

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y
MEDICINA
PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN
CIENCIAS AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

**“Efecto quimiopreventivo de los fructanos de *Agave salmiana*
Otto ex Salm-Dick sobre el cáncer de colon”**

PRESENTA:

Antonio Dávila Céspedes

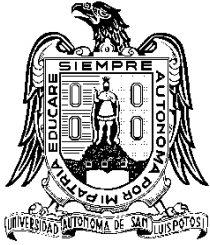
DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Bertha Irene Juárez Flores

ASESORES:

Dr. Cuauhtémoc Oros Ovalle

Dr. Juan Manuel Pinos Rodríguez



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y
MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN
CIENCIAS AMBIENTALES

**“Efecto quimiopreventivo de los fructanos de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick sobre el
cáncer de colon”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

Q.F.B ANTONIO DÁVILA CÉSPEDES

COMITÉ TUTELAR

DIRECTORA: DRA. BERTHA IRENE JUÁREZ FLORES

ASESOR: DR. CUAUHTÉMOC OROS OVALLE

ASESOR: DR. JUAN MANUEL PINOS RODRÍGUEZ

SINODALES: TRES EN EL CASO DE MAESTRÍA

PRESIDENTE: Dra. Bertha Irene Juárez

SECRETARIO: Dr. Cuauhtémoc Oros Ovalle

VOCAL: Dra. Érika García Chávez

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

PROYECTO REALIZADO EN:

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE ZONAS DESÉRTICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ**

CON FINANCIAMIENTO DE:

Fondo de Apoyo a la Investigación UASLP

Fundación Produce San Luis AC

A TRAVÉS DEL PROYECTO DENOMINADO:

Métodos de extracción, caracterización y usos de fructanos de *Agave salmiana* en
San Luis Potosí

**AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA EL OTORGAMIENTO
DE LA BECA-TESIS**

CVU: 368310

**ASÍ COMO POR EL OTORGAMIENTO DE LA BECA MIXTA PARA REALIZAR LA ESTANCIA
DE INVESTIGACIÓN EN**

Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Alemania

**LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO ATRAVÉS
DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD (PNPC)**

AGRADECIMIENTOS

Sin duda, la familia representa el origen de las características esenciales de todo ser humano. Es por ello que agradezco su apoyo invaluable, ya que ha representado la plataforma para poder consolidar este y todos los proyectos que he tenido el privilegio de desarrollar a lo largo de mi vida. De mi padre heredé la fascinación por la naturaleza y es gracias a su ejemplo que podido conducir mi vida de la mejor manera posible. Papá, cada día procuro hacerte sentir orgulloso a través de mis logros, recuerda que son tuyos también. Gracias Antonio, Irma, Irmis y Miguel por conformar mi núcleo familiar, único en su tipo, por cierto.

Muchas gracias a Sara, sin duda este camino no hubiese sido el mismo sin tu presencia. Es interesante como te encargas de materializar mis sueños, haces que las cosas sucedan. Muchas gracias por tu amistad, tu amor y por demostrarme que todo, todo es posible. Muchas gracias por ayudarme a creer en mí, por alimentar mi voluntad con tu ejemplo y tu guía. Por enseñarme con tu carácter cómo enfrentar la vida, por ayudarme a comprender lo que es posible conseguir si nunca dejamos de luchar. A ti te debo muchas de las más grandiosas experiencias de mi vida.

Gracias a mi hermanita Rosy. Sin tu apoyo, tu amistad y tus consejos creo que no habría llegado tan lejos. Gracias por todo.

Agradezco a todo esos seres que a lo largo de mi vida han ejercido una influencia muy importante a través de lecciones académicas y lecciones de vida: mis profesores. Especialmente a la Doctora Bertha Juárez por creer siempre en mí y por apoyarme a lo largo de esta Maestría en cada paso que di.

Gracias a mis amigas, por convertirse en personas fundamentales en mi vida. Por dejar cada una su huella en mí, por compartir los momentos de alegría y por tener siempre una sonrisa y una palabra de aliento para mí. Gracias a Betty Villaseñor, Olga Solís, Priscila Lara y Paula Macías. Muchas gracias, amigas, espero que nuestros caminos continúen encontrando puntos de convergencia sin importar nuestros destinos.

Agradezco a todo el personal del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas por el gran sentido de compañerismo que es fundamental para que todos los estudiantes logremos nuestros objetivos.

Mención especial merecen las personas que me apoyaron durante la estancia en Alemania, y aunque probablemente nunca lean estas líneas, es mi manera de perpetuar el agradecimiento que siento hacia ellos así como de difundir su calidad moral y científica. Ellos son el Doctor Robert Wyn Owen, el sabio Gerd Würtele, Roswitha Haubner, Nina Habermann y Eva Frei. Gracias a ellos por apoyarme en todo momento y transmitirme sus conocimientos. Conocí otras personas que me brindaron su amistad y de quienes aprendí muchas cosas. Es difícil de creer cómo existen seres con quienes convives durante un periodo de tiempo muy corto, y pueden aportar tantas cosas buenas a tu vida. Ellos son Roberto Souza y Carlos dos Santos, *garotones* brasileiros, y Brigitta Lengyel, mi *flatmate* de Hungría. Muchas gracias a ustedes por ayudarme a construir momentos muy divertidos y llenar mis días de alegría en Alemania.

Muchas gracias a Alemania, esa bendita patria llena de historia, de tradiciones. En tus tierras consolidé mi carácter, gracias por regalarme cada día fue un reto diferente. Aprendí a quererte y respetarte, a sentirme orgulloso y honrado por pisar tu suelo. Sé que volveré a caminar por tus senderos, a admirar tus paisajes, a surcar tus cielos y respirar tu aire.

Gracias a los alemanes que ayudaron a construir este sueño, especialmente a Martina Kopp por traerme el polvo blanco *muy sospechoso* hasta México, a Janina Hanne por compartir su hogar conmigo, a Rebekka Ruby, Claudia Bara y Lena di Carlo por guiar mis pasos en el aprendizaje de nuevas lenguas.

Gracias a Itza Castro, mi fiel escudera, amiga, compañera y alma paralela. A Desiré Loyola también. Gracias a ambas por aportar su talento, su sentido de responsabilidad y su entrega para construir este proyecto.

Gracias al personal del área de patología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” encabezados por el Dr. Cuauhtémoc Oros, a las Químicas del área de histología Edith y Angélica, al Dr. Aldo por compartir sus conocimientos conmigo.

Gracias a todos los que contribuyeron a que este sueño sucediera. Esperemos que sea sólo el principio de muchas cosas buenas para nuestro querido México. La labor sin duda es interminable, pero vale la pena el esfuerzo.

Gracias, gracias a todos.

Índice General

Índice General.....	I
Índice de Cuadros	II
Índice de Figuras	III
Resumen	18
1 Introducción.....	20
1.1 Sistema digestivo y cáncer de colon	22
1.2 Generalidades	22
1.2.1 Microscopía del colon.....	23
1.3 Mecanismo de carcinogénesis	24
1.4 Epidemiología del cáncer de colon	27
1.5 Relación entre el cáncer de colon y el estilo de vida	28
1.5.1 Abuso de bebidas alcohólicas	29
1.5.2 Alta ingesta de grasa	30
1.5.3 Consumo de alimentos con alto contenido proteico	30
1.5.4 Estrés.....	31
1.6 Prebióticos, probióticos y su relación con el cáncer de colon	32
1.7 El maguey mezcalero potosino	35
1.7.1 Generalidades	35
1.7.2 Condiciones edáficas, climáticas y topográficas ideales para el desarrollo <i>A. salmiana</i> 36	
1.7.3 Viabilidad de la explotación de <i>Agave salmiana</i>	37
2 Justificación.....	40
3 Objetivo	41
4 Hipótesis	41
5 Materiales y métodos	42
5.1 Obtención de fructanos de <i>A. salmiana</i>	42
5.2 Modelo animal y ración de alimento	43
5.2.1 Validación del modelo animal (etapa 1)	44
5.2.2 Inducción de la fase temprana del cáncer de colon (etapa 2)	44
5.3 Fructanos de achicoria	47
5.4 Azoximetano.....	47
5.5 Variables a medir.....	47
5.5.1 Unidades formadoras de colonias por gramo de peso húmedo de heces.....	47
5.5.2 pH de las heces.....	48
5.5.3 Focos de criptas aberrantes	48
6 Resultados	49
6.1 Rendimiento de fructanos	49
6.2 Modelo animal	50
6.2.1 Validación del modelo animal.....	50
6.2.2 Inducción de la fase temprana del cáncer de colon (fase 2).....	50
6.3 Unidades formadoras de colonias de lactobacilos por gramo de peso húmedo de heces y pH fecal.....	50
6.4 pH de las heces.....	52
6.5 Focos de criptas aberrantes.....	52
6.5.1 Comparación estructural	53
6.5.2 Análisis estadístico del efecto quimiopreventivo	55
7 Discusión	56
7.1 Lactobacilos presentes en heces de ratas	56
7.2 Evaluación de los valores de pH de las heces.....	57
7.3 Focos de criptas aberrantes.....	57
8 Conclusiones	60
9 Bibliografía	i

Índice de Cuadros

Cuadro 1.1 Destinos anatómicos de células metastásicas provenientes de cáncer primario (NCI, anónimo, 2011).....	21
Cuadro 1.2 Defunciones provocadas por los tipos más frecuentes de cáncer en nivel mundial. Cifras de la OMS (anónimo, 2008).	27
Cuadro 1.3 Porcentaje de fructanos en diversas especies vegetales (Kaur <i>et al.</i> , 2002).	35
Cuadro 5.1 Arreglo factorial en donde se muestran los niveles de los dos factores: estado de salud: y fuente de fructanos.	44
Cuadro 6.1 Cantidad de material obtenido en los 4 tallos de maguey y valor del peso seco de la fuente (n=4).	49
Cuadro 6.2 Logaritmo natural de UFC por gramo de peso húmedo de heces y pH de las heces después de 12 semanas de tratamiento con las distintas fuentes de fructanos. Los datos presentados corresponden al valor medio \pm desviación estándar (de) para n=6. Los valores con la misma literal en columna son estadísticamente iguales en el nivel de probabilidad de 0.05 (Tukey).	51
Cuadro 6.3 Cuadrados medios para UFC/g de heces y pH de heces en sanas ratas y enfermas alimentadas con fructanos de maguey, fructanos de achicoria y alimento convencional (n=36). *Significativo en los niveles de probabilidad de 0.05. **Significativo en los niveles de probabilidad 0.0001. G.L. = Grados de libertad. C.V. = Coeficiente de Variación.	51

