17.-FITOQUIMICOS DE LA GRANADA.

La Granada (*Punica granatum*) es un arbusto de hoja caduca, originario de Irán, crece en toda la región del Mediterráneo y los Estados Unidos (Khan 2007, Lansky 2007, Bell 2008, Jurenka 2008). Se trata de una planta de hojas alargadas estrechas, de aspecto brillante, que produce flores de color rojo brillante. Los frutos redondeados son de gran tamaño (5-12 cm) y tiene una gruesa cascara (piel) rojiza que encapsula cientos de pequeñas semillas (figura 13). Cuando las semillas se secan y trituran producen un aceite único, el 80% del cual, es ácido punícico, un raro ácido graso de 18 carbonos.



Figura 13 .Fruto de granada(*Punica granatum*)Modificada de (De la Cruz 2011).

Este aceite también contiene la isoflavona genisteína, presente también en los frijoles de soya y el fitoestrógeno coumestrol (Surh 2003, Bell 2008). La granada es una de las pocas plantas en la naturaleza que contienen estrógenos, que son esteroides sexuales, siendo denominada como una farmacia en sí misma (Pantuck 2006). Además, es considerada una superfruta por sus propiedades superiores como antioxidante (Bell 2008). El fruto de la granada es una fuente rica en polifenoles ya que posee compuestos, como las antocianinas (que dan el color rojo al jugo y semillas) y taninos hidrolizables, tales como ácido elágico y punicalagina, compuestos que le dan a la mayoría de los frutos la actividad antioxidante (Adhami 2006, Khan 2007).

17.1.-COMPONENTES POLIFENÓLICOS DE LA GRANADA.

Se ha demostrado que las granadas contienen 124 fitoquímicos diferentes y algunos de ellos actúan en sinergia para ejercer efectos antioxidantes y anti-inflamatorios, e inducir apoptosis sobre las células cancerosas (Khan 2007). Los elagitaninos son polifenoles bioactivos presentes en la granada. El jugo de granada obtenido exprimiendo la fruta entera, tiene la concentración más alta de elagitaninos que cualquier jugo de consumo habitual y contiene elagitaninos, y punicalagina. El extracto de granada obtenido en 70% de acetona y un 30% de agua destilada contiene antocianinas tales como cianidina, pelarganidinas y taninos hidrolizables como el ácido elágico ,

punicalagina y pedunculaginina, ácido gálico, pelargonidina, delfinidina entre otros (Khan 2007). (Tabla 4)

TABLA 4 : Fruta de la granada partes y constituyentes: Modificada de (Jurenka 2008).	
COMPONENTES DE LA PLANTA	CONSTITUYENTES
JUGO DE GRANADA	Antocianinas, glucosa, ácido ascórbico, ácido elágico, ácido gálico, cafeína, catenina, EGCG, quercitina, rutina, numerosos minerales, y aminoácidos
ACEITE DE SEMILLA DE GRANADA	95% de ácido púnicico, y otros constituyentes incluyendo ácido elágico, otros ácidos grasos, y esteroides.
PERICARPO,PIEL ,CASCARA	Fenoles, punicalaginas, ácidos gálicos y otros ácidos grasos, catequina, EGCG, quercitina, rutina y otros flavonoles, flavones, flavonones, antocianidinas
HOJAS DE GRANADA	Taninos, (punicalaginas y punicafolinas), glicósidos flavones incluyendo luteolina y epigenina
FLORES DE GRANADA	Ácido gálico, ácido ursólico, triterpenoides. y ácido asiático y otros constituyentes no identificados
RAICES Y CORTEZA DE GRANADA	Ellagitaninos, incluyendo punicalagina y punicalina y numerosos alcaloides piperidina

Tabla 5. Composición química del fruto de la granada. Modificada de (De la Cruz 2011)

Análisis proximal	Cantidad por 275 g de muestra
Agua (%)	82.3
Proteína (g)	0.8
Grasa (g)	0.5
Carbohidratos (g)	15.3
Semillas y piel (%)	44.0
Energía (Kcal)	82.3
Calcio	5.0
Fósforo	12.0
Hierro	0.5
Sodio	5.0
Potasio	399.0
Ácido ascórbico	6.0
Tiamina	0.05
Rivoflavina	0.05
Niacina	0.5
Vitamina A	Traza

Tabla 6. Características fisicoquímicas de las semillas y cascara de la granada. Modificada de (De la Cruz 2011).

Análisis en base seca	Cantidad por 100 g de muestra	
	Semilla (g)	Cáscara (g)
Materia seca	74.33 ± 0.09	94.45 ± 1.25
Humedad	25.66 ± 0.09	5.5 ± 1.25
Cenizas	3.62 ± 0.13	3.59 ± 0.08
Grasa cruda	10.33 ± 0.17	3.57 ± 0.38
Proteína total	10.42 ± 2.61	1.26 ± 0.17
Fibra cruda	12.12 ± 2.10	17.75 ± 1.61
Azúcares totales	10.13 ± 0.33	16.08 ± 0.61
Azúcares reductores	4.67 ± 0.02	4.34 ± 0.01
Fenoles hidrolizables totales	0.002 ± 0.00015	6.11 ± 1.83
Ácido elágico	0.0048 ± 0.00002	0.26 ± 0.08
Índice de absorción de agua (WAI)	1.62 ± 0.020	4.84 ± 0.006
Punto crítico de humedad (CHP)	64.55 ± 2.170	22.08 ± 0.630
pH	5.37 ± 0.354	5.70 ± 0.420
Actividad de agua (a_w)	0.156 ± 0.015	0.189 ± 0.018

Los elagitaninos son los polifenoles de peso molecular más grandes conocidos, son hidrolizables con componentes de ácido hidroxibenzoico. El elagitanino más abundante en la fruta de la granada es punicalagina y, durante el procesamiento que se extrae en el jugo de granada, alcanza niveles de más de 2 gramos por litro de jugo (Seeram 2005). Los elagitaninos de la granada no se absorben intactos en el torrente sanguíneo, sino que se hidrolizan a ácido elágico a lo largo de varias horas en el intestino (Figura 17), aunque la bacteria responsable de esta transformación aún no está caracterizada (Davis 2009).

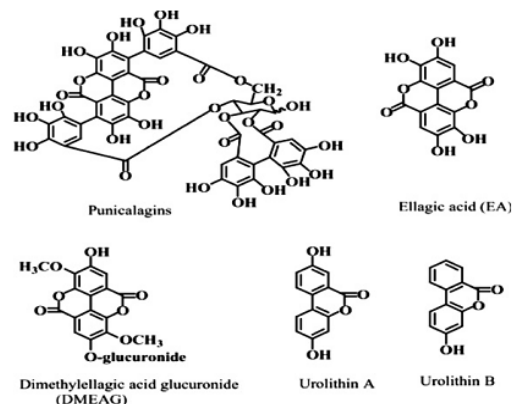


Figura 17. Estructura química de isómeros de punicalagina, presentes en el jugo de granada y sus metabolitos dimetilelágico, ácido glucorinado, ácido elágico y urolitina A y B.

Modificada de (Heber 2008)

En particular, los elagitaninos corresponden a ésteres de ácido elágico y un poliol, generalmente, glucosa. Se forman a partir de los galotaninos por el acoplamiento oxidativo de al menos 2 unidades galoil, originando el grupo ácido hexahidroxidifénico (HHDP), el cual es característico de los elagitaninos. Estas unidades HHDP se pueden acoplar en las posiciones 4-6 o la posición 2-3 de la unidad D-glucopiranososa, y tienen la conformación (S), mientras que el acoplamiento en las posiciones 3-6 conduce únicamente a la formación (R) de las unidades HHDP. Los acoplamientos en 1-6 son raros en la naturaleza (Cruz-Atonio 2010). Los elagitaninos se pueden clasificar de acuerdo al número de grupos HHDP en la molécula, debido a que los monómeros de elagitaninos pueden ser oxidados en las plantas y formar dímeros, trímeros y tetrámeros, oligómeros y polímeros, con pesos moleculares de 4000 a 20000 Dalton (Khanbabaee 2001). Mediante hidrólisis, punicalagina (Figura 14), produce ácido elágico por lactonización espontánea del ácido hexahidroxidifénico (Larrosa 2006), liberando el grupo HHDP (figura 18). Este grupo sufre una lactonización espontánea que da origen a la molécula conocida como ácido elágico (Aguilera-Carbo 2008, Cruz-Atonio 2010). Posteriormente, el ácido elágico es metabolizado por la microbiota humana a urolitina A y B, que se conjugan en el hígado y se excretan en la orina (Heber 2008)

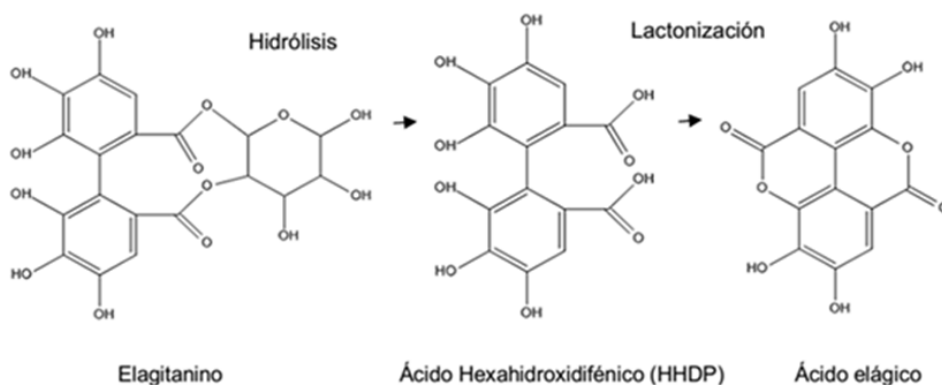


Fig. 14. Formación del ácido elágico. Modificada de (De la Cruz 2011)

17.2.- PROPIEDADES DEL ÁCIDO ELÁGICO.

PROPIEDADES DEL ÁCIDO ELÁGICO.

El ácido elágico es una molécula termodinámicamente estable, su punto de fusión es de 362° C, tiene un peso molecular de 302.2 g/mol, además es insoluble en agua y ligeramente soluble en solventes orgánicos. Esta propiedad se debe a que el anillo aromático le confiere propiedades lipofílicas y los 4 grupos hidroxilo y las dos lactonas le confieren propiedades hidrofílicas, ya que funcionan con aceptores de electrones formando puentes de hidrógeno (Bala 2006). Por su naturaleza fenólica, el ácido elágico tiende a reaccionar formando complejos con otras moléculas como proteínas, alcaloides y polisacáridos. Debido a estas propiedades, se han realizado distintos trabajos de investigación sobre su producción por procesos biotecnológicos como la utilización de hongos para la extracción desde las cáscaras de granada (Aguilera-Carbo 2008), que es una fuente barata y abundante de ácido elágico (Seeram 2005).

17.3.- FUENTES DE OBTENCIÓN DE ELAGITANINOS Y ÁCIDO ELÁGICO

Existen más de 500 estructuras diferentes de elagitaninos reportadas. La fuente más importante de obtención de elagitaninos y ácido elágico es la vegetal, principalmente en hojas, ramas, raíces, tallos, frutos y cortezas de la granada (Pantuck 2006). Se sabe también que los arbustos o árboles de bayas son una fuente importante de elagitaninos y ácido elágico, por ejemplo el arándano, la frambuesa y la granada (Seeram 2005). El ácido elágico es consumido por el hombre de manera común en frutas, semillas y en los alimentos o bebidas elaborados a partir de ellos, como jugos de frutas, mermeladas y otros. También se pueden obtener polifenoles a partir de la cáscara que es rica en elagitaninos tales como la punicalagina (15.7%) y sus isómeros, así como de pequeñas cantidades de punicalina (2%), ácido gálico, ácido elágico (3%) y oligómeros (77%). Los residuos de granada, que se obtienen luego de producir el jugo, también puede ser una fuente rica en polifenoles (Aguilar 2008).

El ácido elágico libre de la granada es relativamente bajo, pero el contenido se puede incrementar como resultado de la hidrólisis de los elagitaninos (De la Cruz 2011). Los elagitaninos son extraídos en niveles significativos en el jugo durante el proceso industrial de todo el fruto. El jugo de granada comercial exhibe una potente actividad antioxidante que ha sido atribuida a su alto contenido de polifenoles, incluida la punicalagina, que pueden llegar a niveles mayores a 2 g/L de jugo, dependiendo del fruto y del método de procesamiento (De la Cruz 2011).

En 1999, investigadores israelíes demostraron la capacidad antioxidante del ácido elágico (Bell 2008), así los efectos biológicos del jugo de granada se pueden relacionar con la salud tras indicar la disminución el efecto de radicales libres, responsables de procesos como la oxidación que promueve el envejecimiento de las células del organismo y que

aumentan el riesgo en la formación de distintas formas de cáncer. Por esto el ácido elágico se ha reportado como un efectivo producto antitumoral (Adhami 2006).

Los estudios de Machado et al. (2002) identificaron dos sustancias como los elagitaninos de mayor presencia en *Punica granatum*, estas sustancias son denominados punicalagina, siendo el principal ingrediente de los compuestos fenólicos de la granada, con 82.4 mg g^{-1} en la cáscara de granada, y la punicalina. Ambos compuestos son considerados específicos de este fruto (Machado 2002). Posteriormente se identificaron otros dos elagitaninos, el ácido dielágico ramnosil (1,4) glucopiranosido, y el galoilpunicalina, además de los ya conocidos como la punicalina, punicalagina y 2-O-galoilpunicalina (De la Cruz 2011). La potente actividad de los elagitaninos puede ser explicada por su habilidad para hidrolizarse a nivel intestinal y liberar ácido elágico, aumentando de este modo sus efectos benéficos (Lu 2008).

El ácido elágico es capaz de reaccionar químicamente con metabolitos del BPDE (Benzo[a]pireno-7,8-diol-9,10-epóxido) un potente carcinógeno previniendo la unión covalente del BPDE al ADN (Huetz 2005). Esta reacción coordinada prueba al ácido elágico como agente quimioprotector contra algunos tipos de cáncer causados por compuestos aromáticos policíclicos PAHs (Huetz 2005), inhibiendo la mutación de células sanas. Se han reportado investigaciones sobre la inhibición de la proliferación de células malignas de cáncer de piel (melanoma), cáncer de mama, de estómago, esófago, hígado y otros (Clifford 2000, Seeram 2005).

Los elagitaninos y el ácido elágico han sido empleados de manera artesanal en medicina tradicional, para aliviar enfermedades gastrointestinales, úlceras gástricas, quemaduras e infecciones bucales al ser ingeridos en infusiones de plantas que los contienen. A partir de estas observaciones, los investigadores han desarrollado técnicas de aislamiento y caracterización de los principios activos de las mismas, descubriendo que

los elagitaninos y el ácido elálgico son los responsables de estos beneficios para la salud. La capacidad de los elagitaninos y sobre todo del ácido elálgico de reaccionar con otras moléculas, es lo que le confiere un alto poder antioxidante (Cruz-Atonio 2010). Estas interacciones ocurren a nivel de receptores de membrana, citoplasmáticos o nucleares y modulando diferentes vías de proliferación, ciclo celular, diferenciación y apoptosis.

Los antioxidantes son compuestos que pueden retrasar, inhibir o prevenir la oxidación de compuestos oxidables, atrapando radicales libres y disminuyendo el estrés oxidativo (Khan 2007). El mecanismo del ácido elálgico, en particular, es muy complicado ya que interactúa en diversos mecanismos. Experimentos *in vivo* indican que el ácido elálgico posee gran actividad contra especies reactivas (ROO^- , OH^- , Cu^{2+} y O^{2-}), por lo tanto representa una forma natural de eliminar radicales libres del cuerpo humano (Khan 2007). Dentro de las capacidades medicinales de los componentes químicos de la granada se incluyen las antioxidantes, antiinflamatoria, antivirales, antibacteriana, antifúngica, protección cardiovascular, diabetes, síntomas de la menopausia, balance hormonal, incremento de la libido en ambos géneros, virilidad y erección masculina (Johanningsmeier 2011), incluyendo, además, efecto antiarrugas, nutrición de la piel (Hora 2003) y anticáncer (Surh 2003, Notka 2004, Huetz 2005, Seeram 2005, Adhami 2006, Khan 2007, Johanningsmeier 2011).

Los extractos de granada (que contiene gran cantidad de ácido elálgico) han demostrado tener capacidad para incrementar las enzimas de detoxificación de la fase II (glutación-S-transferasas) en el hígado (Wintersdk 1993) protegiéndolo frente a la toxicidad inducida por agentes químicos y ayudarle a restablecer sus funciones características, además parece reducir los niveles de colesterol total y tener actividad antifúngica (Johanningsmeier 2011), el ácido elálgico al unirse al ADN lo protege del ataque de cancerígenos como el benzopireno, e inhibe las ADN topoisomerasas con esto impide la replicación y las células cancerígenas sufren apoptosis.

18.- ACCIONES DE POLIFENOLES DE GRANADA SOBRE PROLIFERACIÓN, CICLO CELULAR Y APOPTOSIS.

En general, los polifenoles de la granada han demostrado actuar en múltiples e importantes procesos y vías de transducción relacionadas con la carcinogénesis como la proliferación, diferenciación, apoptosis, inflamación, angiogénesis, y metástasis (Van Lieshout 1998, Agarwal 2002, Adams 2006, Adhami 2009).

La inhibición de la proliferación celular se vio mediada por la detención del ciclo celular en las fases del ciclo celular G₀/G₁ y G₂/M seguido por la inducción de apoptosis. Esto indica que el ácido elágico y urolitina, liberados en el colon a partir del consumo de jugo o extracto de granada en cantidades considerables podrían reducir el riesgo de desarrollar cáncer de colon (Kasimsetty 2010) ya que a concentraciones entre 1-100 µm/l, mostró una fuerte actividad anti-proliferativa contra células cancerígenas de colon, pulmón y próstata (Losso 2004), uno de los mecanismos de acción, probablemente sea, la interferencia en el ciclo celular (Surh 2003), también la granada posee ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido punícico y el ácido alfa-eleosteárico, que actúan como moduladores selectivos de receptores de estrógenos y antagonistas de estrógenos en concentraciones inferiores al resveratrol en células tumorales MCF-7 y MDA-MB-231 inhibiendo su proliferación (Jo 2007, Sturgeon 2010).

Un significativo número de flavonoides, solos y en combinación, muestran la capacidad de inducir el arresto del ciclo celular en G₂/M en células de carcinomas humano SW 480 y CaCo-2 (Wang 2000). La actividad de estos polifenoles en estas vías, le otorga las propiedades antiproliferativa, proapoptótica, antiinflamatoria y antimetastásica, alterando la ruta de señalización bioquímica de la proteína NF-κB y suprimiendo la expresión de las proteínas RhoA y RhoC (Khan 2009). El ácido elágico ayuda a contrarrestar el cáncer de colon, ya que en diferentes estudios se ha demostrado que reduce el tamaño y el número

de tumores en cáncer de colon en animales, a través de la modulación de factores de transcripción y de señales proteicas (Van der Logt 2003, Kohno 2004, Adams 2006, Johanningsmeier 2011). Otro estudio evaluó un extracto crudo de fruta de la granada , que contiene ácido elágico, entre otros, por sus propiedades anti-proliferativa y pro-apoptóticas, encontrando que se produjo tanto la inhibición del crecimiento celular como la inducción de la apoptosis de una manera dosis-dependiente en la línea celular insensible a andrógenos PC3 , mediante la inducción de Bax y Bak, la disminución de Bcl-XL y Bcl-2 y de las ciclinas D1, D2, E y de las quinasas dependientes de ciclina (CDK) 2, 4 y 6 (Malik 2005). De la misma forma, Larrosa et al 2006 indica que luego del consumo de polifenoles, (como los presentes en la granada) se produce una disminución de la ciclina D, ciclina E, quinasa dependiente de ciclina CDK1, CDK2, CDK4 , así como también la detención del ciclo celular en la fase S en células Caco 2. Además de la disminución de la ciclina A y B1, se observa la inducción de la apoptosis por aumento de las caspasas 3 y 9 , aumento del citocromo C y disminución de Bcl-XL (Larrosa 2006). El ácido elágico también disminuye la proliferación en células tumorales dependientes de estrógenos sobrerregulando la proteína C fos y pS2. En la línea celular de cáncer de mama no dependientes de estrógenos MDA-MB-231, el ácido elágico altera la expresión de las proteínas Bcl-XL, survivina y citocromo C (Khan 2009). Se ha descrito también el ácido elágico por su capacidad de modular la carcinogénesis por medio de la inhibición de las enzimas de la fase I del citocromo P450 y la inducción de las enzimas de la fase II que están involucradas en la detoxificación carcinogénica (Wintersdk 1993).

Se ha reportado que todos los componentes de la granada inducen apoptosis en las células de cáncer de colon HT-29 (Seeram 2006). Los elagitaninos, y sus metabolitos urolitina, inhiben la proliferación e inducen la apoptosis en células HT29 de cáncer de colon (Kasimsetty 2009). Los polifenoles de la dieta también puede actuar como pro-oxidantes, según en el tipo celular, según la dosis y /o el tiempo de tratamiento, ya que

pueden aumentar la producción de ROS y, por tanto, inducir la apoptosis. En este sentido, se ha visto en el cáncer de Colon, específicamente, en células HT-29, que los flavonoides aumentan la absorción de piruvato o lactato, lo que incrementa la producción de radicales superóxido dando lugar a incremento en la apoptosis (Wenzel 2005).

Los resultados de los estudios realizados en cáncer de colon encontraron que la punicalagina podría ser considerada un precursor de apoptosis, ya que su hidrólisis libera al medio un compuesto derivado denominado ácido elágico, que provoca apoptosis en las células cancerosas Caco-2, pero no en células normales del colon (Larrosa 2006).

Otra sustancia obtenida de la granada, el aceite de sus semillas, compuesto con más de un 70% de ácido linolénico conjugado, mostró la supresión de la carcinogénesis colónica (Kohno 2004). Además puede inducir apoptosis en varios tipos de líneas celulares de cáncer y también inhibir la invasión celular.

Al analizar los efectos del jugo de granada en la línea celular humana HT-29 de cáncer de colon, a través de la expresión de proteínas que participan en señales inflamatorias, a una concentración de 50 Mg/L, el jugo de granada suprimió de forma significativa la expresión de la proteína TNF α inducida por (COX 2) en un 79% y, también, redujo la fosforilación de la subunidad p65 de NF-kB y su unión al DNA (Adams 2006). La liberación de TNF- α produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, lo que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y proteínas de complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B. Aunque localmente los efectos del TNF- α son beneficiosos, cuando el TNF actúa en todo el organismo tales efectos son desastrosos, provocando síndromes como el shock séptico y la coagulación intravascular diseminada (Heber 2008). El jugo de granada también suprimió la activación de AKT inducida por TNF α , necesario para la actividad de NF-k β . Estos datos sugieren que los constituyentes

polifenólicos en la granada puede jugar un papel importante en la modulación de las señales inflamatorias en células de cáncer de colon (Khan 2007, Adhami 2009).

Narayanan en el 2001 demuestra que el ácido elágico, cuando se administra en concentraciones 10^{-5} M, durante 48 horas a células del cáncer de colon (SW 480), inducidas por el factor de crecimiento IGF-II, activan a p21^{waf1/pic1}, mediando un efecto inhibitorio sobre la fase de transición G1/S causando muerte celular por apoptosis. Las células SW480 aumentaron significativamente los niveles de ARNm del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-II). Colectivamente, estas observaciones sugieren que la inhibición del crecimiento por ácido elágico está mediada por señales que median daño en su ADN, induciendo la producción de la proteína p53 y p21, y al mismo tiempo alterando la regulación de IGF-II (Narayanan 2001).