Índice de Figuras

Figura 1-1 Colon humano o intestino grueso. Es la última estructura en procesar alimentos como material no digerido en el intestino delgado, absorber el agua de este y generar producto de desecho (Anónimo, 2012).	22
Figura 1-2 Cripta de Lieberkün en orientación longitudinal. Se muestran todos los tipos celulares que la integran (Habermann, 2010).	24
Figura 1-3 Desarrollo del cáncer colon. Se indican los genes o proteínas involucrados en las etapas de progresión de la enfermedad (Sancho <i>et al.</i> 2005).	27
Figura 1-4 <i>Agave salmiana</i> Otto ex Salm-Dick en el altiplano potosino-zacatecano.	35
Figura 1-5 Distribución de <i>A. salmiana</i> en el territorio potosino. Las condiciones óptimas para el desarrollo de esta planta ocurren en la región altiplano (Cuello y Aguirre, 2008).	37
Figura 1-6 Escapo floral o qurote de <i>A. salmiana</i> que indica el estado final de madurez de la planta. El tallo o qurote que alcanza de los 6 a los 10 metros de longitud.	38
Figura 1-7 <i>A. salmiana</i> con propágulos o hijuelos de menor tamaño a su alrededor.	39
Figura 5-1 Estructura de los fructanos de agave, propuesta por López y Urías (2007). Una característica de estas moléculas es que son ramificadas, a diferencia de la estructura lineal de los fructanos de achicoria.	43
Figura 5-2 Metabolismo del azoximetano (Sohn <i>et al.</i> , 2001). El nivel A) representa la molécula de azoximetano al ser administrada. En el nivel B) se muestra la reacción de hidroxilación que ocurre a nivel de epitelio hepático (metabolismo de primera fase), en este mismo nivel se propone que ocurre la conjugación con ácido glucurónico (metabolismo de segunda fase). En el nivel B') se presenta la reacción que ocurre tanto en epitelio hepático como en el lumen intestinal una vez que el fármaco ha alcanzado su destino anatómico con la finalidad de ser eliminado. En el nivel C) y C') se presentan las reacciones de reducción del metilazoximetanol y metilazoxiformaldehído que finalmente conducen al compuesto metilador de guanina D).	46
Figura 6-1 Comparación entre criptas colónicas de individuos tratados con AOM e individuos que no recibieron AOM. La imagen A) corresponde a un conjunto de criptas de una rata sana; la imagen B) corresponde a un foco de 5 criptas aberrantes de una rata enferma. La observación se realiza en microscopía de campo claro con tinción de hematoxilina eosina modalidad Harris a 40x.	53
Figura 6-2 Criptas de ratas sanas (A) y enfermas (B) que consumieron fructanos de maguey. Es posible apreciar las mismas características que en la figura 7-3 en cuanto a morfología y tamaño desigual en las criptas transformadas, pérdida de células de Goblet, desorganización nuclear y reducción del espacio peri criptico.	54
Figura 6-3 Criptas de ratas sanas (A) y enfermas (B) que consumieron fructanos de achicoria. La diferencia más notable es que las criptas de las ratas enfermas, presentan una mayor cantidad de células de Goblet con respecto de las ratas que no consumieron fructanos y las que consumieron fructanos de maguey. También es notable la uniformidad en el tamaño de las criptas entre sanas y enfermas, aunque la reducción del espacio peri criptico es un factor que prevalece en los 3 casos, así como las alteraciones del núcleo.	54
Figura 6-4 Focos de criptas aberrantes. Las ratas que no consumieron fructanos presentan una mayor cantidad de FCA que las ratas que sí los consumieron, tanto de maguey como de achicoria. Las ratas sanas no desarrollaron FCA. Los resultados corresponden al promedio de FCA en cada grupo de estudio (n=6) evaluados por la prueba de U Mann Whitney. *Significativamente diferente al tratamiento sin fructanos en el nivel de probabilidad de 0.05 **Significativamente diferente al tratamiento sin adición de fructanos y al tratamiento con fructanos de maguey en el nivel de probabilidad de 0.05.	55

Resumen

Introducción: el cáncer representa una de las principales causas de muerte en nivel mundial. Es una enfermedad que por su naturaleza compleja porque tiene un origen multifactorial (alimentación, el estilo de vida y factores hereditarios). El cáncer colorectal es una enfermedad que se ha relacionado en gran medida con los hábitos alimenticios, por lo tanto es un padecimiento fácilmente prevenible, pero a pesar de ello, sigue siendo causa de una gran cantidad de muertes a escala global. Se ha observado una alta incidencia de esta enfermedad en los países con alto grado de industrialización. Desde que se descubrió la relación de los hábitos alimenticios con este padecimiento, se ha documentado una gran cantidad de información respecto al efecto preventivo que algunos componentes de la dieta ejercen sobre éste. Entre los componentes evaluados se encuentran los polisacáridos de reserva tipo inulina, provenientes de diversos materiales vegetales como la raíz de achicoria (*Chicorium intybus*). En nuestro caso, utilizamos los fructanos de maguey (*Agave salmiana*), recurso natural renovable de amplia distribución en la región árida y semiárida de México. Los fructanos de maguey se relacionan simbióticamente con las bacterias intestinales, funcionando como sustrato de su actividad fermentativa. Los productos de la fermentación de estos carbohidratos producen importantes efectos positivos sobre la salud, como la reducción del riesgo de padecer algunas enfermedades como la obesidad, diabetes y por supuesto el cáncer de colon. **Objetivo:** Evaluar el efecto quimiopreventivo de los fructanos de maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick) sobre el desarrollo del cáncer de colon en un modelo animal y comparar este efecto con el de los fructanos provenientes de la raíz de achicoria (*Chicorium intybus*). **Metodología:** se indujo la etapa temprana del cáncer de colon en ratas utilizando azoximetano y se evaluó el efecto preventivo comparando la cantidad de focos de criptas aberrantes (FCA) en el colon de ratas que no consumieron fructanos con respecto de las que sí lo hicieron. Se comparó este efecto entre los fructanos de maguey y los de achicoria. **Resultados:** el consumo de fructanos de maguey y achicoria redujo significativamente la cantidad de FCA en las ratas. Las ratas que consumieron fructanos de achicoria mostraron menor cantidad de FCA que las que

consumieron fructanos de maguey. **Conclusiones:** los fructanos de *A. salmiana* actúan como prebióticos al estimular el desarrollo de bacterias fermentadoras y disminuir el pH en el ambiente colónico, además poseen efecto quimiopreventivo sobre el cáncer de colon al reducir la cantidad de biomarcadores tempranos de la enfermedad (Focos de Criptas Aberrantes). Los fructanos de *C. intybus* son más eficientes en términos de efecto prebiótico y reducción de riesgo de desarrollar cáncer de colon que los fructanos de *A. salmiana*.

1 Introducción

Con los cambios en los hábitos alimenticios, inducidos en gran medida por el ritmo de vida actual, se ha incrementado el consumo de grasas saturadas, grasas trans y sodio, así como también se ha favorecido en muchos casos, el uso y abuso de tabaco y alcohol, en modo paralelo al sedentarismo. Estudios llevados a cabo por el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en 2006, indican que el 70% de adultos mexicanos sufre obesidad aguda y para ese mismo año, se estimó que el 26.2% de la población infantil padecía esta enfermedad. El sobrepeso y la obesidad incrementan el riesgo de sufrir enfermedades cerebrovasculares, cardiovasculares, diabetes y algunos tipos de cáncer según el Instituto Nacional de Salud Pública (2010).

El cáncer o enfermedad neoplásica (neoplasia = nuevo crecimiento) es un proceso patológico que se puede considerar de etiología compleja, puesto que intervienen diversos factores para su desarrollo, entre los que se encuentran, los relacionados con los hábitos alimenticios, factores ambientales, estrés, y un importante componente genético. Las características principales de las células cancerosas son: señalización sostenida del proceso de replicación, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a apoptosis, resistencia a la senescencia replicativa, inducción de angiogénesis, capacidad de invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011). Una sola célula transformada que no sea detectada por el sistema inmunológico o que escape a los mecanismos de control del sistema de proliferación celular puede desarrollarse y multiplicarse hasta iniciar el proceso de carcinogénesis. Una vez establecida la enfermedad (fase conocida como cáncer primario), las células involucradas, como parte de su proceso de transformación, pierden la capacidad de adhesividad que las mantiene localizadas en su sitio anatómico original, manifestándose el proceso de metástasis (Vasse *et al.*, 2000), éste consiste en la migración de las células transformadas a diferentes regiones del organismo a través del sistema circulatorio y linfático. La fase metastásica del cáncer en muchas ocasiones conduce a la muerte de los pacientes que lo padecen ya que es una etapa de difícil tratamiento.

En el Cuadro 2.1 se presentan algunos de los tipos más comunes de cáncer primario y los sitios hacia los cuales regularmente se dispersa mediante el proceso de metástasis.

Cuadro 1.1 Destinos anatómicos de células metastásicas provenientes de cáncer primario (NCI, anónimo, 2011).

Cáncer primario	Sitios principales de metástasis
Mamario	Pulmones, hígado, huesos
Colónico	Hígado, peritoneo, pulmones
Renal	Pulmones, hígado
Pulmonar	Hígado, huesos
Epidérmico	Pulmones, músculo, hígado
Ovárico	Peritoneo, hígado, pulmones
Pancreático	Hígado, pulmones peritoneo
Prostático	Huesos, pulmones, hígado
Rectal	Hígado, pulmones, glándulas suprarrenales
Estomacal	Hígado, peritoneo, pulmones
Tiroideo	Pulmones, hígado, huesos
Uterino	Hígado, pulmones, peritoneo

El cáncer es una enfermedad que se puede desarrollar en cualquier sitio anatómico (Dugdale, 2010).

Es innegable que el incremento en la incidencia del cáncer está relacionado de manera directa con el progreso humano, puesto que en muchas ocasiones el cáncer se genera por exposición a contaminantes ambientales que provienen de diversos procesos industriales, sin los cuales, la humanidad no habría alcanzado el grado de desarrollo tecnológico del que goza en la actualidad, y a pesar de las innovaciones en las ciencias farmacéuticas y las inversiones destinadas a la investigación para la prevención y cura de esta enfermedad sigue cobrando una gran cantidad de vidas en cada país. De acuerdo a información de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer representa la primera causa de muerte en nivel mundial con 7,6 millones de defunciones en 2008, lo que representó para ese año, el 13% de las

defunciones totales en el mundo. Dos datos son de llamar la atención: se estima que el 30% de las defunciones provocadas por cáncer son prevenibles, y según las estadísticas analizadas, es posible extrapolar la información y predecir que en el año 2030, la cifra de defunciones provocadas por cáncer será de 11 millones en todo el mundo según la OMS (anónimo, 2008).

1.1 Sistema digestivo y cáncer de colon

1.2 Generalidades

Para una mejor comprensión del tema bajo estudio, es indispensable conocer tanto las funciones como el diseño macroscópico y microscópico del sitio anatómico bajo estudio, el colon. El tubo digestivo comienza desde la boca y termina en el esfínter anal externo. El último segmento del sistema es el intestino grueso, que está dividido en 3 zonas anatómicas principales: colon ascendente, colon transverso, colon descendente, recto y ano (Fig. 1-1).

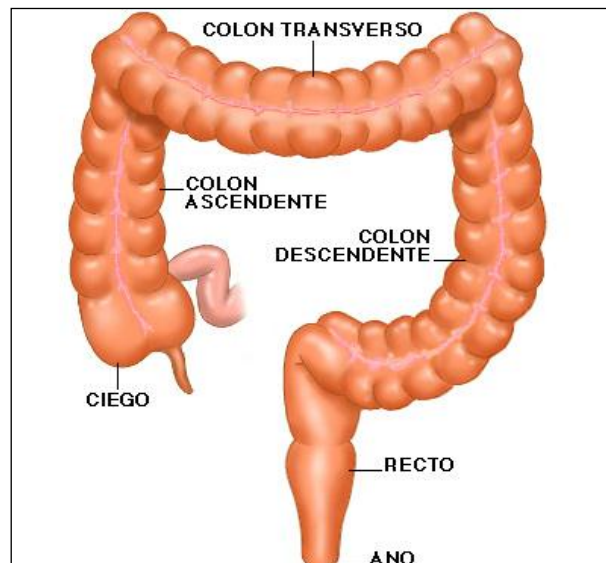


Figura 1-1 Colon humano o intestino grueso. Es la última estructura en procesar alimentos como material no digerido en el intestino delgado, absorber el agua de este y generar producto de desecho (Anónimo, 2012).