En estudios *in vitro* varios extractos de la granada, (zumo, cáscara, semillas) han mostrado su efectividad para inhibir el crecimiento y la invasividad de diferentes tipos de cáncer (próstata, mama, colon, pulmón y leucemia) (Malik 2006, Jurenka 2008).

19.- EFECTOS HORMONALES DE LOS POLIFENOLES DE LA GRANADA.

El ácido elágico se absorbe parcialmente en el estómago y el resto que llega al intestino es degradado por la microbiota hasta urolitina que tiene una actividad bloqueadora de la biosíntesis endógena de estrógenos, por inhibición de la enzima aromatasa que convierte los andrógenos en estrógenos, disminuyendo la proliferación inducida por esta hormona. Además, bloquea la absorción de colesterol (Chasquibol 2003), por esto una dieta rica en polifenoles especialmente ácido elágico posee un potencial preventivo y terapéutico para el tratamiento de varios tipos de cáncer especialmente, de mama, colon, próstata y de piel en seres humanos (Agarwal 2002, Hirose 2002, Hora 2003, Umesalma 2010).

20.- ESTUDIOS IN VIVO SOBRE LOS EFECTOS DE LOS POLIFENOLES DE LA GRANADA.

Además de todos los estudios *in vitro*, se han realizado múltiples investigaciones *in vivo* de los efectos de los diferentes preparados de granada, comprobando en ratas que el ácido elágico disminuye la actividad tumorigénica de varios tipos de cáncer incluyendo el de colon. (Seeram 2007).

Se investigó el efecto del aceite de granada en la dieta, sobre el desarrollo de tumores malignos del colon inducidos por azoximetano (AOM) en ratas y se comparó con el ácido linoleico conjugado (CLA). Para inducir tumores de colon, se utilizaron inyecciones subcutáneas de AOM (20 mg / kg peso corporal) una vez a la semana a ratas F344 machos de 6 semanas de edad, durante 2 semanas. Una semana antes del tratamiento de la AOM se inició una dieta que contenía 0.01%, 0.1%, o 1% PGO o 1% de CLA durante 32 semanas. Al terminar el bioensayo (32 semanas) los tumores de colon fueron evaluados histopatológicamente. La exposición AOM produce adenocarcinoma de colon con una incidencia de 81% y la multiplicidad de 1,88 + / - 1,54. Luego de las 32 semanas se comprobó que la administración de PGO en la dieta inhibe significativamente la incidencia de tumores inducidos por AOM. Tal como se aprecia en la tabla 7, no se observó una clara relación dosis respuesta en estos niveles de dosis.

Tabla 7. Relación entre incidencia tumoral y multiplicidad tumoral, en exposición a AOM y diferentes concentraciones de PGO.

EXPOSICIÓN	INCIDENCIA TUMORAL %	MULTIPLICIDAD TUMORAL
AOM	81	1,88+/-1,54
AOM + 0,01 PGO	42	0,56 +/- 0,73
AOM + 0,1 PGO	38	0,50 +/- 0,73
AOM + 1 % PGO	56	0,88 +/- 0,96

La inhibición de tumores de colon por el aceite de granada se asoció con un aumento en el contenido de CLA, en la fracción lipídica de la mucosa del colon y el hígado (Kohno 2004). También se ha asociado la inhibición de la incidencia de tumores con una inhibición de PPAR, y como el ácido eláxico inhibe la expresión de PPAR, se sugiere que los efectos beneficiosos de la granada contra el desarrollo de tumores de colon en ratas estarían asociados a este compuesto (Adhami 2009). El interés de los investigadores para PPAR aumentó cuando se demostró que estos receptores pueden ser activados directamente por un número de compuestos médicamente relevantes. Estos compuestos incluyen a compuestos sensibilizantes a la insulina utilizados como agentes antidiabéticos oralmente activos, ciertos fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), y moléculas de ácidos grasos derivados de origen natural. Rápidamente, se demostró que los PPAR son reguladores clave de la homeostasis de los lípidos y proporcionan un enlace molecular entre la nutrición y la regulación de genes, participando en el control de la inflamación y la proliferación celular (Gelman 1999).

Otro estudio en vivo, se realizó para evaluar el potencial quimiopreventivo del ácido eláxico contra la 1,2-dimetilhidrazina (DMH) en carcinogénesis de colon inducida en ratas. Estas fueron tratadas con DMH (20mg/kg peso corporal) por inyección subcutánea una vez a la semana durante 15 semanas y se complementaron con AE (60 mg/kg peso corporal / día por vía oral). En este estudio, se mide la eficacia del ácido eláxico sobre la formación de focos de criptas aberrantes (ACF), evaluándose los niveles de peroxidación lipídica (LPO) y actividades de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos inducidos por DMH en cáncer de colon en ratas portadoras. Tras el período experimental, se observaron aumentos en la frecuencia de la ACF y los niveles de LPO y una disminución significativa en las actividades de los antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión-S-transferasa) y de antioxidantes no-enzimáticos (glutatión reducido, vitamina C y vitamina E). La

suplementación con ácido elálgico reduce todas estas alteraciones a niveles casi normales, lo que indica la eficacia anticancerígena del ácido elálgico. Este efecto fue confirmado por estudios histopatológicos. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren al ácido elálgico como un agente quimioprotector frente a la carcinogénesis inducida en ratas por DMH (Umesalma 2009). En un estudio anterior, con ratas *Sprague-Dawley* que recibieron la misma dosis de azoximetano, el ácido elálgico no produjo una disminución significativa de las aberraciones de las criptas (Pereira 1991).

Por otra parte, se investigaron los efectos del ácido elálgico en cáncer de colon en ratas albinos machos Wistar inducidas por 1,2-dimetilhidracina (DMH), dividiéndose las ratas en cuatro grupos de los cuales el (1) control; (2) administración oral (disuelto en agua) 60mg/Kg peso corporal de ácido elálgico durante 32 días, (3 y 4) administración de vía endovenosa 20 mg/Kg peso corporal de DMH, una vez a la semana durante las primeras 15 semanas. Las ratas del grupo 4 recibieron después de la última inyección de DMH, la misma dosis de ácido elálgico que el grupo 2, durante las 15 semanas restantes. Las ratas inducidas del grupo 3 vieron alterados marcadores tumorales de cáncer tales como antígeno carcinogénico embrionario, alfa fetoproteína, catepsina, fosfatasa alcalina. La administración de ácido elálgico en el grupo 4 logró restaurar los niveles de estos marcadores biológicos. Con este trabajo se pudo concluir que el ácido elálgico demuestra propiedades antiinflamatorias ya que inhibe la expresión de NF K β (Edderkaoui 2008) y a la vez reduce la transcripción de iNOX, COX 2, TNF- α y IL-6, ejerciendo un efecto quimiopreventivo del cáncer de colon en ratas (Maihofner 2003, Umesalma 2010).

Otra enzima establecida como un blanco en la quimiopreención es la enzima citocromo P450 (Orellana 2004). Las investigaciones muestran que las dietas ricas en ácido elálgico y sus metabolitos urolitina A y urolitina B, modulan las enzimas detoxificadoras de la fase I y la fase II en células Caco-2 de cáncer de colon (Larrosa 2006, Gonzalez-Sarrias 2009). La fase I, catalizada principalmente por el sistema de

monooxigenasas dependiente del citocromo P450, y la fase II, en la que participan una serie de transferasas que catalizan reacciones de conjugación de los xenobióticos con diversas moléculas de naturaleza endógena como ácido glucorónico, sulfatos, acetato, el tripéptido glutatión o algunos aminoácidos, con el objetivo final de aumentar la solubilidad en agua de los compuestos y así facilitar su excreción del organismo a través de la orina o la bilis (Wintersdk 1993).

Ácido elágico y urolitina en concentraciones micromolares alcanzables en el colon, inducen la expresión y actividad de CYP (otra forma de denominar a P450) e inhiben varias sulfotransferasas. Como resultado, la síntesis de glucurónidos se vio favorecida en las células tratadas. *In situ* la exposición a estos compuestos disueltos en tampón también condujo a la inducción del CYP1A en el colon de la rata. Sin embargo, *in situ*, la exposición a los compuestos disueltos en aceite a suplementos orales de los compuestos aislados, a extracto de granada (PE) o los alimentos no han logrado inducir CYP en la mucosa del colon (Gonzalez-Sarrias 2009). Estos resultados sugieren que el ácido elágico y la urolitina pueden ejercer ciertos efectos preventivos en el colon, pero estos efectos son afectados de manera crítica por factores que interfieren, tales como la naturaleza de la matriz alimentaria (Gonzalez-Sarrias 2009). Sin embargo, CYP también es capaz de activar procarcinógenos como hidrocarburos policíclicos aromáticos tales como el benzantrén y el benzopireno en compuestos mutagénicos, que se unen al ADN celular y ocasionan mutaciones en diferentes protooncogenes como el myc y el gen supresor p53, lo que puede provocar el desarrollo del cáncer. CYP se localiza a nivel del retículo endoplasmático liso, en especial en la mucosa respiratoria y su expresión es inducida por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), presentes entre otras sustancias en el humo del tabaco, además participa en el metabolismo de sustratos endógenos de importancia biológica como colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroidales y ácidos grasos (Orellana 2004). Uno de los sustratos de CYP, es la etoxiresorufina, por lo tanto la medición de

etoxiresorufina O- deetilasa (EROD) proporciona un método más directo para la detección de la enzima CYP 1A. Los compuestos que inhiben la actividad de CYP1B1 se piensa que pueden ejercer efectos beneficiosos en las etapas de desarrollo del cáncer, es decir, la iniciación y progresión de la patología, y durante el desarrollo de resistencia a las drogas antitumorales (Kasimsetty 2009). Los elagitaninos de la granada y sus metabolitos microbianos fueron examinados por su actividad inhibitoria sobre CYP1B1 mediada por EROD. La Urolitina A, un metabolito microbiano, derivado de ácido elágico era el más potente inhibidor competitivo más potente de la actividad de CYP1B1 mediada por EROD, exhibiendo una doble selectividad de CYP1A1, mientras urolitina B fue un inhibidor no competitivo con triple selectividad. Por esto se sugiere que la colonia de microbiota en presencia de ácido elágico y otros componentes de la dieta, cumple un rol crítico en la mantención de un colon saludable incluyendo la disminución del riesgo de desarrollar cáncer de colon (Davis 2009, Kasimsetty 2009, Kasimsetty 2010). Los metabolitos producidos por acción de la microbiota se puede apreciar en la tabla 8.

Tabla 8. Metabolitos bacterianos obtenidos de componentes de la dieta con propiedades preventivas del cáncer. Modificada de (Davis 2009).

Componentes en la dieta	Alimentos	Metabolitos bacterianos
Fibra	Productos de grano	Butirato
Ácido linoleico	Aceites vegetales	CLA
Daidzeína	Soya	Equol
Secoisolariciresinol	Sésamo, linaza	Enterolactona, enterodiol
Isoxanthohumol	Cerveza, lúpulo	8-PN
Ácido elágico	Fresas, frambuesas, nueces, granadas	Urolitina A y B.

Los mecanismos de protección de diversos compuestos polifenólicos pueden ser multifactoriales y resultan en la mejora del funcionamiento de enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos y carcinogénicos. Un particular interés en este respecto son las enzimas GST (glutathión S transferasas) que participan en la fase II de biotransformación. En mamíferos son cuatro las principales clases (isoenzimas) de GST citosólicas, estas son (alfa, mu, pi y teta). Estas catalizan la conjugación del glutathión a una variedad de compuestos incluyendo algunos carcinógenos (Van Lieshout 1998). Se ha investigado la aplicación de varios componentes de los alimentos naturales en combinación con antiinflamatorios no esteroideos (AINES) indicando que pueden disminuir los índices de cáncer gastrointestinal. Recientemente se ha demostrado que la administración antiinflamatorios no esteroideos tales como piroxicam mejora la actividad de las enzimas (GST) y los niveles de sus isoenzimas (alfa, mu, pi, teta y zeta) en el tracto gastrointestinal de la rata (Nijhoff 1993). La elevación de los niveles de enzimas GSTs, con funciones tales como la detoxificación de los agentes carcinógenos, podría ser uno de los mecanismos que conducen a la prevención del cáncer. Por consiguiente, se investigó si las sustancias antitumorales alfa-angelicalactona, alfa-tocoferol, beta-caroteno, cumarina, ácido eláxico, flavona, indol-3-carbinol, d-limoneno oltipraz, fenetilisotiocianato (PEITC) y el sulforafano (Surh 2003), afectan los niveles de proteína rGSTT1-1 en ratas Wistar (Van Lieshout 1998). Los niveles de proteína GSTT1-1 se determinaron en fracciones citosólica de hígado, esófago, estómago, intestino delgado y mucosa colónica por western blot y análisis densitométrico, posterior a la inmunodetección con un anticuerpo humano monoclonal anti GSTT1-1, que reacciona de forma cruzada con rGSTT1-1. En ratas control, los niveles de la proteína gastrointestinal rGSTT1-1 fueron más altos en el hígado. Los niveles de la proteína rGSTT1-1 fueron elevados por alfa angelicalactona, alfa tocoferol, cumarina, ácido eláxico, oltipraz, PEITC y sulforano. Los niveles de la proteína rGSTT1-1 esofágica fueron elevados por angelicalactona y cumarina, mientras que los niveles de rGSTT1-1 a nivel de colon fueron elevados por cumarina. Este estudio concluye que los

anticancerígenos dietéticos son capaces de inducir aumento de los niveles de la proteína rGSTT1-1 en el tracto intestinal de rata siendo más pronunciado en el estómago, y que el aumento de estos niveles podrían contribuir a la prevención de la carcinogénesis (Van Lieshout 1998).

En estudio *in vivo* en humanos, once sujetos completaron un ensayo clínico para determinar la seguridad y tolerabilidad de liofilizados de frambuesas negras (BRB) y medir, en plasma y orina, antocianinas específicas tales como la cianidina-3-glucósido, cianidina-3-sambubiosido, cianidina-3-rutinósido, y cianidina-3-xilosilrutinosido, así como ácido elágico. Los sujetos fueron alimentados con 45 g de liofilizado BRB al día durante 7 días. Las muestras de sangre se recogieron antes de las dosis y entre los días 1 y 7 y en 10 puntos de tiempo después de la dosis. Se recogió la orina durante 12 horas antes de la dosis entre los días 1 y 7 y en tres intervalos de 4 horas después de la dosis. Las concentraciones máximas de antocianinas y ácido elágico en el plasma se produjeron entre 1 y 2 horas, y en la orina aparecieron de 0 a 4 horas. En general, menos de 1% de estos compuestos se absorbe y se excreta en la orina. Ninguno de los parámetros farmacocinéticos cambió significativamente entre los días 1 y 7. Este trabajo concluye que, 45 gr de BRB liofilizado diarios al menos por 6 meses son bien tolerados, resultando concentraciones cuantificables de antocianinas y ácido elágico en el plasma menores al 1% de la dosis administrada, siendo también detectado en la orina (Stoner 2009). Este trabajo más que indicar las acciones beneficiosas del ácido elágico a nivel molecular, ya analizadas y citadas en esta tesis, comprueba que la presencia de ácido elágico en la sangre en las dosis señaladas no es tóxica para el organismo y que el uso de liofilizado presenta algunas ventajas en su aplicación, tales como su disponibilidad durante todo el año y la disminución de las molestias de las semillas, el aumento de la concentración de ácido elágico y otros componentes aproximadamente 10 veces en relación al jugo, lo que permitiría generar una dosis más controlada de los compuestos activos de acuerdo a los

gramos aplicados por peso corporal de cada individuo (Stoner 2009). El mismo autor llevo a cabo una serie de ensayos clínicos "piloto" en las personas en riesgo más alto de lo normal para el cáncer, con el fin de determinar si BRBS tienen un potencial para la quimioprevención en los seres humanos. Estos ensayos se controlaron internamente (es decir, cada paciente sirve como su propio control), y se involucran pocos pacientes (15 a 30), para determinar los efectos de BRBS en lesiones displásicas y el análisis de biomarcadores relevantes después de un plazo relativamente corto (1 a 9 meses) de tratamiento. A través de estos estudios se quiere evaluar el efecto de las BRB en la inhibición en cohortes específicas, con el fin de realizar un examen controlado con placebo fase II y III de ensayos clínicos. Los resultados de los ensayos piloto en pacientes con esófago de Barrett o displasia oral (Kresty 2006, Mallery 2008), muestran claramente que BRB tópica en un gel bioadhesivo fue 10% más eficaz contra displasia oral, que el polvo BRB oral contra el esófago de Barrett, presumiblemente debido a que el tratamiento tópico facilita la absorción de las antocianinas y otros compuestos en las lesiones orales (Shumway 2008). Los ensayos en curso también están examinando los efectos de pastillas de BRB en la expresión del factor nuclear kappa B (NF- κ B) en los tejidos tumorales de pacientes con el carcinoma oral de células escamosas y de recurrencia en pacientes tratados clínicamente con carcinoma bucal de células escamosas (Knobloch 2007, Ferguson 2008). Los recientes resultados de dos ensayos piloto en el cáncer colorrectal FAP, sugieren que las bayas pueden ser útiles para la quimioprevención del cáncer de colon. La administración oral de BRB polvo (20 g / 3x / día) en agua por un corto plazo (2 a 4 semanas), produce una tendencia positiva para los cambios en la expresión de Ki-67 (marcador de proliferación celular), TUNEL (apoptosis), CD105 (angiogénesis) y los genes asociados con la vía Wnt (β -catenina, E-cadherina, c-Myc, ciclina D1) en tumores colorrectales y no en el colon normal (Wang 2008). La reducción en la celda Ki-67 de las tasas de proliferación, fue significativa ($P < 0,05$). Esta modulación positiva de un biomarcador clave del desarrollo tumoral, como Ki-67, después del

tratamiento a corto plazo con BRBS es alentador. La recuperación de antocianinas BRB de los tejidos del colon normales obtenidos de los pacientes tratados con bayas indicaron que las antocianinas alcanzaron el tejido diana y eran absorbidas localmente. Los resultados del ensayo piloto sugieren que hay datos positivos suficientes para iniciar la primera fase II de ensayos clínicos de BRBS en el colon además sugieren incrementar los estudios de la cavidad oral (Stoner 2009).

Varios estudios se han concentrado en el efecto quimioprotector de polifenoles específicos (Heber 2008). En estos estudios se utilizan los compuestos en forma individual a altas concentraciones durante un largo tiempo de exposición (hasta 72 horas) (Zhao 2004). La actividad quimioprotectora de los polifenoles está ligada a una serie de vías de señalización que conducen a un efecto quimioprotector. Los polifenoles como antioxidantes pueden prevenir el daño al ADN causado por radicales libres o agentes cancerígenos a través de la captura directa de los radicales, quelando cationes divalentes que participan en la reacción de Fenton y modulando enzimas relacionadas con el estrés oxidativo (Ramos 2008). Existe evidencia que la dieta abundante en vegetales y frutas reduce el riesgo de varios cánceres, especialmente, el gastrointestinal. Vegetales y frutas contienen una gran cantidad de compuestos que inhiben la carcinogénesis en ratas, dentro de estos compuestos encontramos fitoquímicos, como bioflavonoides, proantocianidinas, fitoestrógenos, que han mostrado un efecto quimioprotector contra el cáncer en diversos líneas celulares y modelos animales (Surh 2003) y en humanos (Kresty 2006, Ferguson 2008, Mallery 2008, Shumway 2008, Stoner 2009) . En un estudio se mide la eficacia del piroxicam DFMO (D,L- α diflurometilornitina) ,DHEA (16 α -fluoro-5-androsten-17-ona) y de ácido elálgico, tanto en forma individual como combinados demuestran la inhibición del cáncer de colon. Los resultados indican que la administración de esta combinación no es tóxica ,además este trabajo dice ser uno de los primeros en

demostrar la acción quimiopreventiva de DHEA (Dehidroepiandrosterona) sobre el cáncer de colon (Rao 1991).

Son diversos los estudios que sugieren que las causas de enfermedades degenerativas, son el resultado de daño celular a través de la exposición a especies reactivas de oxígeno (ROS) y que incluyen no sólo al cáncer y el envejecimiento, sino que otras, tales como enfermedades autoinmunes, inflamatorias, cardiovasculares y neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiples, síndrome de Down etc. (Surh 2003). De ahí el considerable interés en químicos que nos puedan proteger de estos compuestos y una gran cantidad de estos pueden ser identificado *in vitro* por ensayos de varios tipos, sin embargo, los estudios definitivos de materiales y pruebas de eficacia han tenido dificultad en parte por la metodología y por problemas asociados con la evaluación de las acciones antioxidantes *in vivo* (Surh 2003).

21.-BIODISPONIBILIDAD, BIOEQUIVALENCIA EN HUMANOS.

La gran capacidad antioxidante de los productos de la granada ha sido atribuida principalmente al alto contenido en polifenoles, específicamente, de elagitaninos, sin embargo, la bioequivalencia o la biodisponibilidad debe ser estudiada profundamente para proporcionar una relación confiable entre los efectos relatados de la actividad antioxidante en vivo. En estudios de biodisponibilidad de elagitaninos en humanos, el ácido elágico y sus metabolitos fueron detectados en el plasma de individuos después de haber consumido jugo de granada (Seeram 2004, Seeram 2006), no encontrándose diferencias de biodisponibilidad de ácido elágico y sus metabolitos en el plasma entre el consumo de jugos y extractos en polvo concentrados (Seeram 2008). En contraste, un segundo estudio reporta que no existe presencia de ácido elágico, punicalagina ,antocianinas y otros productos biológicos en el plasma después del consumo

de 1 litro de extracto de granada, distribuido en 5 vasos de 200 ml cada uno. Sin embargo, si fue descrita la presencia de urolitina, creando la hipótesis de la contribución de la microbiota intestinal en la degradación del jugo de granada, basada en el tiempo en que aparecieron estos metabolitos en el plasma y la orina (Cerdá 2003).

Una dificultad en la prevención del cáncer, a través de fitoquímicos, es la necesidad de obtener formulaciones estandarizadas que produzcan efectos quimiopreventivos reproducibles ya que el contenido de ácido elágico y antocianinas varía significativamente entre los diferentes frutos y entre los diferentes productores (Stoner 2009). La mayor eficacia se consiguió cuando los frutos se consumían antes, durante y después del tratamiento con carcinógenos, lo que sugiere que el consumo de granada durante la vida maximizaría los efectos como quimiopreventivo, así como el consumo de otras frutas rojas tales como las frambuesas (Stoner 2009). Las máximas concentraciones de ácido elágico en el plasma se lograron entre una y dos horas después del consumo y se detectaba en la orina entre media y cuatro horas después (Stoner 2005). En tres pequeños ensayos y en estudio de caso en humanos, se observó que el consumo de 180 ml de jugo de granada, arrojó niveles plasmáticos de 31,9 ng/mL de ácido elágico, una hora después de su consumo y desaparecía luego de cuatro horas, siendo esta la primera evidencia que el ácido elágico se absorbía en humanos (Seeram 2004). En otro estudio de los mismos investigadores sobre 18 voluntarios humanos, se confirmó la rápida absorción y eliminación del plasma de elagitaninos, como también que los metabolitos urolitina A y B permanecían por 48 horas en el cuerpo después del consumo del jugo de granada, pudiendo ser esta la causa de los beneficios a largo plazo que tiene el consumo de jugo de granada (Jurenka 2008).