Una de sus funciones principales es la absorción de agua, sales y otros nutrientes que provienen del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon). En el colon es posible encontrar una gran diversidad de bacterias anaerobias que desempeñan actividades muy importantes como procesos fermentativos, biotransformación de diversas moléculas con múltiples actividades biológicas,

como la síntesis de antioxidantes, síntesis de complejos vitamínicos y aminoácidos esenciales, entre los cuales se encuentran algunas hormonas que funcionan como factores de crecimiento (Nason, 1999). Las bacterias presentes en el intestino también juegan un papel importante en la biotransformación de xenobióticos y los productos de esta transformación tienen efectos muy importantes a nivel orgánico (Nason, 1999).

1.2.1 Microscopía del colon

El colonocito es la unidad funcional del intestino. Estas células comprenden hasta un 90% de la superficie del lumen intestinal. Su función es conformar miles de invaginaciones llamadas criptas de Lieberkühn en la mucosa intestinal (Fig. 1-2). La función de las criptas es la de absorber nutrientes, así como también secretar algunas hormonas intestinales mediante células enteroendócrinas. Los tipos celulares restantes que integran las criptas intestinales son las células de Paneth, que producen algunas sustancias antimicrobianas como lisozima, las células caliciformes o células de Goblet, responsables de la producción de moco en gran cantidad que tiene como finalidad, evitar la absorción de moléculas de gran tamaño, permitiendo la absorción solamente de minerales y agua (Navarro *et al.*, 2009). En esta región se encuentran también células madre y células del sistema inmunológico (Habermann, 2010).

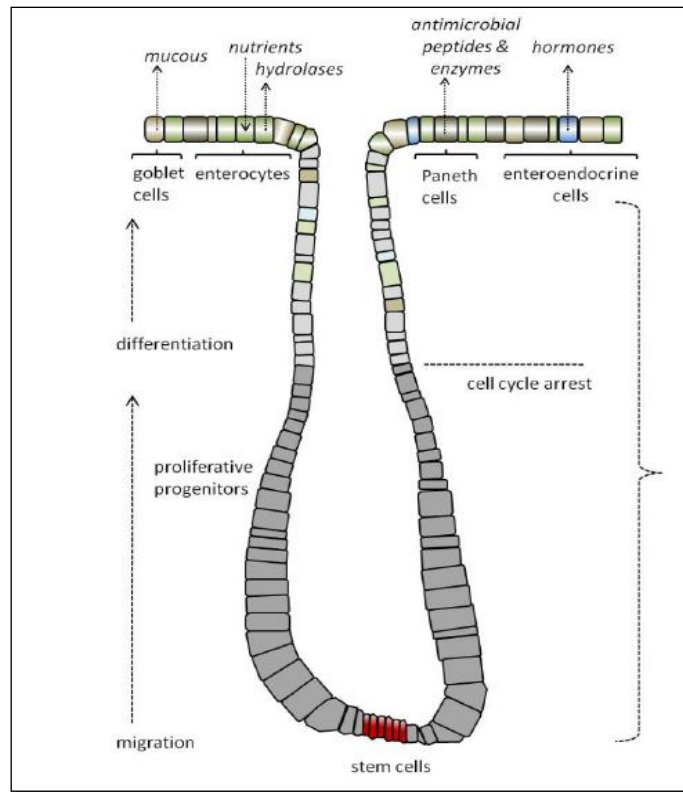


Figura 1-2 Cripta de Lieberkún en orientación longitudinal. Se muestran todos los tipos celulares que la integran (Habermann, 2010).

1.3 Mecanismo de carcinogénesis

Esencialmente el cáncer es un proceso de múltiples etapas que involucran acumulación de alteraciones en dos tipos de genes principalmente.

Oncogenes: participan en el crecimiento de las células normales pero su forma ha tenido una mutación (cambio). Los oncogenes pueden hacer crecer las células cancerosas. Las mutaciones de los genes que se convierten en oncogenes pueden ser heredadas o pueden resultar de la exposición a sustancias del ambiente que causan cáncer (NCI, anónimo, 2012).

Genes supresores de tumores: son pares de genes que hacen que la célula elabore una proteína que controla el crecimiento de las células. Se puede contraer cáncer cuando la proteína de los antioncógenos no funciona debido a mutaciones (cambios en el ADN) en los genes. Las mutaciones en los antioncógenos pueden heredarse o contraerse. También se llama antioncogén (NCI, anónimo, 2012).

La expresión génica es un proceso fundamental para el desarrollo de todos los organismos vivos en todos sus niveles de organización: tejidos, órganos y

sistemas. Y representa además un proceso cuya comprensión es indispensable para entender el origen y desarrollo del cáncer en todos los sitios anatómicos en donde se manifiesta. Las características que determinan estructura y función de cada sistema biológico ocurren en función de modificaciones a la estructura del ácido nucleico que lo conforme con las consecuencias correspondientes a estos fenómenos, principalmente en regiones promotoras de la replicación del material genético. Éstas son llamadas modificaciones genéticas y epigenéticas. Existen dos tipos de modificaciones epigenéticas, en el ADN y las que ocurren en las histonas (Park *et al.*, 2012). El ADN sufre metilaciones que se manifiestan regularmente en los residuos de citosina, actividad mediada por enzimas conocidas como metiltransferasas, y existen evidencias suficientes para sugerir que la finalidad de este proceso es la regulación del proceso de transcripción (Park *et al.*, 2012). Las histonas, moléculas de naturaleza proteica, poseen grupos amino N terminales en donde pueden sufrir diversas reacciones como metilación, acetilación, fosforilación, ribosilación y ubiquitinación (Park *et al.*, 2012). Se ha observado que la acetilación de las histonas en regiones cercanas a los sitios promotores de transcripción en ADN, modifica el grado de condensación de la cromatina facilitando la replicación del material genético durante el proceso de división celular (Park *et al.*, 2012). De acuerdo a las regiones en donde ocurran las modificaciones epigenéticas en las histonas y a la subunidad en que se lleven a cabo, se manifestará activación o silenciamiento de grupos genéticos particulares. Estos mecanismos surgen en respuesta a factores hormonales e interacciones ambientales principalmente, y tienen otras funciones importantes como la de conferir estabilidad o integridad al material genético (Park *et al.*, 2012). Las fallas en los mecanismos epigenéticos originan enfermedades tales como el cáncer y en muchas ocasiones, algunos compuestos tóxicos, inducen alteraciones en dichos mecanismos con las mismas consecuencias (Sharma *et al.* 2010).

En el contexto del genoma humano, existen genes cuya función está relacionada con los procesos de regulación de proliferación y control de los mecanismos de reparación de células dañadas, por lo cual funcionan como genes supresores de tumores y en muchos tipos de cáncer se ha encontrado que estas secuencias presentan un patrón de metilación alterado, fenómeno

conocido como hipermetilación y presentan actividad disminuida o nula; de manera concomitante se manifiesta el fenómeno a nivel de histonas de hipometilación o hipoacetilación, alterando el patrón de empaquetamiento del nucleosoma y dificultando la actividad de los factores de transcripción, contribuyendo de esta manera a la regulación negativa de diversos grupos genéticos entre los cuales se encuentran por supuesto los genes supresores de tumores (Clayton *et al.*, 2006).

Además de los fenómenos epigenéticos que originan cáncer, se encuentran alteraciones genéticas, denominadas mutaciones, es decir, cambios en la secuencia de los nucleótidos, cuyos productos serán defectuosos (RNA y proteínas aberrantes), originando células aberrantes. En ambos tipos de alteraciones se encuentran involucradas complejas vías de señalización intracelular (Sharma *et al.*, 2010).

El gen APC (Adenomatous poliposis coli por sus siglas en inglés) regula a través de la interacción de su producto proteico con la β -catenina la vía de señalización Wnt, responsable por el control de los procesos de apoptosis y control del ciclo celular. Este gen es susceptible de sufrir ambos tipos de transformaciones ya mencionadas, mutación o metilación en su región promotora (Guoren *et al.*, 2004). Estas alteraciones también interfieren en los procesos de adhesión celular, regulación de la actividad transcripcional, estabilidad cromosómica, migración, diferenciación y proliferación celular (Suehiro *et al.*, 2008).

Nos enfocaremos en las alteraciones producidas por hipermetilación del gen supresor de tumores APC. Éstas están asociadas a neoplasia intraepitelial en focos de criptas aberrantes y adenomas tempranos. Las modificaciones somáticas del gen APC están presentes en el 80 % de los adenomas o carcinomas colorectales y favorecen las mutaciones de G a A (Suehiro *et al.*, 2008). Son silenciados también otros genes relacionados con la regulación de la proliferación celular tales como K-ras, BRAF, p16 y p21, cabe señalar que también son proclives a sufrir mutaciones (Suehiro *et al.*, 2008). También se pierde la capacidad de producir O⁶-metilguanina-ADN-metiltransferasa, igualmente por silenciamiento del gen MGMT (metilguanina-ADN-metiltransferasa), ésta es una enzima destinada a la reparación de aductos inducidos por alteraciones genéticas y por metilaciones aberrantes de guanina

en el ADN (Suehiro *et al.*, 2008). La inducción de la etapa temprana de cáncer colorectal en este proyecto se basa en la metilación aleatoria de nucleótidos que compromete las regiones del ADN mencionadas, utilizando un fármaco nitrogenado citotóxico y organoespecífico de alta potencia denominado azoximetano (AOM). En la Figura 1-3 se muestra el proceso de carcinogénesis desde la transformación del epitelio normal hasta la etapa de metástasis

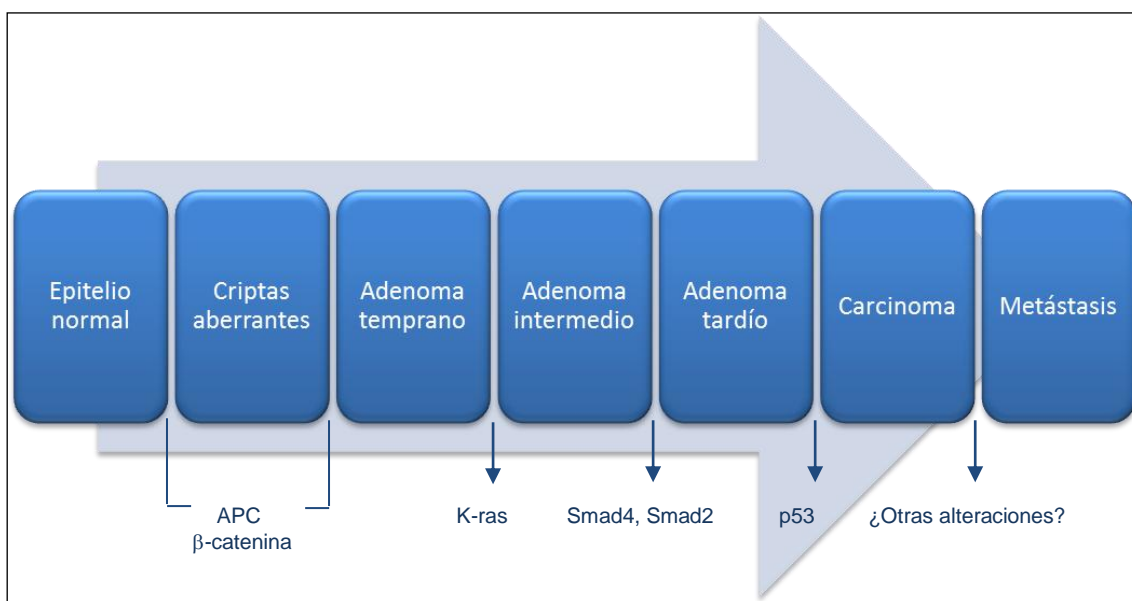


Figura 1-3 Desarrollo del cáncer colon. Se indican los genes o proteínas involucrados en las etapas de progresión de la enfermedad (Sancho *et al.* 2005).

1.4 Epidemiología del cáncer de colon

El cáncer colorectal es la cuarta enfermedad con mayor incidencia en nivel mundial dentro de las enfermedades neoplásicas. Se presentan datos de mortalidad en el cuadro 3.1.

Cuadro 1.2 Defunciones provocadas por los tipos más frecuentes de cáncer en nivel mundial. Cifras de la OMS (anónimo, 2008).

Tipo de cáncer	Defunciones en el año 2008
Pulmonar	1,4 millones
Gástrico	740 000
Hepático	700 000
Colorectal	610 000
Mamario	600 000

En el año 2009, el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) registró que en México, de 1998 a 2008, la tasa de mortalidad por cáncer se incrementó, pasando de 57.7 a 66.6 por cada 100 mil habitantes; entre las mujeres, el crecimiento fue de 59.6 a 66.7 por cada 100 mil habitantes, mientras que entre los hombres, de 55.6 a 66.5 cada 100 mil habitantes, con una incidencia de 3.1 % y 3.3 % de cáncer de colon para cada género. Como ya se mencionó, dicha patología es consecuencia, principalmente, de hábitos alimenticios inadecuados así como de factores hereditarios, ambientales y en muchas ocasiones el conjunto de estos tres factores. Desafortunadamente en sus primeras etapas no causa dolor, sino hasta en etapas muy avanzadas, en las cuales es ya muy difícil conseguir éxito en el tratamiento debido a la invasividad y a la metástasis. De acuerdo a diversas fuentes, el cáncer colorectal figura entre la segunda y la tercera causa de muerte en países altamente industrializados como Estados Unidos y algunos países europeos. Diversos estudios señalan que se registra una mayor incidencia de esta enfermedad en pacientes mayores de 60 años, así como en poblaciones urbanas respecto a poblaciones rurales. No se han encontrado diferencias significativas en cuanto a razas, pero sí en relación a los hábitos alimenticios de las distintas zonas geográficas. Existen evidencias de que ciertos elementos de la dieta en la entre las cuales se encuentran sustancias no digeribles protegen contra el desarrollo dicha enfermedad (Pool-Zobel *et al.*, 2002). La relación entre algunos hábitos cotidianos y el cáncer colorectal se plantea a continuación.

1.5 Relación entre el cáncer de colon y el estilo de vida

Se ha demostrado que existe una relación entre esta enfermedad y diversos factores relacionados con los hábitos alimenticios, como el abuso de alcohol, tabaquismo, la excesiva ingesta alimentos con alto contenido de compuestos nitrogenados como las proteínas y ácidos nucleicos, además de compuestos ricos en grasas. Por otro lado, se ha observado un decremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad colorectal cuando se incluyen en el régimen alimenticio altas concentraciones de antioxidantes, ácido fólico, vitaminas y fibra; también mediante tratamientos preventivos como la remoción quirúrgica

de pólipos intestinales cuando se detectan a tiempo y tratamiento de sustitución hormonal en la etapa postmenopáusica (Migliore *et al.*, 2011).

1.5.1 Abuso de bebidas alcohólicas

Pöschl *et al.* (2004), indican que el alcohol etílico en primera instancia actúa como disolvente de algunos compuestos carcinógenos, facilitando el ingreso de éstos a nuestro organismo por la vía oral, principalmente compuestos derivados de procesos de combustión, como los que se encuentran en el humo del tabaco. En segundo lugar, una vez absorbido y distribuido en el torrente sanguíneo, el alcohol etílico induce la actividad del citocromo P-4502E1 en el hígado, así el etanol es activado y oxidado hasta transformarse en acetaldehído, proceso en el cual, participa la enzima alcohol deshidrogenasa. El acetaldehído es un compuesto considerado procarcinógeno, posteriormente es degradado a otros compuestos que tienen la capacidad de formar aductos de ADN alterando genes como el metil guanina metil transferasa (MGMT) responsable de la expresión de la enzima O-metil-guaniltransferasa que desempeña la función de corregir metilaciones aberrantes de ADN. La alquilación del ADN en las células no es una actividad inusual, y en ocasiones, ocurren fenómenos aberrantes durante este proceso, por lo que en nuestro organismo existen este y otros tipos de mecanismos de reparación celular. La enzima alcohol deshidrogenasa, responsable de metabolizar el alcohol y que se expresa de manera importante en el epitelio colónico, también tiene la capacidad de transformar algunos otros procarcinógenos hasta carcinógenos activos, en los cuales están comprendidas especies reactivas de oxígeno con la capacidad de dañar el material genético por estrés oxidativo.

Estos son los mecanismos mediante los cuales el abuso y la cronicidad en cuanto a la ingesta de alcohol incrementan la probabilidad de sufrir daños a nivel de la mucosa intestinal. También se ha encontrado una correlación significativa entre la alta ingesta de alcohol y el decremento de las concentraciones séricas de ácido fólico, compuesto cuya ingesta se ha relacionado con la disminución de riesgo de padecer enfermedad colorectal al estimular diversos mecanismos de reparación del ADN (Migliore *et al.*, 2011).

1.5.2 Alta ingesta de grasa

Singh *et al.* (1997), indican que el consumo inmoderado de grasa provoca alteraciones en nivel de la microflora intestinal al reducir las poblaciones de bacterias fermentadoras, además de que para ser digeridas, se requiere la secreción de ácidos biliares. Los ácidos biliares son conjugados con aminoácidos como glicina y taurina por los hepatocitos para incrementar su solubilidad en la bilis y disminuir su toxicidad. Una vez que han cumplido su función como emulsificantes de grasas, son reabsorbidos hasta en un 95% en la circulación entero-hepática y se estima que un 5% logra depositarse en el colon, donde son transformados por actividad enzimática de bacterias que habitan en este órgano. Los productos finales son ácidos biliares potencialmente tumorgénicos como el ácido litocólico y el ácido desoxicólico (Degirolamo *et al.*, 2011). Se ha demostrado también que el consumo excesivo de grasas está relacionado con una elevada producción de prostaglandinas (ácido araquidónico 20:4 precursor de prostaglandinas) y por lo tanto, promoción de la respuesta inflamatoria del colon, elemento que favorece el daño tisular. También se ha encontrado que las grasas estimulan la producción de algunas enzimas como las proteincinasas, importantes promotoras tumorales en este órgano. La inclusión en el régimen alimenticio de ácidos grasos omega 6 mono o poliinsaturados de manera inmoderada, se relaciona con la enfermedad colorectal debido a que este tipo de moléculas son susceptibles a ser oxidadas por especies reactivas de oxígeno, produciendo por este mecanismo compuestos como el 4-hidroxinonenal, molécula que posee alta capacidad para formar aductos de ADN (Owen *et al.*, 2000).

1.5.3 Consumo de alimentos con alto contenido proteico

Las proteínas de origen animal contienen una cantidad notable de los aminoácidos arginina, lisina y ornitina. Estas moléculas al ser degradadas por enzimas tales como la ornitina descarboxilasa, segregada a nivel de mucosa colónica, producen poliaminas como la putrescina. Las poliaminas tienen la función en nuestro organismo de promover la proliferación celular. Asimismo, la degradación de proteínas además de poliaminas genera otros compuestos con propiedades tóxicas para la mucosa del colon (Pierre *et al.*, 2004). Se ha

comprobado que el grupo hemo que conforma proteínas tales como la hemoglobina y la mioglobina, al ser degradados en el intestino, producen moléculas como compuestos fenólicos y óxidos de nitrógeno que producen estrés oxidativo en este sitio anatómico (Pierre *et al.*, 2004). Es por ello que se enfatiza la relación entre carne roja (por la alta cantidad de mioglobina) y alteraciones intestinales, aunque también se han demostrado efectos nocivos por la ingesta de carne blanca erróneamente considerada inocua según la creencia popular. Incluso se menciona en el mismo estudio, el efecto nocivo en nivel de colon por la alta ingesta de proteínas de fuentes vegetales como la soya. Asimismo, la carne representa una fuente importante de hierro, que tanto en su forma Fe^{+2} , como Fe^{+3} participa como catalizador en una serie de reacciones químicas conocidas como Química de Fenton, en donde se transforman sustancias con potencial oxidativo provenientes de la matriz fecal a especies aun más reactivas (Owen *et al.*, 2000). En suma, los factores anteriormente descritos son: Daño a la mucosa intestinal (transformación celular en nivel de ADN), pérdida de control en los mecanismos de reparación del ADN y finalmente, estimulación de la proliferación celular, dan como resultado el comienzo del proceso neoplásico con la culminación en cáncer colorectal.

1.5.4 Estrés

El ritmo de vida de la actualidad implica situaciones de estrés. El fenómeno de colon irritable se produce como consecuencia a este estado psicológico. Consiste en un proceso inflamatorio y doloroso mediado por proteínas inflamatorias como las ciclooxigenasas (COX) (Migliore *et al.*, 2011). Las ciclooxigenasas se han relacionado con fenómenos de hipermetilación del ADN, por lo cual, son consideradas como un factor predisponente para desarrollar la enfermedad colorectal (Migliore *et al.*, 2011). Es por ello que los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) han mostrado un efecto preventivo y regresivo en las etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad.

1.6 Prebióticos, probióticos y su relación con el cáncer de colon

Los mamíferos sólo pueden absorber carbohidratos simples como glucosa, galactosa y ramnosa, entre otros, pero pueden hidrolizar ciertos disacáridos (sacarosa, lactosa y maltosa) hasta transformarlos en monosacáridos. También pueden degradar el almidón hasta glucosa, pero su capacidad para hidrolizar otros polisacáridos está limitada (Reddy, 1999). Por ello, una gran cantidad de carbohidratos indigeribles (celulosa, xilanos, pectinas y fructanos con enlace $[\beta 2 \rightarrow 1]$ glucosídico) presentes en los alimentos, pasan por el tracto gastrointestinal sin ser absorbidos por el sistema digestivo. Además, provocan un aumento del volumen intestinal (específicamente los de tipo pectina y celulosa, considerados como fibra insoluble) diluyendo algunos compuestos tóxicos, entre los que se encuentran algunos carcinógenos, acortan el tiempo de tránsito de materia fecal en el colon y como resultado disminuyen el crecimiento de bacterias perjudiciales y disminuyen el periodo de contacto entre los carcinógenos mencionados y el epitelio intestinal (Verghese *et al.*, 2002). Algunos tipos de fibra alimentaria como los fructanos (fibra soluble), están presentes en algunos alimentos consumidos cotidianamente o que pueden ser incluidos en el régimen alimenticio de manera muy sencilla como lentejas, ajo, cebolla, espárragos, etc. La flora bacteriana del tracto gastrointestinal contribuye al metabolismo de estos carbohidratos, ya que tienen la capacidad de degradarlos hasta azúcares simples y otros productos de fermentación (Verghese *et al.*, 2002).