22- Conclusiones.

La recopilación y análisis de información muestra que el cáncer de colon es una patología importante y recurrente en Chile, sobretodo en hombres y mujeres mayores de 50 años, cada año mueren en promedio mil personas por esta enfermedad y en los países desarrollados es la segunda causa de muerte.

La carcinogénesis colorectal se dispara principalmente con las mutaciones o la incorrecta expresión de protooncogenes, genes supresores de tumores o genes que participan en la reparación del ADN y la apoptosis.

Las células en un tumor canceroso incluyendo el de colon, son de origen monoclonal lo que se ha argumentado preferentemente en pacientes con linfoma de Burkitt, o con los patrones de inactivación del cromosoma X.

En el cáncer colorrectales no se acumulan las mismas mutaciones, ni cualitativa ni cuantitativamente, lo que genera una gran heterogeneidad genética dentro del tumor, lo que dificulta más la lucha contra esta patología.

Molecularmente se han estudiado los patrones de expresión de diferentes biomarcadores de carcinogénesis de colon en roedores y humanos con el fin de encontrar similitudes y poder correlacionar los efectos de los compuestos aplicados a ratas a los humanos. Dentro de los analizados se pueden nombrar β -catenina, COX2, iNOS, HMG-CoA, RXR- α , ER- β , 5-LOX, STAT-3, NF- $\kappa\beta$.

Sólo una pequeña porción de las muertes por cáncer están asociadas a factores genéticos hereditarios, mientras que la gran mayoría se debe a factores ambientales, como la dieta alimenticia, la exposición a cancerígenos como los presentes en el alcohol, el tabaco, hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) producidos por incendios, dioxinas presentes en las grasas y biológicamente acumulables por biomagnificación, etc.

Los principales tratamientos usados para disminuir las consecuencias del cáncer (resección quirúrgica, radio y quimioterapia) poseen respectivamente una alta reincidencia y una gran toxicidad para las células sanas.

Las causales de cáncer se observan potencialmente modificables y eso asegura la posibilidad de prevención. El poco conocimiento de la población respecto a las conductas de riesgo es un obstáculo para los cuidados preventivos.

Creemos indispensable la prevención primaria de la salud, a través de charlas y programas nutricionales dirigidos a la población en general, tal como se realizan en la prevención del cáncer de piel, con el uso del bloqueador solar.

El cáncer de colon se asocia, en general, con una dieta pobre en vegetales y rica en grasas. Las investigaciones estudiadas muestran por el contrario que una dieta rica en vegetales ayudan en la protección y prevención del cáncer, principalmente por el potencial quimioprotector de los fitoquímicos.

Dentro de los compuestos vegetales, el estudio de los polifenoles ha permitido comprobar su acción quimiopreventiva, porque restauran el crecimiento normal por modulación de la proliferación, apoptosis, angiogénesis, metástasis, y antiinflamación a través de múltiples blancos moleculares y vías bioquímicas implicadas en el desarrollo tumoral, obteniendo un efecto tanto preventivo como terapéutico.

El estudio de la *Punica granatum*, granada, ha mostrado que es uno de los vegetales más ricos en polifenoles, además es una de las pocas plantas en la naturaleza que contiene fitoestrógenos (esteroides sexuales), pudiendo utilizar frutos, hojas y flores.

El consumo de estos polifenoles se puede realizar a través de jugos del fruto, aceite de semillas, extractos obtenidos en base a acetona y agua, infusiones de sus cáscaras, además, la granada puede ser utilizada prácticamente en un 100%, aprovechando los

residuos de la industria de jugos, tales como las cáscaras y restos de semillas, para producir este compuesto gracias a la biotecnología.

El consumo periódico de esta fruta, durante la vida, podría influir positivamente en la prevención y protección del cáncer.

Existe evidencia científica que comprueba que el ácido elágico, no es tóxico para el consumo diario en humanos y que posee acción protectora en contra de diferentes enfermedades degenerativas incluyendo el cáncer de colon.

El ácido elágico y otros fitoquímicos pueden ser empleados en conjunto con otros tipos de medicamentos, por ejemplo con antiinflamatorios no esteroideos, como el piroxicam, mejoran los niveles de GST en el tracto intestinal de ratas.

A nivel molecular el ácido elágico ha demostrado la capacidad de reducir todos los cambios producidos en ratas tratadas con DMH, hasta niveles casi normales, como por ejemplo disminuye la frecuencia de focos aberrantes en las criptas, los niveles de peroxidación lipídica, aumenta los antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión transferasa, como también aumenta los antioxidantes no enzimáticos como el glutatión reducido, vitamina C y vitamina E. También disminuye la expresión de NF K β , iNOS, COX 2, TNF- α , e iL 6, todas estas respuestas sugieren que el ácido elágico es un fitoquímico importante en la prevención del cáncer en ratas inducido por DMH.

Todos los polifenoles pueden actuar contra el cáncer y otras enfermedades, pero su eficacia aumenta por sinergia, lo que indica que el consumo de una variedad de éstos, tendría un mejor efecto positivo sobre la salud.

Algunas de las principales acciones de los fitoquímicos, se encuentran en:

- El fortalecimiento de las uniones entre las moléculas del colágeno, disminuyendo la migración y la invasión celular, inhibiendo la formación de nitrosaminas y suprimiendo la activación de carcinógenos.
- A nivel molecular demuestran su acción en el arresto del ciclo celular en G1, regulando las kinasas dependientes de ciclina (CDK). Inducción de apoptosis en células cancerosas, induciendo arresto del ciclo celular, suprime la expresión de TNF α , disminuye la fosforilación de la subunidad p65 y su unión al NF-KB, disminuye la activación de AKT inducida por TNF α , activan la proteína p21, activan vías de señalización de la proteína p53.
- Previenen el daño causado al ADN por radicales libres o agentes cancerígenos, regulando enzimas relacionadas con el estrés oxidativo y quelan cationes divalentes, que participan en la reacción de Fenton, disminuye la actividad cancerígena del benzopireno, inhibe a la ADN topoisomerasa impidiendo la replicación de las células cancerígenas.
- Un metabolito del ácido elágico, la urolitina inhibe a la enzima aromatasa, disminuyendo la síntesis de estrógenos, y la proliferación inducida por testosterona en células tumorales, aumenta la expresión de PPAR, induce la actividad de CYP 1A1, inhibe sulfotransferasas, mejora la actividad de GST y mejora la desintoxicación de sustancias cancerígenas.

Mantener la microbiota intestinal en condiciones normales es una excelente forma de prevención del cáncer de colon, ya que son fundamentales en la producción de metabolitos como la urolitina.

Evidentemente la vía de carcinogénesis de colon no es una sola y probablemente existan varios caminos para el inicio, desarrollo y progresión del cáncer de colon aún no

descritos, pero, cada paso que se dé, en el desarrollo de las investigaciones sobre la carcinogénesis de colon, será un avance en el conocimiento de sus mecanismos y en la manera de poder evitar los efectos de esta enfermedad. En este ámbito, el aumento de los estudios científicos sobre los polifenoles, y el ácido elágico presente en la granada (*Punica granatum*) y sus metabolitos, tanto en líneas celulares como en ratas y humanos, generan expectativas para nuevas terapias complementarias, en la prevención y protección del cáncer de colon, este sería uno de los caminos, para evitar los efectos de esta cruel enfermedad.

Cualquiera sea la evaluación de la contribución general de las dietas ricas en frutas y verduras en la protección y prevención del cáncer de colon, es indiscutible que la presencia de fitoquímicos es importante en su acción sobre las células humanas, en especial los presentes en la granada como el ácido elágico y sus metabolitos, pero sin lugar a dudas, existen algunas debilidades que impiden el éxito generalizado de estas dietas fitoprotectoras. Es importante mencionar, por ejemplo, que la mayoría de los estudios se realizan *in vitro* utilizando líneas celulares aplicando directamente sobre estas los compuesto vegetales, a través de extractos o compuestos activos aislados y no consideran todos los procesos que se realizan para que estos compuesto puedan llegar a los órganos blancos, tales como, la degradación microbiana, acción de enzimas digestivas, las condiciones específicas de cada individuo o las diferencias de concentraciones de los compuestos activos dentro de cada fruta o verdura. Sin embargo, los estudios realizados directamente en humanos, aunque sean una minoría, han generado datos importantes para validar las acciones de los fitoquímicos sobre el cáncer de colon y otras enfermedades.

23.-BIBLIOGRAFÍA

- Aberle, H., Bauer, A. et al (1997). "Beta-Catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." EMBO J. **16**: 3797-3804.
- Adachi, Y., Yamamoto, H. et al (1999). "Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers." Gut **45**(2): 252-258.
- Adams, L., S.Seeram, et al (2006). "Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells." J Agric Food Chem **54**(3): 980-985.
- Adhami, M., Khan, N., et al. (2006). "Insuline - Like growth factor-I axis as a patway for cancer chemoprevention." Nutr Cancer **12**: 5611-5614.
- Adhami, M., Khan, Naghma., et al. (2009). "Cancer Chemoprevention by Pomegranate: Laboratory and Clinical Evidence." Nutr Cancer **61** (6): 811-815.
- Adhami, M., Mukhtar, Hasan. (2007). "Anti-oxidants from green Tea and Pomegranate for Chemoprevention of prostate Cancer." Mol biotechnol **37**: 52-57.
- Agarwal, C., Singh,P. et al (2002). "Grape seed extract induces apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells via caspases activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release." Carcinog. **23**(11): 1869-1876.
- Aguilar, C., Aguilera-Carbo, Antonio. et al (2008). "Production of Antioxidant Nutraceuticals by Solid-State Cultures of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Leaves." Food Technol. Biotechnol **46**(2): 218-222.
- Aguilera-Carbo, A., Augur, Christofer.et al (2008). "Extraccion and analysis of ellagic acid from novel complex sources." Chem papers **62**(4): 440-444.
- Albini, A., Benelli,Roberto.et al (2004). "The "chemoinvasion assay": a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes." Nat. Cancer research **48**: 563-571.
- Altieri, C., Marchisio,C.et al (1999). "Survivin apoptosis:An interloper between cell death and cell proliferation in cancer." J. of tech. and pathology **79**(11): 1327-1333.
- Ambrosini, G., Adida, Collette.et al (1997). "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma." Nat. medicine **3**(8): 917-921.
- Anand, P., Kunnumakara,Ajaikumar. et al (2008). "Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes." Pharma Res **25**(9): 2097-2116.
- Andreasen, A., Kjoller,L.et al (1997). "The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis.Review." Int J Cancer **72**: 1-22.
- Annabi, B., Lachambre,P.et al (2002). "Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells." Biochim Biophys Acta **1542**(1-3): 209-220.
- Araújo, J., Goncalves, Pedro.et al (2011). "Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines." Science Direct **31**: 77- 87.
- Aravena, T., Passalacqua, Cristobal.et al (2010). "Cáncer hereditario de colon:Aportes del diagnostico genético molecular." Rev Méd Chile **138**(5): 1530 - 1534.