La degradación bacteriana de la fibra alimentaria en el colon, estimula el crecimiento de bacterias benéficas para el organismo, principalmente las de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, e inhiben el crecimiento de bacterias patógenas del género *Escherichia*, *Clostridium*, *Listeria*, *Shigella*, *Salmonella*, entre otros, además, generan ácidos grasos de cadena corta como ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico (Reddy, 1999). Estos ácidos, principalmente el butírico y propiónico, tienen un efecto benéfico sobre las criptas colónicas y ejercen una actividad antiproliferativa de células neoplásicas, con lo que contribuyen a la disminución de riesgo de padecer cáncer de colon (Perrin *et al.*, 2000). El mecanismo específico mediante el cual el ácido butírico previene la proliferación de células cancerosas es fundamental

en el papel de los beneficios de la incorporación de fibra en el régimen alimenticio y se mencionará posteriormente. Hemos señalado el papel de los fenómenos epigenéticos en el desarrollo del cáncer en nivel de regiones promotoras del ADN, así como de sus histonas. A dicha interacción entre las histonas y el ADN se le denomina nucleosoma. Particularmente en el caso de las acetil desacetilasas de histonas, su actividad es determinante en el grado de interacción que manifiestan con el material genético. Minucci *et al.* (2006), mencionan que existen sustancias de origen natural y sintético que tienen la capacidad de actuar como inhibidores de estas enzimas y el mecanismo propuesto consiste en que los inhibidores se unen al sitio activo de éstas desactivándolas. Entre estas sustancias se incluye al ácido butírico. Scharlau *et al.* (2009), describen el papel de este ácido orgánico proveniente de la fermentación bacteriana de las fibras ingeridas en el mecanismo de inhibición de esta especie enzimática. Se menciona también que las células modificadas manifiestan una tendencia hacia la acumulación de acetil desacetilasas de histonas, como respuesta a metilaciones aberrantes de citosina y guanina en las islas CpG que integran junto con la región CAT del gen APC la región promotora de éste. Las histonas al desacetilarse adquieren carácter catiónico e interaccionan con los grupos fosfato del ADN al presentarse como aniones. Esta interacción es la que promueve un empaquetamiento más estrecho del nucleosoma y dificulta la actividad de los factores de transcripción. Entonces, la actividad de los inhibidores de acetil transferasas permite una relajación en el empaquetamiento en el nucleosoma y facilita la regulación positiva del proceso de transcripción. Muchos mecanismos involucrados en la actividad de los inhibidores de las desacetilasas se encuentran aún bajo investigación, pero en este artículo se menciona que los efectos principales observados son la inhibición de la proliferación e inducción de la apoptosis, fenómeno fundamental para el recambio celular y la eliminación de células defectuosas que tiene como resultado la inhibición del proceso de carcinogénesis (Hughes y Rowland, 2001). Lo más interesante es que estas sustancias muestran afinidad o actúan específicamente sobre células transformadas por razones aún bajo investigación. Las sustancias de origen natural que actúan como inhibidores de desacetilasas son productos de metabolismo bacteriano como depsispéptido, apicidina, tricostatina A y el butirato de sodio. Otros genes involucrados son

los que codifican a proteínas como p53, Sp1 y Sp3, entre otras proteínas estructurales como tubulina y citoqueratina (Migliore *et al.*, 2011).

De acuerdo con los aspectos descritos, podemos resumir que los probióticos son productos alimentarios que contienen células vivas que participan en la fermentación de fibra alimentaria o metabolitos que ejercen acciones benéficas para nuestro organismo, tales como la estimulación de las células del sistema inmunológico presentes en la mucosa intestinal, imitando así el desarrollo de organismos patógenos. Por su parte, los prebióticos son la mencionada fibra alimentaria, es decir, alimentos no digeribles que estimulan el crecimiento o actividad de uno o varios tipos específicos de bacterias (Bertkova *et al.*, 2010).

Dentro de estas sustancias se encuentran los fructanos, polímeros de fructosa. Y ya que el sistema digestivo humano no posee enzimas capaces de hidrolizar este tipo de polisacáridos, por lo cual son considerados prebióticos. Solo aproximadamente el 15% de plantas superiores los almacenan como sustancia de reserva (Hendry *et al.*, 1993). En el cuadro 3.2 se presenta el porcentaje de fructanos en diversas especies vegetales. Actualmente, a escala industrial se extraen principalmente de la raíz de achicoria (*C. intybus*) y se utilizan ampliamente como ingredientes de alimentos funcionales como prebiótico. Existen evidencias que indican que el consumo de fructanos, aislados de la raíz de achicoria, así como la fermentación de fibra alimentaria en el colon, pueden contribuir prevenir el síndrome metabólico asociado con la obesidad (Delzenne *et al.*, 2002; Cani *et al.*, 2005). También, se ha demostrado que el consumo de fructooligosacáridos contribuye a mejorar la glucemia y esteatosis en animales obesos (Daubioul *et al.*, 2000; Daubioul *et al.*, 2002), además de provocar una disminución en el consumo de alimento (Cani *et al.*, 2005).

Mancilla-Margalli y López (2006), demostraron que las distintas variedades de *Agave* contienen cantidades importantes de fructanos, aunque su estructura puede variar dependiendo la especie. Sin embargo, se conoce poco acerca de sus aplicaciones.

Cuadro 1.3 Porcentaje de fructanos en diversas especies vegetales (Kaur *et al.*, 2002).

Fuente	Porcentaje de fructooligosacáridos
Ajo	15-20
Raíz de espárrago	10-15
Salsifí	15-20
Alcachofa de Jerusalén	15-20
Tubérculos de dalia	15-20
Raíz de achicoria	15-20

1.7 El maguey mezcalero potosino

1.7.1 Generalidades

Las especies del género *Agave* contienen grandes cantidades de fructanos, por lo que se decidió dirigir esta investigación hacia la explotación sustentable de este organismo tan abundante en la región altiplano del estado de San Luis Potosí: *A. salmiana*, el maguey mezcalero potosino (Fig. 1-4).



Figura 1-4 *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick en el altiplano potosino-zacatecano.

El maguey se ha utilizado como fuente de agua, carbohidratos, fibra, materiales de construcción, forraje y principalmente como materia prima para la elaboración de mezcal, que es un aguardiente obtenido de la fermentación de

los monosacáridos simples (obtenidos previa hidrólisis de polisacáridos de reserva) contenidos en el tallo de la planta.

El maguey fue aprovechado y muy apreciado desde que la humanidad subsistía a partir de las actividades de caza-recolección y se cree que el interés en este organismo ocurrió gracias a su morfología tan llamativa y peculiar, ya que poseen un tallo muy alto que los llevaba a sobresalir de la vegetación predominante propia del matorral desértico. Además se propone que dichos pobladores observaron el aprovechamiento de estos organismos por parte de insectos nectaríferos. Posteriormente se implementarían las diversas formas de aprovechamiento y producción de los derivados que hasta la actualidad se comercializan. Los antiguos pobladores del país le llamaban *teometl* o maguey de los dioses a las diferentes especies de agave que se aprovechaban, entre las que se encontraba *A. salmiana*. Las características del maguey lo han llevado a ser una especie muy apreciada y por lo tanto se ha propagado con intervención humana a otras regiones de nuestro país; se ha llegado a cultivar en estados como Guerrero y Oaxaca, lugar en donde la producción de mezcales es una actividad muy importante. La relación con entidades divinas se debe a que producía sensaciones agradables el consumir su savia fermentada. Algunos de las formas de aprovechamiento de la savia de maguey son también el pulque (Iztac = blanco, octli = bebida fermentada); aguamiel (menecutli = miel) que es la savia recolectada del tallo del maguey preparado para ello, sin fermentar; el mequite (quiotl = tallo de planta) o tallo se mastica y se bebe el jugo, previa cocción. Existen evidencias de que ha sido utilizado desde hace 10 000 años, de acuerdo a hallazgos de restos vegetales efectuados en la localidad de Guilá Naquitz en el estado mexicano de Puebla.

1.7.2 Condiciones edáficas, climáticas y topográficas ideales para el desarrollo *A. salmiana*

Crece preferentemente a un altitud de 1000 a 2250 msn; climas semi seco a seco, con temperaturas oscilantes entre los 16 y 22°C, aunque tiene tolerancia a temperaturas bajo cero y hasta 35°C; intervalos de precipitación pluvial de 320 a 720 mm anuales. Aunque se ha demostrado que esta especie puede proliferar en condiciones distintas, bajo estrés de diversos tipos y por lo tanto,

puede prosperar en cualquier clima seco y semiseco del territorio potosino, sobre todo en suelos ígneos (Figura 1-5).

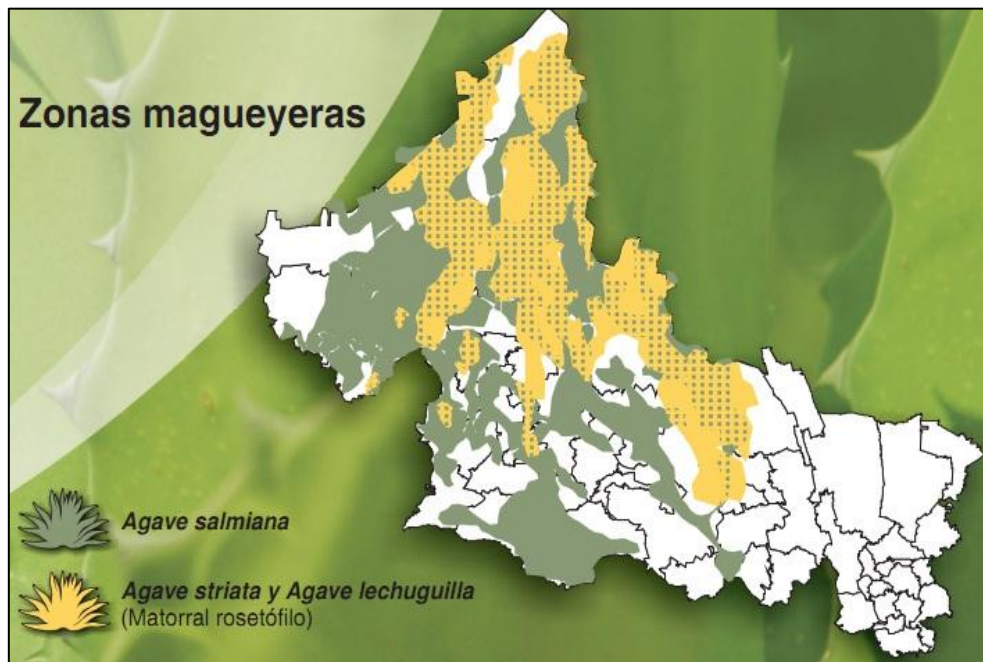


Figura 1-5 Distribución de *A. salmiana* en el territorio potosino. Las condiciones óptimas para el desarrollo de esta planta ocurren en la región altiplano (Cuello y Aguirre, 2008).

1.7.3 Viabilidad de la explotación de *Agave salmiana*

Dentro de las distintas especies del género *Agave* es posible encontrar monocárpicas y policárpicas. *A. salmiana* es una especie monocárpica, es decir, cuando alcanza su estado de madurez, fenece (Fig. 1-6). La característica de ser una planta monocárpica sustenta su explotación con la finalidad de evitar que este valioso material vegetal, con todos los beneficios que proporciona se desaproveche, además su alta capacidad reproductiva nos lleva a deducir que no existe amenaza de extinción o agotamiento para la especie, siempre y cuando se procure aplicar un manejo adecuado del recurso, permitiendo su desarrollo y procurando su integridad.



Figura 1-6 Escapo floral o quiote de *A. salmiana* que indica el estado final de madurez de la planta. El tallo o quiote alcanza de los 6 a los 10 metros de longitud.

Otro factor que lleva a considerar que la explotación del recurso es viable, es que cada planta tiene la capacidad de proliferar de manera autónoma por medio de rizomas y de esta manera, se genera un gran número de hijuelos (Fig. 1-7), que incluso al recolectar la planta madre se liberan de competencia por nutrientes y pueden desarrollarse de manera más eficiente y en mayor cantidad, alcanzando hasta 50 individuos por cada planta progenitora en regiones que reúnen las condiciones ideales de desarrollo.



Figura 1-7 *A. salmiana* con propágulos o hijuelos de menor tamaño a su alrededor.

Existen investigaciones que proponen que estos organismos tienen la posibilidad de conseguir densidades de población de alrededor de 4000 plantas por hectárea (en condiciones óptimas de suelo y clima) de las cuales, son aprovechables entre el 5 y 15%. Aunque tales cifras pueden tardar de 5 a 7 años en presentarse, ya que éste es el periodo de tiempo en que cada individuo emite sus hijuelos por reproducción vegetativa.