- Arranz, S. (2010). " Compuestos polifenólicos(extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española:Metodología para su determinación e identificación." J. of Agricul. and Food Chemistry **57**(): 7298-7303.
- Azios, N., Dharmawardhane,S. (2005). "Resveratrol and Estradiol Exert Disparate Effects on Cell Migration, Cell Surface Actin Structures, and Focal Adhesion Assembly in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells." Neopl. **7**(2): 128-140.
- Bach, S., Renehan, A. et al. (2000). "The intestinal stem cell as a paradigm." Carcinogen. **21**(3): 469-476.
- Bala, I., Bhardwaj,V.et al (2006). "Analytical methods for assay of ellagic acid its solubility studies." Elservier **40**(1): 206-210.
- Balbin, M. P., A. et al (1999). "Expression and regulation of collagenasa-3(MMP-3) in human malignat tumors." APMIS **107**: 45-53.
- Bao, R., Connolly,C.et al (2002). "Activation of cancer specific gene expression by the survivin promoter." J. of the Nat. cancer **94**(7): 522-528.
- Bell, C., Hawthorne, S. (2008). "Ellagic acid,pomegranate and prostate cancer-a mini review." j. of phar. and pharmacology **60**: 139-144.
- Benito, M., Diaz-Rubio, E. (2006). "Molecular biology in colorectal cancer." Clin Transl Oncol **8**(6): 391-398.
- Bingham, S., Day, NE. et al (2003). "Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study." Lancet Oncol **361**: 1496-1501.
- Bird, A. (1986). "CpG-rich islands and the function of DNA methylation. ." Nat- **321**: 209-213.
- Bjorklund, M., Koivunen, E. (2005). "Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells." Biochim Biophys Acta **1755**(1): 37-69.
- Boon, M., Elles,J,et al (2002). "Wnt Signaling Regulates Expression of the Receptor Tyrosine Kinase Met in Colorectal Cancer." Cancer res. **62**: 5126-5128.
- Bottaro, P., Rubin,J. et al (1991). "Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c met proto-oncogene product." Science **251**(4995): 802-804.
- Bracke, M., Van Roy, F. et al (1996). "The E-cadherin/Catenin Complex in Invasion and Metastasis." Curr. and microbiol and inmunity **213**(1): 123-161.
- Breslow, R., Graubard, BI. et al (2000). "Diet and lung cancer mortality: a 1987 National Health Interview Survey cohort of Finnish men. ." Can. Causes Control. **11**: 419-431.
- Brew, K., Dinakarbandian,D. et al (2000). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution,structure and function." Biochem Biophysica Acta **1477**: 267-283.
- Bright-Thomas, M., Agrawal, A. et al (2002). "Preclinical studies of gene transfer for the treatment of desmoid disease in familial adenomatous polyposis." Br J Surg **89**(12): 1563-1569.
- Brown, P. (1999). "Clinical studies with matrix metalloproteinases inhibitors." APMIS **107**: 174-180.
- Cabrera, M., Lopez-Nevot A. (2005). "APC e inestabilidad cromosómica en cáncer de colon." Rev Esp Enferm Dig **97**(10): 738-743.
- Cadiñanos, J., Freije, José et al (2009). "Invasión tumoral y metastasis." monografias de la real academia de farmacia. **VIII**: 37-64.
- Cahill, D., Lengauer, C. et al (1998). "Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers." Nat. **392**: 300-303.

- Cairns, A., Khoklar, P. (2003). "Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view." Curr Mol Med **3**(1): 659-671.
- Castellvi-Bel, S., Castells, A. (2005). "Genetic and molecular biology techniques for the analysis of hereditary colorectal cancer." Gastroenter Hepatol **28**(6): 354-360.
- Catalan, V., Honorato, B. et al (2003). "Carcinogenesis colónica: proceso de transformación neoplásica." Rev. médica Universitaria Navarra **47**(1): 15-19.
- Cerdá, B., Cerón, J. et al (2003). "Repeated Oral Administration of High Doses of the Pomegranate Ellagitannin Punicalagin to Rats for 37 Days Is Not Toxic." J Agric Food Chem **51**(11): 3493-3501.
- Clifford, M. S., A. (2000). "Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden." J. of the science of food and agricul **80**(7): 1118-1125.
- Corzo, C., Petzold, M. et al (2003). "RxFISH karyotype and MYC amplification in the HT-29 colon adenocarcinoma cell line." Gen Chromo Cancer **36**(4): 425-426.
- Crisby, M. (2003). "Modulation of the inflammatory process by statins. ." Drugs Today (Barc) **39**(2): 137-143.
- Crowell, A., Steele, E. et al (2003). "Is inducible nitric oxide synthase a target for chemoprevention?" Mol .cancer Ther **2**: 815-823.
- Cruz- Bustillo, C. (2004). "Genética molecular del cáncer colorrectal." Rev Esp Enf Dig **96**(1): 48-59.
- Cruz- Bustillo, C. (2005). "Genomic instability and colorectal cancer." Rev Esp Enf Dig **97**(10): 638-687.
- Cruz-Atonio, F., Saucedo-Pompa, S. et al (2010). "Propiedades Químicas e industriales del ácido elágico,." AQM **3**: 1-12.
- Chambers, A., Matrisian, L. (1997). "Changing Views of the Role of Matrix Metalloproteinases in Metastasis." J. of the Nat cancer **89**(17): 1260-1270.
- Charla, A., Repa, Joyce. et al (2001). "Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files." Science **294**(5548): 1866-1870.
- Chasquibol, N., Lengua, Laura. et al (2003). "Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia." Rev .Per.Quim.Ing.Quim: **5**(2): 9-20.
- Chen, C., Shen, G. et al (2003). "Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells." Carcinog **24**(8): 1369-1378.
- Chin, D., Boyle, M. et al (2005). "Invasion and metastasis markers in cancers." Br J Plast Surg **58**(4): 466-474.
- Davis, C., Milner, J. (2009). "Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention." J Nutr Biochem **20**(10): 743-752.
- De Kok, M., Van Breda, G. et al (2008). "Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review." Eur J Nutr **47** (2): 51-59.
- De la Cruz, R., Aguilera-Carbó, A. et al (2011). "Degradación microbiana de elagitaninos." Bio Tecn **15**(3): 11-18.
- Deroo, B., Korach, Kenneth. (2006). "Estrogen receptors and human disease." J Clin Invest **116**(3): 561-570.
- Deschner, E., Lipkin, M. (1975). "Proliferative patterns in colonic mucosa in familial polyposis." cancer **35**: 413-418.
- Dvorak, H., Brown, L. et al (1995). " Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor microvascular ,hypermeability and angiogenesis." American journal of pathology **146**(5): 1029-1039.

- Eberhart, E., Coffey, J. et al (1994). "Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas." Gastroenterology **107**: 1183-1188.
- Ebert, P., Schmid, R. et al (2007). "Need for a paradigm shift in cancer prevention and clinical oncology." Expert rev. anticancer **7**: 1363-1367.
- Eccles, A. (1999). "Heparanase: breaking down barriers in tumor." Nat. Med **5**(7): 735-736.
- Edderkaoui, M., Odinkova, I. et al (2008). "Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor kappa B in pancreatic cancer cells. ." World J Gastro **14**: 3672-3680.
- Esteller, M. (2006). "CpG island methylation and histone modifications: biology and significance." Ernst Schering Res Found Workshop: 115-126.
- Esteller, M., Herman, J. (2002). "Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin in human tumours. ." J Pathol **196**: 1-7.
- Farnsworth, N. (1996). "Biological and phytochemical screening of plant." J. Pharmac **55**(3): 225-275.
- Fearnhead, N., Britton, M. et al (2001). "The ABC of APC." Hum Mol genet **10**(7): 721-733.
- Fearon, E. (2004). "Defining the Microsatellite instability phenotype in colorectal cancer through analysis of Surrogate Markers." Cancer Biol ther **3**(1): 79-81.
- Fearon, E., Vogelstein, B. (1990). "A genetic model of colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.
- Ferguson, J., Knobloch, T. et al (2008). "Age-related differences in black raspberry modulated NFκB expression in oral squamous cell carcinoma patients. ." Proc. Seventh Ann. Amer. Assn. Cancer Res. Int. Conf. on Frontiers in Cancer Prev. Res **A66**:89.
- Finlay, J. (1993). "Genetics, molecular biology and colorectal cancer." Mutat Res **290**(1): 3-12.
- Fishel, R., Lescoe, K. et al (1993). "The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer cell." Elsevier **75**(5): 1027-1038.
- Fodde, R. (2003). "The multiple functions of tumor suppressors: It's all in APC." Nat cell biol **5**: 190-192.
- Fodde, R., Kuipers, J. et al (2001). "Mutations in the APC tumor suppressor gene cause chromosomal instability." Nat Cell Biol **3**: 433-438.
- Freije, J. M., N. et al (1996). "Differential gene expression in tumor Metastasis: Nm23." Curr.Top:Microbiol.Inmunol. **213**: 215-232.
- Friedl, P., Wolf, K. (2003). "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms." Nat Rev Cancer **3**(5): 362-374.
- Galiano de Sanchez, M. (2005). "Cáncer colorrectal." Rev Col Gastroenterol **20**(1): 43-53.
- Gelman, L., Fruchart, J. et al (1999). "An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer." Cel and mol life Sciences **55**(6-7): 932-943.
- Ghosh, J., Myers, C. (1999). "Central role of arachidonate 5-lipoxygenase in the regulation of cell growth and apoptosis in human prostate cancer cells." Adv.Exp.Med.Biol **469**: 577-582.
- Giarnieri, E., Midiri, G. et al (2003). "From molecular biology to new treatment approaches to colorectal cancer: basic research, experimental trials and surgical implications." G Chir **24**(4): 109-114.
- Goldstein, J. L., Brown, M.S. (1990). "Regulation of the mevalonate pathway." Nature **343**: 425-430.

- Gómez, E., Alonso, F. et al (1997). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions." Eur J cell biol **74**(2): 111-112.
- Gonzalez-Sarrias, A., Azorin-Ortuno, M. et al (2009). "Dissimilar in vitro and in vivo effects of ellagic acid and its microbiota-derived metabolites, urolithins, on the cytochrome P450 1A1." J Agric Food Chem **57**(12): 5623-5632.
- Gonzalez-Sarrias, A., Espin, C. et al (2009). "Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins." Mol Nutr Food Res **53**(6): 686-698.
- Green, R., Kaplan, K. (2003). "Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. ." J Cell Biol **163**: 949-961.
- Groden, J., Thliveris, A. et al (1991). "Identification and Characterization of the Familial Adenomatous Polyposis Coli Gene " Cell **66**: 589-600.
- Gryfe, R., Swallow, C. et al (1997). "Molecular biology of colorectal cancer." Curr Probl Cancer **21**(5): 233-300.
- Hahn, M., Koufaki, N. et al (1998). "Molecular biology of colorectal cancer and clinical consequences for colorectal cancer syndromes." Langenb Arch Surg **383**(6): 389-396.
- Hahn, M., Saeger, D. et al (1999). "Hereditary colorectal cancer: clinical consequences of predictive molecular testing." Int J colorectal Dis **14**: 184-193.
- Hanahan, D., Folkman, J. (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." cell **86**(3): 353-364.
- Hanahan, D. W., R. (2000). "The Halmarks of Cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hardisson, A., Castell, S. (1998). "Cancerígenos en alimentos " Alimen **88**: 71-85.
- Hart, M., De los Santos, R. et al (1998). "Downregulation of b-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, b-catenin and GSK3b." Cur Biol **8**(10): 573-581.
- Heber, D. (2008). "Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins." Elservier **269**: 262-268.
- Hirose, M. N. A. e. a. (2002). "Chemoprevention of heterocyclic Amine-Induced Mammary carcinogenesis in rats." Env and Mol Mut **39**: 271-278.
- Hora, J., Maydew, E. et al (2003). "Chemopreventive Effects of Pomegranate Seed Oil on Skin Tumor Development in CD1 Mice." j. of Med food **6**(3): 157-161.
- Huang, Y., Pledgie, A. et al (2005). "Molecular mechanisms of poliaminas analogs in cancer cells." Anti-cancer drug **16**(3): 229-241.
- Huelsken, J., Birchmeter, W. (2001). "New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates." Elsevier **11**(5): 47-553.
- Huetz, P., Mavaddat, N. et al (2005). "Reaction between Ellagic Acid and an Ultimate Carcinogen." Amer Chem Soc **45**(6): 1564-1570.
- Hulett, M., Freeman, C. et al (1999). "Cloning of mammalian heparanase an important enzyme in tumor progression and metastasis." Nat. Med. **5**: 803-809.
- Ilyas, M., Straub J. et al (1999). "Genetic pathways in colorectal and other cancers." Eur J Cancer **35**(14): 1986-2002.
- Ito, H., Marie-Paule, G. et al (2005). "Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages." Brit J of Nut **94**: 500-509.
- Jäne, P., Pösö, H. et al (1978). "Poliamines growth and cancer." Biochim et Biop Acta **473**: 241-293.
- Jemal, M. W., E. et al (2005). "Cancer statistic 2005." CA Cancer J clin **55**(1): 10-30.

- Jiang, J., Struhl, G. (1998). "Regulation of the Hedgehog and Wntless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb." Nat **391**: 493-496.
- Jo, E., Lee, S. et al (2007). "Induction of apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells by Oligonol is mediated by Bcl-2 family regulation and MEK/ERK signaling." Eur J Cancer Prev. **16**(4): 342-347.
- Johanningsmeier, S., Harris, K. (2011). "Pomegranate as a functional food and nutraceutical Source." Annu. rev. Food Sci. technol **2**: 181-201.
- Johnson, I. (2007). "Phytochemicals and cancer." Proceedings of the Nutrition Society **66** 207-215.
- Jurenka, J. (2008). "Therapeutic application of Pomegranate (Punica granatum)." Alt. Medicine **13**: 128 -144.
- Kantor, J., McCormick, B. et al (1993). "Inhibition of Cell Motility after nm23 Transfection of Human and Murine Tumor Cells." Can Res **53**: 1971-1973.
- Kargozaran, H., Kahlenberg, M. et al (2008). "The implications of colorectal cancer molecular biology in clinical practice." Surg Oncol Clin N Am **17**(2): 341-355.
- Kasimsetty, G., Bialonska, D. et al (2009). "Effects of pomegranate chemical constituents/intestinal microbial metabolites on CYP1B1 in 22Rv1 prostate cancer cells." J Agric Food Chem **57**(22): 10636-10644.
- Kasimsetty, G., Bialonska, D. et al (2010). "Colon cancer chemopreventive activities of pomegranate ellagitannins and urolithins." J Agric Food Chem **58**(4): 2180-2187.
- Kaur, M., Singh, P. et al (2006). "Grape seed extract inhibits in vitro and in vivo growth of human colorectal carcinoma cells." Clin Cancer Res **12**(20): 6194-6202.
- Kawasaki, Y., Senda, T. et al (2000). "Asef, a Link Between the Tumor Suppressor APC and G-Protein Signaling." Science **289**(5482): 1194-2000.
- Keely, P., Westwick, J. et al (1997). "Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K." Nature **390**: 632-636.
- Khan, A. (2009). "The role of pomegranate (Punica granatum L.) in colon cancer." Pak J Pharm Sci **22**(3): 346-348.
- Khan, N., Nagma, H. et al (2007). "pomegranate fruit extract inhibit prosurvival pathway in human A 549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice " Carcinogen **28**(1): 163-173.
- Khanbabaee, K., Ree, V. (2001). "Tannins: classification and definition." Nat. Prod. Rep **18**: 641-649.
- Kinze, K., Vogelstein B. (1996). "Lessong from hereditary colorectal cancer." Cell **87**: 159-170.
- Kinzler, W., Nilbert, C. et al (1991). "Identification of FAP locus genes from 5q21." Science **253**(5020): 661-665.
- Kitisin, K., Mishra, L. (2006). "Molecular biology of colorectal cancer: new targets." Semin Oncol **33**(11): 14-23.
- Klominek, J. R., K. et al (1993). "Chemotaxis and haptotaxis of human malignant mesothelioma cells: Effects of fibronectin, laminin, type IV collagen and autocrine motility factor like substance." Cancer Res. **53**: 4376-4382.
- Klug, W., Cummings, M. et al (2006). Conceptos de Genética. Madrid, España, Pearson, Pren Hall.
- Knäuper, V., López-otin, C. et al (1996). "Biochemical characteritaton of human collagenase-3." J. Biol. Chem **271**: 1544-1550.

- Knobloch, T., Lee, M. et al (2007). "Gene expression changes in oral tissues following black raspberry exposure: Interim Affymetrix assay analysis of a Phase 1 clinical trial. ." Proc. Sixth Ann. Amer. Assn. Cancer Res. Int. Conf. on Frontiers in Cancer Prev. Res. **A129**: 110.
- Ko, H., Shen, C. et al (2005). "Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein expression and enzyme activity in colorectal carcinoma cells." Mol Cancer Ther **4**(2): 281-290.
- Kohno, H., Suzuki, R. et al (2004). "Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats." Cancer Sci **95**(6): 481-486.
- Kresty, L., Frankel, W. et al (2006). "Transitioning from preclinical to clinical chemopreventive assessments of lyophilized black raspberries: interim results show berries modulate markers of oxidative stress in Barrett's esophagus patients. ." Nutr Cancer **54**: 148-156.
- Kumar, R. (2005). "Commentary: targeting colorectal cancer through molecular biology." Semin Oncol **32**(6): 37-39.
- Lansky, E., Newman, R. (2007). "Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of cancer." J. Ethnopharm **109**: 177-206.
- Larrosa, M., Gonzalez-Sarrias, A. et al (2006). "Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities." J Agric Food Chem **54**(5): 1611-1620.
- Lauffenburger, A., Horwitz, F. (1996). "Cell Migration: A physically integrated molecular process." Cell **84**: 359-369.
- Lea, A., Ibeh, C. et al (2010). "Inhibition of growth and induction of differentiation markers by polyphenolic molecules and histone deacetylase inhibitors in colon cancer cells." Anticancer Res **30**(2): 311-318.
- Levitt, N., Hickson D. (2002). "Caretaker tumor suppressor genes that defend genome integrity." Trends in molecular medicine **8**(4): 179-186.
- Li Volti, G., Sacerdoti, D. (2005). "Carbon Monoxide Signaling in Promoting Angiogenesis in Human Microvessel Endothelial Cells." Antiox Red Signal **7**(5): 704-710.
- Liotta, L., Kleinerman J. et al (1986). "Tumor Invasion and Metastases- Role of the Extracellular Matrix." Can Res **46**: 1-7.
- Liotta, L., Kleinerman, J. et al (1977). "Degradation of basement membrane by murine tumor cells." JNCI J Natl Cancer Inst **58**(5): 1427-1431.
- Liotta, L., Steller-Stevenson, G. (1991). "Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation." Cancer Res **51**: 5054 -5059.
- Lipkin, M., Sherlock, P. et al (1962). "Generation Time of Epithelial Cells in the Human Colon." Lett to nat **195**: 175-177.
- Liu, C., Park, M. et al (1992). "Over expression of c met proto-oncogen but not epidermal growth factor receptor or C erb-2 in primary." oncog **7**(1): 181-185.
- Losso, J., Bansode, R. et al (2004). "In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid." J. of nutr biochem **15**(11): 672-678.
- Lu, J., Ding K. et al (2008). "Determination of Punicalagin isomers in pomegranate husk." Chromatograph **68**(3): 303-306.
- MacDonald, I., Groom, A. et al (2002). "Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models." BioEss **24**: 885-893.
- Machado, T., Leal, I. et al (2002). "Antimicrobial Ellagitannin of Punica granatum Fruits." Sociedade brasileira de Química **13**(5): 606-610.

- Maihofner, C., Charalambous, M. et al (2003). "Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NFkappaB in human colorectal cancer." Carcinog **24**: 665-671.
- Malik, A., Afaq, F. et al (2005). "Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer." PNAS **102**(41): 14813-14818.
- Malik, A., Mukhtar, H. (2006). "Prostate Cancer Prevention Through Pomegranate Fruit." Cell Cycle **5**(4): 371-373.
- Mallery, S., Zwick, J. et al (2008). "Topical application of a bioadhesive black raspberry gel modulates gene expression and reduces cyclooxygenase 2 protein in human premalignant oral lesions." Cancer Res **68**: 4945-4957.
- Markowitz, S., Bertagnolli, M. (2009). "Molecular basis of cancer colorectal." The new Engl. j. of med. **361**(25): 2449-2460.
- Melo, S. M., C. et al (2010). "A Genetic Defect in Exportin-5 Traps Precursor MicroRNAs in the Nucleus of Cancer Cells." cancer cell **18**: 303-315.
- Mertens-Talcott, U., Lee, H. et al (2006). "Induction of cell death in Caco-2 human colon carcinoma cells by ellagic acid rich fractions from muscadine grapes (*Vitis rotundifolia*)." J Agric Food Chem **54**(15): 5336-5343.
- Michor, F., Iwasa, Y. et al (2005). "Dynamics of colorectal cancer." Can Biol **15**: 484-493.
- Mita, C., Mita, M. et al (2008). "Survivin: Key Regulator of Mitosis and Apoptosis and Novel Target for Cancer Therapeutics." Clin Cancer Res **14**(16): 5000-5005.
- Morgan, M. (1998). "Polyamines: An introduction." Meth in mol Biol **79**: 3-30.
- Mori, H., Hata, K. et al (2005). "Significance and role of early-lesions in experimental colorectal carcinogenesis." Chem-Biol inter **155**: 1-9.
- Murata, J., Lee, Y. et al (1994). "cDNA Cloning of the Human Tumor Motility-stimulating Protein, Autotaxin, Reveals a Homology with Phosphodiesterase." The j. of biol chem **269**(48): 30479-30484.
- Naczka, M., Shahidi, F. (2004). "Extraction and analysis of phenolics in food." Chromat **1054**(1-2): 95-111.
- Narayanan, A., Re, G. (2001). "IGF-II down regulation associated cell cycle arrest in colon cancer cells exposed to phenolic antioxidant ellagic acid." Anticancer Res **21**(1): 359-364.
- Nijhoff, W., Groen, G. et al (1993). "Induction of rat hepatic and intestinal glutathione S-transferases and glutathione by dietary naturally occurring anticarcinogens. ." Inter j of oncol **3**: 1131-1139.
- Nishisho, Y., Miyoshi, Y. et al (1991). "Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients." Science **253**(5020): 665-669.
- Norman, H., Butrum, R. et al (2003). "The Role of Dietary Supplements during Cancer Therapy." J. nutr. **133**: 3794 -3799.
- Notka, F., Meier, G. et al (2004). " Concert inhibitory activities of Phyllanthus amarus on VIH replication in vitro and ex vivo." Ant res **63**(2): 93-102.
- Orellana, M., Guajardo, V. (2004). "Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías." Rev Méd Chile. **132**: 85-94.
- Pantuck, J., Leppert, T. et al (2006). "Phase II Study of pomegranate Juice for Men with Rising Prostate - Specific Antigen Following Surgery or Radiation for Prostate Cancer." Clin Can res **12**: 4018-4026.