De este modo podemos afirmar que existe un gran potencial de explotación en esta planta, ya que la síntesis de fructanos puede superar de forma importante a la de otras especies en términos de rendimiento en peso seco.

Referencia sección 1.7:

Aguirre R., J. R.; Charcas, H; Flores, J. L. El Maguey Mezcalero Potosino; Universidad Autónoma de San Luis Potosí y Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología: San Luis Potosí S. L. P., México. 2001. 87 P.

2 Justificación

Este proyecto de tesis ha sido generado en el marco de un proyecto con enfoque multidisciplinario que busca aprovechar las propiedades de un material vegetal muy abundante en nuestro país y de esta manera contribuir al fortalecimiento del eje socio-económico de la sustentabilidad a escala local o regional en el altiplano potosino-zacatecano. Mediante este trabajo se busca contribuir a este objetivo y además realizar un aporte a la investigación sobre la prevención del cáncer colorectal, que representa una de las principales causas de muerte en el mundo y manifiesta una incidencia creciente tanto en países industrializados como en países que se encuentran cerca de alcanzar altos niveles de industrialización, como México. La prevención de enfermedades es un tema que cada vez toma mayor relevancia en todos los países, puesto que se ha observado que pese a las investigaciones encaminadas específicamente al tratamiento de cáncer, las cifras de mortalidad se mantienen constantes. Particularmente el cáncer de colon se ha considerado como una de las enfermedades más fácilmente prevenibles, al estar relacionada directamente con los hábitos alimenticios. Debido a esto, el consumo de los alimentos funcionales se ha incrementado desde épocas recientes, al demostrarse mediante diversas investigaciones, los beneficios que se pueden lograr a través de su consumo. Es por ello que este proyecto de tesis busca colocar a los fructanos de maguey como un actor importante en las estrategias de prevención de esta enfermedad.

3 Objetivo

Evaluar el efecto quimiopreventivo de los fructanos de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick en el desarrollo del cáncer de colon inducido en un modelo animal y comparar este efecto con el de los fructanos provenientes de la raíz de achicoria (*Chicorium intybus*).

4 Hipótesis

Los fructanos tipo inulina, provenientes de la raíz de achicoria poseen efecto quimiopreventivo sobre el desarrollo del cáncer de colon en animales de experimentación, por lo tanto, los fructanos provenientes de *A. salmiana* al ser moléculas de naturaleza química similar, comparten esta característica.

5 Materiales y métodos

5.1 Obtención de fructanos de *A. salmiana*.

Los tallos de plantas quiotillas de *A. salmiana*, fueron recolectados en parajes ejidales del municipio de Charcas, S. L. P., de donde se abastece la fábrica de mezcal Laguna Seca. Los fructanos de *A. salmiana* se extrajeron según López *et al.* (2003) en las instalaciones del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Se recolectaron magueyes en el estado fenológico de máxima concentración de fructanos, que ocurre en la etapa previa a la emisión del escapo floral (quiotillo) (Aguirre *et al.*, 2003). El órgano de interés fue el tallo de la planta. Una vez obtenido el tallo del maguey se cortó en secciones adecuadas para la obtención del jugo en un extractor mecánico. Es recomendable realizar el procedimiento de extracción el mismo día en que el tallo es recolectado para evitar la disminución de la concentración de fructanos debida al proceso de respiración celular. Para esto, el tallo se separó del resto de la piña, se lavó y cortó en trozos, posteriormente se pasaron por un extractor industrial. A este jugo se le adicionó una mezcla de alcohol-agua (80-20%) y se ajustó el pH a 7 con hidróxido de sodio 1N. Esta mezcla se colocó en un baño con agitación constante durante una hora a 55⁰C. Se realizó una extracción orgánica con cloroformo en un embudo de separación, dejándolos en contacto por 24 h, esto con el fin de eliminar grasas y saponinas. Pasado este periodo, se observó la separación de las fases. Se recolectó la fase acuosa, y con ayuda de alcohol absoluto se precipitaron los polisacáridos. Este precipitado blanquecino, se secó a 55⁰C en un horno de aire forzado hasta obtener un material pulverizable. Los fructanos obtenidos fueron sometidos al análisis Fehling modalidad volumétrica para calcular la concentración de carbohidratos reductores. La estructura de los fructanos de Maguey se presenta en la figura 5-1.

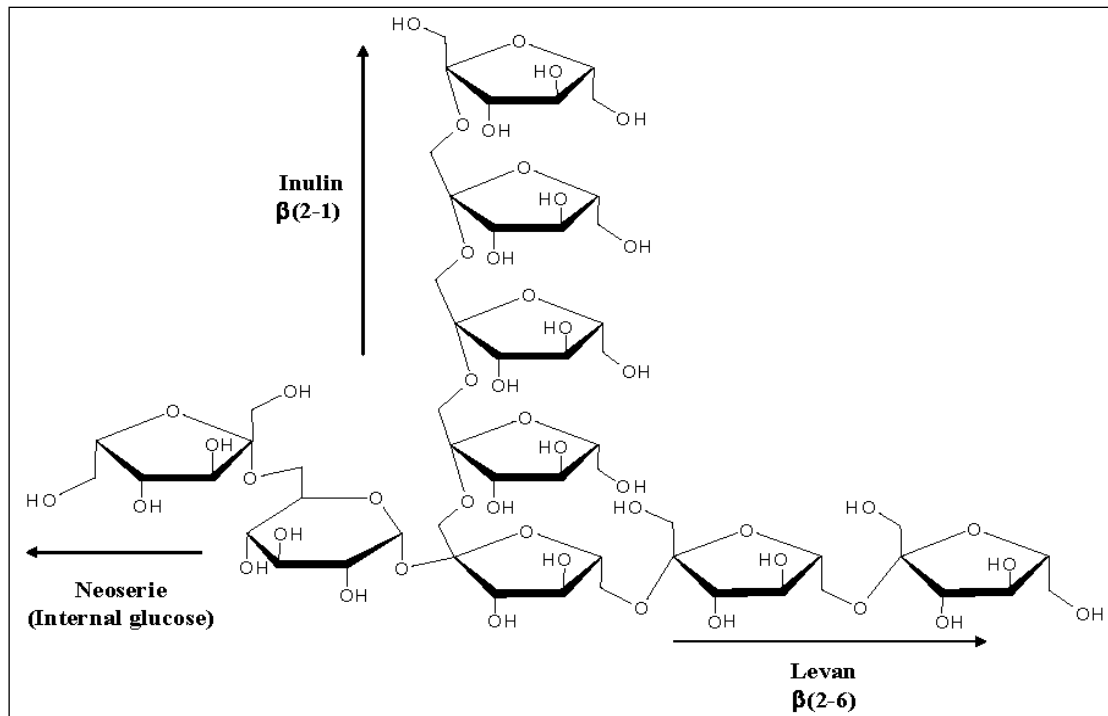


Figura 5-1 Estructura de los fructanos de agave, propuesta por López y Urías (2007). Una característica de estas moléculas es que son ramificadas, a diferencia de la estructura lineal de los fructanos de achicoria.

5.2 Modelo animal y ración de alimento

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar con un peso entre 140 y 160 g, adquiridas del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Cada animal constituyó una unidad experimental, se mantuvieron en cajas de acrílico individuales en una habitación con condiciones de temperatura y humedad controladas y con un ciclo de luz oscuridad invertido de 12/12. Los animales se sometieron a un periodo de adaptación durante 5 días antes de comenzar el experimento con una ración de 15 g de alimento estándar para roedores (Rodent Laboratory Chow 5001, Agribands Purina, México) y agua *ad libitum*. Los animales se mantuvieron de acuerdo con las recomendaciones éticas de la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

5.2.1 Validación del modelo animal (etapa 1)

El proyecto constó de dos etapas. La primera de ellas, sirvió para establecer las condiciones óptimas para el montaje del modelo animal. Posteriormente al periodo de adaptación, a un grupo de 4 ratas se les administró una dosis de 15 mg/kg de peso corporal de azoximetano vía intraperitoneal. Después de ocho semanas de la administración del fármaco, los animales se sacrificaron y se les extrajo el intestino grueso. Cada órgano fue preservado en una solución de formaldehído al 10% de acuerdo a los procedimientos de preservación de tejidos y órganos utilizados en patología clínica. Con base en los resultados obtenidos, se propuso la etapa siguiente del experimento.

5.2.2 Inducción de la fase temprana del cáncer de colon (etapa 2)

En un diseño completamente al azar, 36 ratas hembra de la cepa *Wistar* fueron distribuidas aleatoriamente en 6 tratamientos con arreglo factorial 2x3 (estado de salud: ratas sanas, ratas enfermas; fuente de fructanos: sin fructanos, fructanos de maguey, fructanos de achicoria) (Cuadro 6.1). Las ratas tratadas con azoximetano (AOM) recibieron vía intraperitoneal dos administraciones con una semana de intervalo de 15 mg/kg de peso corporal del fármaco diluido en solución salina fisiológica al 0,9% (Reddy, 1999). Se utilizó alimento convencional para roedores pulverizado, en mezcla con el tipo de fructano correspondiente a una proporción de 10% en materia seca. Esta proporción es considerada óptima para obtener el efecto preventivo en este tipo de experimentos (Reddy, 1999). Los animales que no recibieron fructanos, consumieron alimento convencional.

Cuadro 5.1 Arreglo factorial en donde se muestran los niveles de los dos factores: estado de salud: y fuente de fructanos.

Factores	Sin fructanos	Fructanos de maguey	Fructanos de achicoria
Ratas enfermas	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
Ratas sanas	<i>R4</i>	<i>R5</i>	<i>R6</i>

5.2.2.1 Mecanismo de acción del azoximetano

Los focos de criptas aberrantes (FCA) son lesiones que originan adenomas y carcinomas de colon (Reddy, 1999). Para inducir los FCA, se utilizó el compuesto carcinogénico azoximetano (AOM), sustancia más usada para el estudio de los efectos de la dieta sobre cáncer de colon (Verghese *et al.*, 2002). El AOM sufre varias oxidaciones al ser metabolizado por los mamíferos, y su producto final, es un inductor de metilación aberrante de guanina que genera aductos de ADN con la consecuente alteración del gen APC hasta nivel de replicación, transcripción y traducción (Piñols *et al.*, 2011). El azoximetano al ser absorbido sufre la hidroxilación en una reacción metabólica de primera fase por parte de la isoforma CYP2E1 del citocromo P450, formando el compuesto denominado metilazoximetanol, que es depositado en el colon por vía biliar y una vez ahí sufre nuevas transformaciones, comenzando con la actividad alcohol deshidrogenasa que lo transforma en metilazoxiformaldehído. Esta enzima presenta alta actividad en este sitio anatómico y le confiere al azoximetano el carácter de ser un fármaco órgano específico (Piñols *et al.*, 2011). Se ha propuesto de manera alternativa que una vez transformado el fármaco a metilazoximetanol, puede sufrir una reacción metabólica de segunda fase al conjugarse con ácido glucurónico, eliminándose por vía biliar y finalmente depositándose este complejo en el lumen intestinal, proceso facilitado por la enzima bacteriana β -glucuronidasa (Hughes y Rowland, 2001), posteriormente se genera un compuesto con la capacidad de generar aductos en el ADN mediante la metilación aberrante de guanina como primer paso. En ambas rutas, el compuesto final metilador de guanina se denomina metil diazonio (Sohn *et al.*, 2001). Es importante señalar que la ruta de activación del azoximetano y otros carcinógenos tiene lugar en el hígado y comparten puntos en común con el metabolismo del alcohol, además como se ha mencionado anteriormente, el grupo funcional $-OH$ (alcohol) es un inductor de la actividad de la isoforma CYP2E1. Sohn *et al.* (2001), describen la reacción y presentan los intermediarios derivados del metabolismo del azoximetano (Fig. 5-2). La metilación del ADN es conocido como silenciamiento por metilación aberrante, ocasionando como uno de los primeros resultados, alteración en el gen MGMT (metil-guanina-metil-transferasa). Dicha modificación altera

subsecuentemente a otros genes que llevan a la generación de proteínas defectuosas como p16 y p53 que estimulan la proliferación de células transformadas y facilitan el escape al sistema de apoptosis o muerte celular programada, generándose así, focos de criptas colónicas aberrantes (Montenegro *et al.*, 2003). Se ha encontrado una correlación entre la presencia de los FCA y los carcinomas colorectales de 100%, esto significa que los focos de criptas aberrantes son considerados como un biomarcador confiable de cáncer colorectal y por lo tanto, una herramienta útil para la detección temprana de esta enfermedad (León *et al.*, 2007).