- Peltomäki, P. (2001). "DNA mismatch repair and cancer." *Mut Res* **488**: 77-85.
- Pereira, A., Khoury, D. (1991). "Prevention by chemopreventive agents of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon." *Can. Lett.* **61**(1): 27-33.
- Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." *Gen and develop* **14**: 1837-1851.
- Potter, D. (1999). "Colorectal cancer: Molecules and population. ." *J.nat cancer inst.* **91**(): 916-932.
- Powell, W., Matrisian, L. (1996). "Complex Roles of Matrix Metalloproteinases in Tumor Progression." *Curr and microbio and inmuno* **231**(1): 1-21.
- Powell, W., Matrisian,L. (1996). "Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression." *Curr,Top.Microb.Inmuno* **213**: 1-21.
- Prescott, M., Fitzpatrick,A. (2000). "Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis." *Biochim.Biophys acta* **1470**: 69-78.
- Pretlow, T., O'Riordan, A., et al (1992). "Aberrant crypts in human colonic mucosa: Putative preneoplastic lesions." *J of Cell Bio* **50**(16): 55-62.
- Ramos, S. (2008). "Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways." *Mol Nutr Food Res* **52**(5): 507-526.
- Rao, C. (2004). "Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention." *Mutat Res* **555**: 107-119.
- Rao, V., Tokumo, K. et al (1991). "Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary administration of piroxicam, alpha-difluoromethylornithine, 16 alpha-fluoro-5-androsten-17-one, and ellagic acid individually and in combination." *Cancer Res* **51**(17): 4528-4534.
- Robles-Agudo, F., Snaz-segovia, F. et al (2005). "Alimentación y Cáncer." *Rev.Esp.Geriatric Gerontol* **40**(3): 184-194.
- Rubinfeld, B., Albert,I. et al (1996). "Binding of GSK3 β to the APC- β -Catenin Complex and Regulation of Complex Assembly." *Science* **272** (5264): 1023-1026.
- Rubinfeld, B., Souza, B. et al (1993). "Association of the APC gene product with beta-catenin. ." *Science* **262**(5140): 1731-1734.
- Sardinha, C., Noguerras, J. et al (2000). "Membrane-type 1 matrix metalloproteinase mRNA expression in colorectal cancer." *Dis Colon Rectum* **43**(3): 389-395.
- Saruwatari, A., Okamura, S. et al (2008). "Pomegranate juice inhibits sulfoconjugation in Caco-2 human colon carcinoma cells." *J Med Food* **11**(4): 623-628.
- Seeram, P., Aronson, J. et al (2007). "Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland." *J Agric Food Chem* **55**(19): 7732-7737.
- Seeram, P., Henning,S. et al (2006). "Pomegranate Juice Ellagitannin Metabolites Are Present in Human Plasma and Some Persist in Urine for Up to 48 Hours." *j of nutr.* **136**: 2481-2485.
- Seeram, P., Lee,R. et al (2005). "Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk,a by-productsof commercial juice industry." *Elservier* **41**(1): 49-55.
- Seeram, P., Lee.R. et al (2004). "Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate(Punica granatum.)juice." *Clin Chim Acta* **348**(1-2): 63-68.
- Seeram, P., Yanjun Z. et al (2008). "Pomegranate Juice and Extracts Provide Similar Levels of Plasma and Urinary Ellagitannin Metabolites in Human Subjects." *j. of med food* **11**(2): 390-394.
- Seiler, N. (2003). "Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy.Retrospect and propspect.Part 1.Selective enzyme inhibitors." *Curr.Drug Targets* **4**: 537-564.

- Shulman, A., Mangelsdorf, David. (2005). "Retinoid X Receptor Heterodimers in the Metabolic Syndrome." N Engl J Med **353**: 604-615.
- Shumway, B., Kresty, L. et al (2008). "Effects of a topically applied bioadhesive berry gel on loss of heterozygosity indices in premalignant oral lesions. ." Clin Cancer Res **14**: 2421-2430.
- Signorelli, P., Ghidoni, R. (2005). "Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises." J.Nutr.Biochem **16**(8): 449-466.
- Slattery, M., Lunggreen, A. et al (2011). "Tumor necrosis factor-related genes and colon and rectal cancer." Int J Mol epidemiol genet **2**(4): 328-338.
- Souza, R., Appel, R. et al (1996). "Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. ." Nat Genet **14**: 255-257.
- Stoner, D. (2009). "Foodstuffs for Preventing Cancer: The Preclinical and Clinical Development of Berries." Cancer Prev Res **2**(3): 187-194.
- Stoner, D., Sardo,C. et al (2005). "Pharmacokinetics of anthocyanins and ellagic acid in healthy volunteers fed freeze-dried black raspberries daily for 7 days." The j. of clin Pharma **45**(10): 1153-1164.
- Stracke, M., Krutzsch,H. et al (1992). "Identification, Purification, and Partial Sequence Analysis of Autotaxin, a Novel Motility-stimulating Protein." The j. of biol chem **267**(4): 2524-2529.
- Sturgeon, S., Ronnenberg,A. (2010). "Pomegranate and breast cancer: possible mechanisms of prevention." Nutr Rev. **68**(2): 122-128.
- Su, L., Burrell, M. et al (1995). "APC Binds to the Novel Protein EB1." Cancer Res **55**: 2972-2977.
- Su, L., Vogelstein, B. et al (1993). "Association of the APC tumor suppressor protein with catenins." Science **262**(5140): 1734-1737.
- Surh, Y., Ferguson,L. (2003). "Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens:molecular mechanisms and chemopreventive potential—highlights of a symposium." Elsevier **523**: 1-8.
- Suzanne, H., Tummala, R. et al (2008). "Polyamine catabolism in colorectal cancer cells following treatment with oxaliplatin, 5-fluorouracil and N1,N11 diethylnorspermine." Cancer Chem Pharma **62**: 517-527.
- Syed, D., Afaq, F. et al (2007). "Pomegranate derived products for cancer chemoprevention." Elsevier **17**: 377-385.
- Takahashi, M., Mutoh, M. et al (2000). "Altered expression of beta-catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethaneinduced rat colon carcinogenesis." Carcinog **21**: 1319-1327.
- Takayama, T., Katsuki, S. et al (1998). "Aberrant Crypt Foci of the Colon as Precursors of Adenoma and Cancer." N Engl J Med **339**: 1277-1284.
- Tanaka, T. (2009). "Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies." J. Carcinog **8**(1): 1-5.
- Taylor, E. G., T. (2008). "Emerging fundamental roles for noncoding RNA species in toxicology." Toxicol **246**: 34-39.
- Tetsu, O., McCormick,F. (1999). "B-catenina regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma." Nat cell biol **398**: 422- 426.
- Thibodeau, N., Bren, G. et al (1993). "Microsatellite instability in cancer of the proximal colon." Science **260**(5109): 816-819.
- Thliveris, A., Albertsen, H. et al (1996). "Long-Range Physical Map and Deletion Characterization of the 1100-kbNotI Restriction Fragment Harboring theAPCGene." Elsevier **34**(2): 268-270.

- Tomari, Y., Zamore, P. (2005). "Perspective. Machine for RNAi." Gen. dev. **19**: 517-529.
- Umesalma, S., Sudhandiran, G. (2009). "Chemomodulation of the antioxidative enzymes and peroxidative damage in the colon of 1,2-dimethyl hydrazine-induced rats by ellagic acid." Phyto Res **24** (1): 114-119.
- Umesalma, S., Sudhandiran, G. (2010). "Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF-kappaB, iNOS, COX-2, TNF-alpha, and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis." Basic Clin Pharma Tox **107**(2): 650-655.
- Uria, J. L.-O., C. (2000). "Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency and activity." Cancer Res. **60**: 4745-4751.
- Uria, J. S.-B., M. et al (1997). "Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinoma is mediated by stromal-epithelial cell interaction." Can Res **57**: 4882-4888.
- Van de Wetering, M., Sancho, E. et al (2002). "The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells." Cell **111**(2): 241-250.
- Van der Logt, M., Roelofs, M. et al (2003). "Induction of rat hepatic and intestinal UDP-glucuronosyltransferases by naturally occurring dietary anticarcinogens." Carcinog **24**(10): 1651-1656.
- van Es, J., Giles R, et al (2001). "The Many Faces of the Tumor Suppressor Gene APC." Exp Cell Res **264**: 126-134.
- Van Lieshout, M., Bedaf, G. et al (1998). "Effect of dietary anticarcinogens on rat gastrointestinal glutathione S-transferase theta 1-1-levels." Carcinog **19**(11): 2055-2057
- Vandebroek, I., Van Damme, P. et al (2004). "A comparison of traditional healers' medicinal plant knowledge in the Bolivian Andes and Amazon." Elsevier **59**: 837-849.
- Vargas, P., Alberts, Davis. (1992). "Primary Prevention of Colorectal Cancer Through Dietary Modification." Cancer **70**: 1229-1235.
- Vásques-Ortiz, G., Piña-Sánchez, P. et al (2006). "Grandes alcances de los RNA pequeños, RNA de interferencia y microRNA." Rev. Inv. Clin **58**(4): 335-349.
- Verbeke, S., Martín, R. et al (2001). "Papel del tejido conectivo en la morfología y función de la mucosa intestinal. Su importancia en la patogenia de la enfermedad celíaca." Rev. Méd de Chile **129**(11): 1333-1342.
- Viñes, J., Ardanaz, E. et al (2003). "Population-based epidemiology of colorectal cancer: causality review." Ana Sis San Nav. **26**(1): 79-97.
- Vlodavsky, I., Friedmann, Y. et al (1999). "Mammalian heparanase: Gene cloning expression and function in tumor progression and metastasis." Nat. Med. **5**: 793-802.
- VolK, T., Giger, B. et al (1984). "Motility and adhesive properties of high- and low metastatic murine neoplastic cells." Cancer Res. **44**: 811-824.
- Wallace, M., Caslake, R. (2001). "Polyamines and colon cancer." Eur. J. Gastroenterol and Hepatol **13**(9): 1033-1039.
- Wallace, M., Fraser, A. et al (2003). "A perspective of polyamine metabolism." Biochem. J. **376**: 1-14.
- Wang, L., Sardo, C. et al (2008). "Chemoprevention of human colorectal cancer with freeze-dried black raspberries." Proc. 99th Amer. Assn. Cancer Res **328**: 110.

- Wang, W., Heideman, L. et al (2000). "Cell-Cycle Arrest at G2/M and Growth Inhibition by Apigenin in Human Colon Carcinoma Cell Lines." Mol carcinog **28**: 102-110.
- Welman, A., Cawthorne, C. et al (2006). "Increases in c-Src expression level and activity do not promote the growth of human colorectal carcinoma cells in vitro and in vivo." Neoplas **8**(11): 905-916.
- Weng, C.-j. Y., Gow-Chin. (2011). "Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives." Cancer Treat Rev
- Weng, C., Yen G. (2011). "Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives." cancer Treat Rev **3**: 1-12.
- Wenzel, U., Schoberl, K. et al (2005). "Activation of mitochondrial lactate uptake by flavone induces apoptosis in human colon cancer cells." J Cell Physiol **202**(2): 379-390.
- Whitley, A., Sweet, H. et al (2006). "Site-specific accumulation of the cancer preventive dietary polyphenol ellagic acid in epithelial cells of the aerodigestive tract." J Pharm Pharmacol **58**(9): 1201-1209.
- Who, J. (2003). "Expert Report on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Disease." genev **916**: 23-25.
- Wielenga, J., Smits, R. et al (1999). "Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway." Am. J. Pathol **154**: 515-523.
- Williams, S., Mann, M. et al (1999). "The role of cyclooxygenase in inflammation, cancer, and development." oncog **18**: 7908-7916.
- Winters, D., Cerdeba, A. (1993). "Biochemistry of Cytochrome P450. In Hepatic and bile secretion." Physiol and Pathol **27**: 407-420.
- Wong, C., Alexander, N. et al (2002). "Catenin—A Linchpin in Colorectal Carcinogenesis?" A. J. of pathol. **160**(2): 389-401.
- Wong, N., Pignatelli, M. (2002). "B catenina and colorectal carcinoma." A. J of Pathol **160**(2): 389-401.
- Woodhouse, C., Chuaqui, F. et al (1997). "General mechanisms of metastasis." Cancer **80**(8): 1529-1537.
- Worthley, D., Leggett, Barbara. (2010). "Molecular features and clinical opportunities." Clin Biochem Rev **31**(2): 31-38.
- Yagi, T., Takeichi, M. (2000). " Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity." Gen and develop **14**: 1169-1180.
- Yasui, Y., Kim, M. et al (2009). "Colorectal carcinogenesis and suppression of tumor development by inhibition of enzymes and molecular targets." B. Sci Publ **5**: 1-26.
- Young, P., Huy, L. et al (2005). "Dietary fibre and colorectal cancer: a model for environment--gene interactions." Mol Nutr Food Res **49**(6): 571-584.
- Zhao, C., Giusti, M. et al (2004). "Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth." J Agric Food Chem **52**(20): 6122-6128.