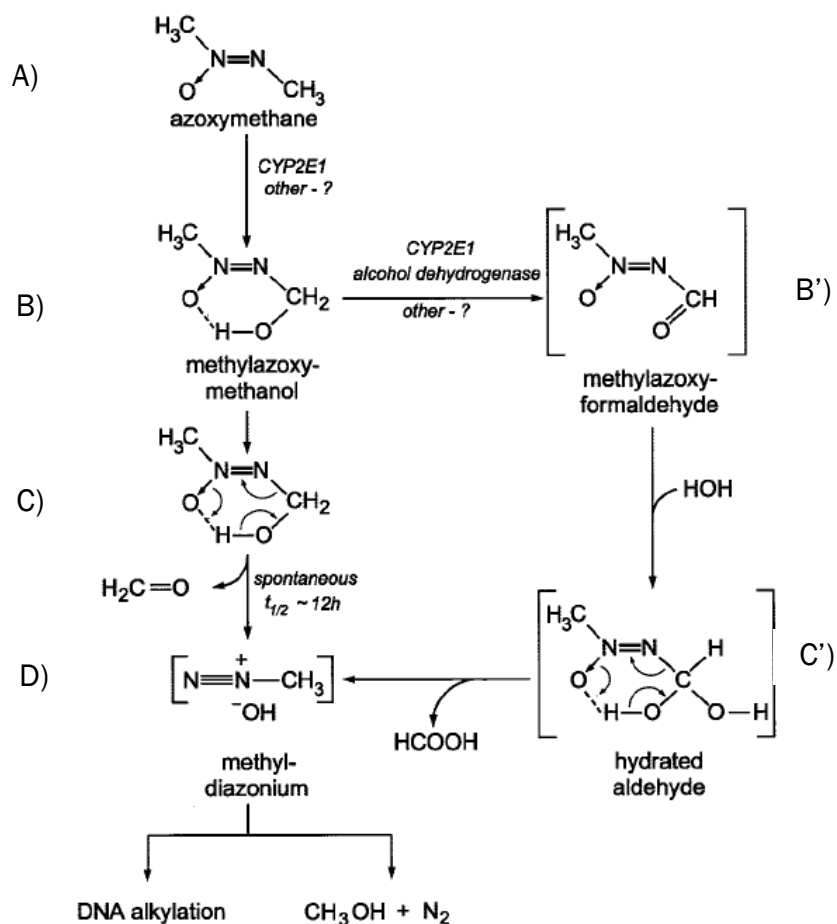


Figura 5-2 Metabolismo del azoximetano (Sohn *et al.*, 2001). El nivel A) representa la molécula de azoximetano al ser administrada. En el nivel B) se muestra la reacción de hidroxilación que ocurre a nivel de epitelio hepático (metabolismo de primera fase), en este mismo nivel se propone que ocurre la conjugación con ácido glucurónico (metabolismo de segunda fase). En el nivel B') se presenta la reacción que ocurre tanto en epitelio hepático como en el lumen intestinal una vez que el fármaco ha alcanzado su destino anatómico con la finalidad de ser eliminado. En el nivel C) y C') se presentan las reacciones de reducción del metilazoximetanol y metilazoxiformaldehído que finalmente conducen al compuesto metilador de guanina D).

5.3 Fructanos de achicoria

Los fructanos de achicoria fueron adquiridos del proveedor Pharmeo en Hildeburghausen, Tübingen, Alemania.

5.4 Azoximetano

Se importaron dos viales con 100 mg del fármaco cacinógeno azoximetano (AOM) 13.4 M (Sigma Aldrich en San Louis Missouri, EUA).

5.5 Variables a medir

5.5.1 Unidades formadoras de colonias por gramo de peso húmedo de heces

Para la cuantificación de las bacterias, se empleó la técnica de Miles-Misra-Irwin utilizando agar Mann Rogosa Sharpe (MRS), recomendado por el fabricante para el aislamiento de bacterias del género *Lactobacillus*. Se realizan 9 diluciones (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 y 1:9) de 1 g de heces frescas de rata en solución de caseína al 1% previamente esterilizada en autoclave a 120°C durante 15 minutos y 15 libras por pulgada cuadrada de presión. Se seleccionan entre las diluciones 1:3, 1:4 y 1:5 la que mejor resolución permitiera al momento de contar las colonias. Éstas fueron sembradas en cajas de Petri que contenían 50 mL de agar MRS previamente ajustado a pH 5,5 a 5,7 para incrementar su selectividad. Las cajas de Petri utilizadas estaban divididas en 3 compartimentos. En cada uno de ellos se sembraron 20 µL de cada dilución de trabajo por triplicado, es decir, en cada sección se encontraban 3 repeticiones de cada una de las diluciones para efectos de verificar la precisión de la prueba. A continuación, las cajas se confinaron en jarras de anaerobiosis para simular el microambiente libre de oxígeno del colon, indispensable para el desarrollo y actividad fermentadora de este tipo de bacterias. La prueba se realizó en todos los ejemplares (sanos y enfermos, n=36) en la semana número 12 a partir de la segunda administración de AOM previa a la semana en que se sacrificaron las ratas. Para el análisis de datos, se empleó un Análisis de Varianza con arreglo factorial $2 \times 3 = 6$ tratamientos.

5.5.2 pH de las heces

Se midió el valor de pH de una suspensión al 10% (p/v) de las heces de cada individuo utilizando un potenciómetro Hanna Instruments (EUA) con electrodo de vidrio. Para el análisis de datos se empleó un Análisis de Varianza con un arreglo factorial $2 \times 3 = 6$ tratamientos.

5.5.3 Focos de criptas aberrantes

Tras 13 semanas a partir de la segunda administración de azoximetano para la inducción del proceso neoplásico, se extirpó el colon y se realizó una incisión en orientación longitudinal en cada órgano, se fragmentó en secciones transversales de 1 cm de longitud con geometría rectangular. Cada una de las secciones fue sometida a procedimiento de deshidratación durante 24 horas en una solución de Xileno. Al término de este procedimiento, las muestras se incluyeron en bloques de parafina y realizaron los cortes histológicos de $3 \mu\text{m}$ de espesor en micrótomo. El análisis histológico se realizó en el Laboratorio de Patología del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto". Las 18 ratas enfermas y 3 ratas sanas (una de cada grupo) fueron analizadas por patólogos expertos en el área de patología gastrointestinal, sin conocimiento del tipo de alimento que consumieron las ratas. En estos cortes se cuantificaron las estructuras que funcionan como marcador biológico del proceso de inducción de cáncer empleando microscopía de campo claro, siguiendo el protocolo de tinción hematoxilina-eosina modalidad Harris. Para conferir validez estadística a las diferencias detectadas entre la cantidad de focos de criptas aberrantes en las ratas de acuerdo a la fuente de fructanos se aplicó la prueba no paramétrica de U Mann Whitney para muestras independientes, con valor de $P=0.05$.

6 Resultados

Debido a que el efecto quimiopreventivo esperado se lleva a cabo directamente por la actividad fermentativa bacteriana, se seleccionaron dos variables a medir en las ratas vivas con la finalidad de apreciar el efecto prebiótico de los fructanos. La primera de estas variables fue la cuantificación de UFC de lactobacilos/ gramo de heces frescas. Se esperaba encontrar diferencias entre los valores de esta variable en las ratas que consumieron fructanos y las que no lo hicieron, así como entre las sanas y las enfermas. La segunda variable se deriva de la primera, ya que se esperaba que el valor de pH de las heces disminuyera en las ratas que consumieron fructanos con respecto de las que no los consumieron. Finalmente la tercera variable, que indicó la magnitud del efecto quimiopreventivo de los fructanos de maguey, fue el recuento de focos de criptas aberrantes en el colon de las ratas.

6.1 Rendimiento de fructanos

En el Cuadro 6.1 se muestra la cantidad de material pulverizable obtenido del jugo de maguey que contiene fructanos en mezcla con impurezas, entre las cuales, posiblemente se encuentren minerales del suelo, fructooligosacáridos y carbohidratos estructurales como celulosa y hemicelulosa, que suponemos afectan negativamente el efecto prebiótico de los fructanos de maguey. Con respecto a la prueba volumétrica de Fehling no se detectaron carbohidratos reductores en el material obtenido.

Cuadro 6.1 Cantidad de material obtenido en los 4 tallos de maguey y valor del peso seco de la fuente (n=4).

Tallo	Peso seco del tallo (kg)	Material que contiene fructanos (kg)
1	3.18	1,09
2	1.43	0,52
3	3.65	1,03
4	1.92	0,48

6.2 Modelo animal

6.2.1 Validación del modelo animal

El parámetro utilizado para decidir si el modelo animal muestra los signos previos al cáncer de colon fue la presencia de FCA. En el caso de las 4 ratas utilizadas en esta etapa, no se encontraron alteraciones significativas en la morfología celular, simplemente despoblación de células caliciformes en algunos casos. Este fenómeno representa la etapa más temprana del proceso neoplásico precede la aparición de los focos de criptas aberrantes (Pierre *et al.*, 2004).

6.2.2 Inducción de la fase temprana del cáncer de colon (fase 2)

Debido a que en la etapa anterior no se obtuvieron los resultados esperados se procedió como se ha indicado en la sección 5.2.2. Después del análisis histológico se observaron evidencias suficientes que indican que la inducción de la etapa preneoplásica (FCA) en el colon de las ratas a las que se les suministró AOM se logró exitosamente.

6.3 Unidades formadoras de colonias de lactobacilos por gramo de peso húmedo de heces y pH fecal

Los resultados de UFC/g de heces y pH para los seis tratamientos se presentan en el cuadro 6.2. Los valores de UFC/ g de heces no se distribuyen normalmente (Prueba de Shapiro-Wilk: $Wt_{(\alpha=0.05, n=36)} = 0.93 > Wc = 0.72$), por lo que se realizó la transformación de datos a Ln con la finalidad de realizar el análisis de varianza. Los resultados de ANADEVa se presentan en el cuadro 6.3.

Cuadro 6.2 Logaritmo natural de UFC por gramo de peso húmedo de heces y pH de las heces después de 12 semanas de tratamiento con las distintas fuentes de fructanos. Los datos presentados corresponden al valor medio \pm desviación estándar (de) para n=6.

Estado de salud	Fuente de fructanos	Ln (UFC/g de heces) \pm de	pH de las heces \pm de
Enfermas	Sin fructanos	13.2 \pm 11.4	8.27 \pm 0.92
	Fructanos de maguey	13.6 \pm 11.2	5.95 \pm 0.61
	Fructanos de achicoria	16.4 \pm 15.5	5.78 \pm 0.59
Sanas	Sin fructanos	13.7 \pm 11.3	8.10 \pm 1.01
	Fructanos de maguey	14.0 \pm 11.7	6.60 \pm 0.92
	Fructanos de achicoria	16.6 \pm 13.8	6.27 \pm 0.68

Cuadro 6.3 Cuadrados medios para UFC/g de heces y pH de heces en sanas ratas y enfermas alimentadas con fructanos de maguey, fructanos de achicoria y alimento convencional (n=36). *Significativo en los niveles de probabilidad de 0.05. **Significativo en los niveles de probabilidad 0.0001. G.L. = Grados de libertad. C.V. = Coeficiente de Variación.

	GL	Lactobacilos/g de heces	pH
Fuente de fructanos	2	33.4**	0.0590**
Estado de salud	1	1.42**	0.00630
Estado de salud X Fuente de fructanos	2	0.0685	0.00280
Error	30	0.30	0.0026
C.V. (%)	NA	1.20	6.20

Los tratamientos aplicados influyen significativamente en el valor de UFC/g de heces ($P < 0.0001$). Tanto la fuente de fructanos como el estado de salud afectan a la variable ($P < 0.0001$ y $P < 0.0001$). No existe interacción entre los factores fuente de fructanos y estado de salud ($P = 0.1245$). Se empleó la prueba LSMEANS con la opción PDIF para comparar los 6 tratamientos. El análisis permite corroborar que las ratas sanas presentan una mayor cantidad de bacterias que las ratas enfermas; las ratas que consumieron fructanos de maguey muestran un incremento significativo en la cantidad de bacterias con

respecto de las que no consumieron fructanos, pero las ratas que consumieron fructanos de achicoria presentan una mayor cantidad de bacterias que las que consumieron fructanos de maguey así como que las que no consumieron fructanos. Esta información no es válida para los individuos enfermos que consumieron fructanos de maguey, ya que la cantidad de bacterias cuantificadas en las heces no es significativamente diferente a la de las ratas sanas que no consumieron fructanos ($P=0.3531$).

6.4 pH de las heces

El pH de las heces se ve influenciado significativamente por los tratamientos aplicados ($P<0.0001$). El valor de la variable está en función de la fuente de fructanos ($P<0.0001$) y no del estado de salud ($P=0.1727$). No existe interacción entre los factores ($P=0.3752$). Se empleó la prueba LSMEANS con la opción PDIFF para comparar los 6 tratamientos. El análisis indica que el valor de pH entre las ratas que consumieron fructanos de maguey y achicoria es estadísticamente igual ($P=0.7245$), y disminuye significativamente ($P<0.0001$) con respecto a las ratas que no consumieron fructanos.

6.5 Focos de criptas aberrantes

En la figura 6-1 se muestran las características microscópicas de las criptas de ratas sanas y enfermas que no consumieron fructanos. Se indican las estructuras a comparar mediante las literales a_n y b_n .

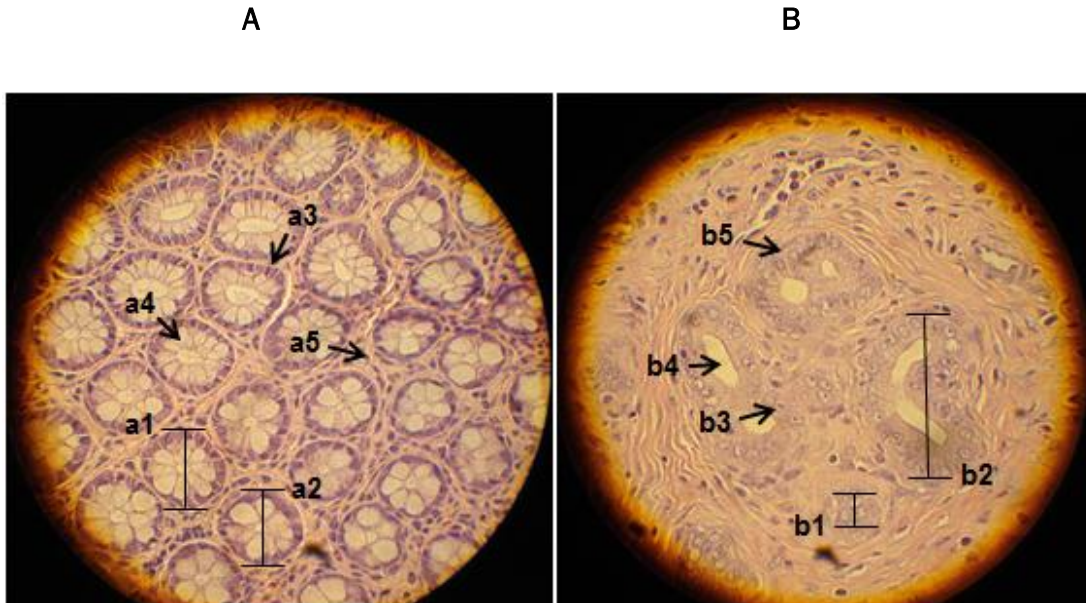


Figura 6-1 Comparación entre criptas colónicas de individuos tratados con AOM e individuos que no recibieron AOM. La imagen A) corresponde a un conjunto de criptas de una rata sana; la imagen B) corresponde a un foco de 5 criptas aberrantes de una rata enferma. La observación se realiza en microscopía de campo claro con tinción de hematoxilina eosina modalidad Harris a 40x.

6.5.1 Comparación estructural

Las criptas sanas presentan contorno regular y tamaño semejante (a1, a2) a diferencia de las criptas aberrantes (b1, b2); los núcleos de las criptas sanas son organizados y apenas perceptibles como regiones más oscuras (a3), en las criptas aberrantes se aprecia nucleomegalia en los colonocitos ubicados en el contorno de la cripta con desorganización nuclear (b3); en las criptas sanas se aprecian estructuras vacuolares abundantes correspondientes a células caliciformes (a4) a diferencia de las criptas aberrantes, que muestran despoblación de células caliciformes (b4); el espacio pericriptico en las ratas sanas se encuentra bien definido (a5) y en las ratas enfermas comienza a desaparecer al fusionarse las criptas (b5).

En la figura 6-2 se presentan las criptas de ratas sanas y enfermas que consumieron fructanos de maguey y en la figura 6-3 se presenta la comparación de criptas de ratas sanas y enfermas que consumieron fructanos de achicoria.

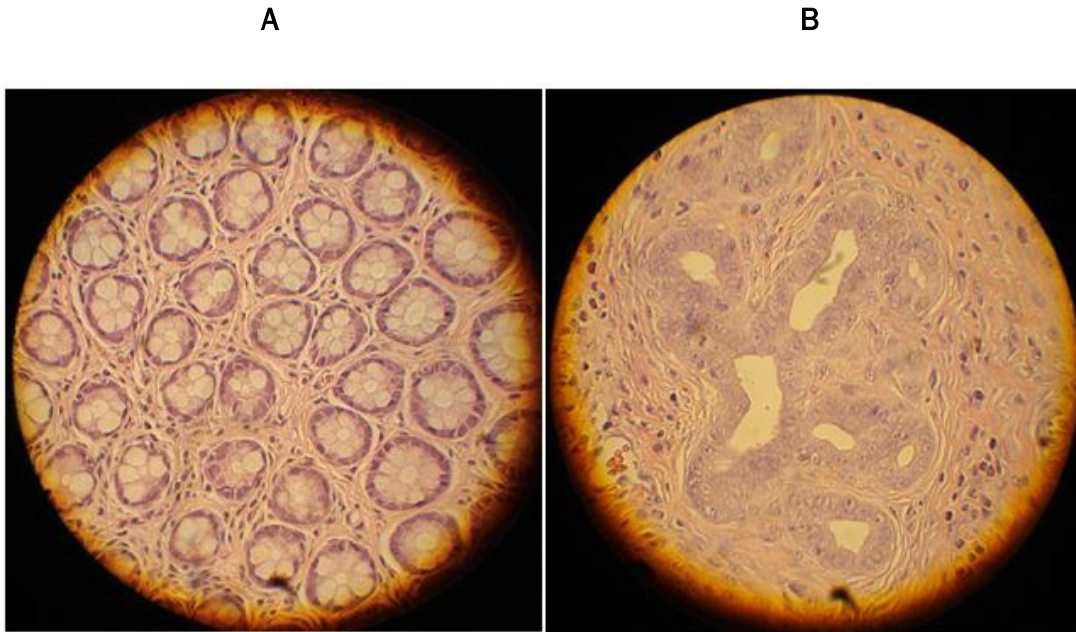


Figura 6-2 Criptas de ratas sanas (A) y enfermas (B) que consumieron fructanos de maguey. Es posible apreciar las mismas características que en la figura 7-3 en cuanto a morfología y tamaño desigual en las criptas transformadas, pérdida de células de Goblet, desorganización nuclear y reducción del espacio peri criptico.

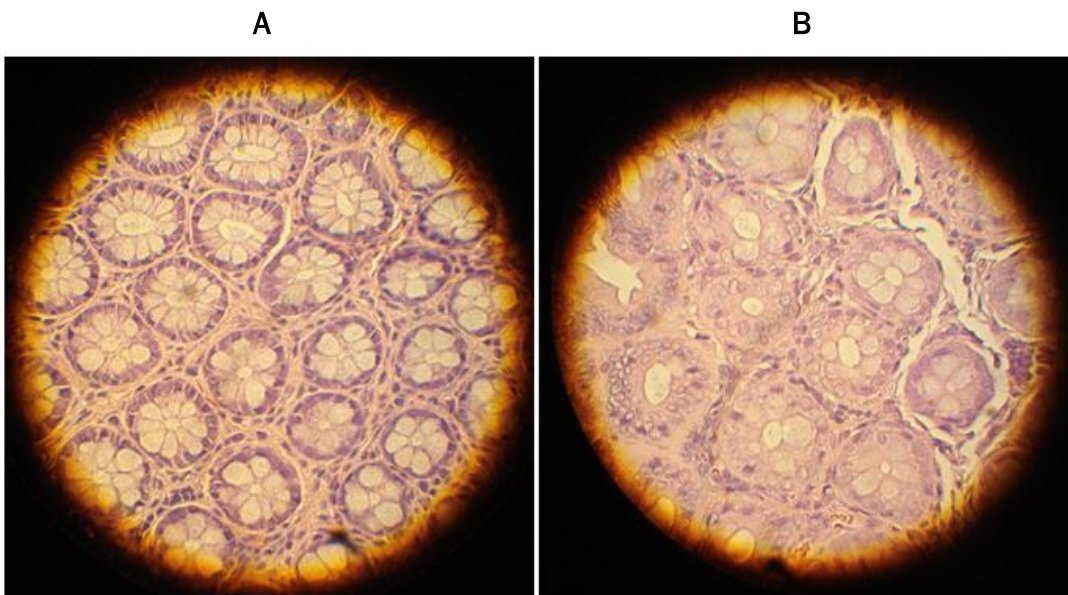


Figura 6-3 Criptas de ratas sanas (A) y enfermas (B) que consumieron fructanos de achicoria. La diferencia más notable es que las criptas de las ratas enfermas, presentan una mayor cantidad de células de Goblet con respecto de las ratas que no consumieron fructanos y las que consumieron fructanos de maguey. También es notable la uniformidad en el tamaño de las criptas entre sanas y enfermas, aunque la reducción del espacio peri criptico es un factor que prevalece en los 3 casos, así como las alteraciones del núcleo.

6.5.2 Análisis estadístico del efecto quimiopreventivo

El análisis estadístico indica que existen diferencias entre la cantidad de FCA en el colon de los individuos que consumieron fructanos de maguey y achicoria con respecto de los que no los consumieron (Fig. 6-4).

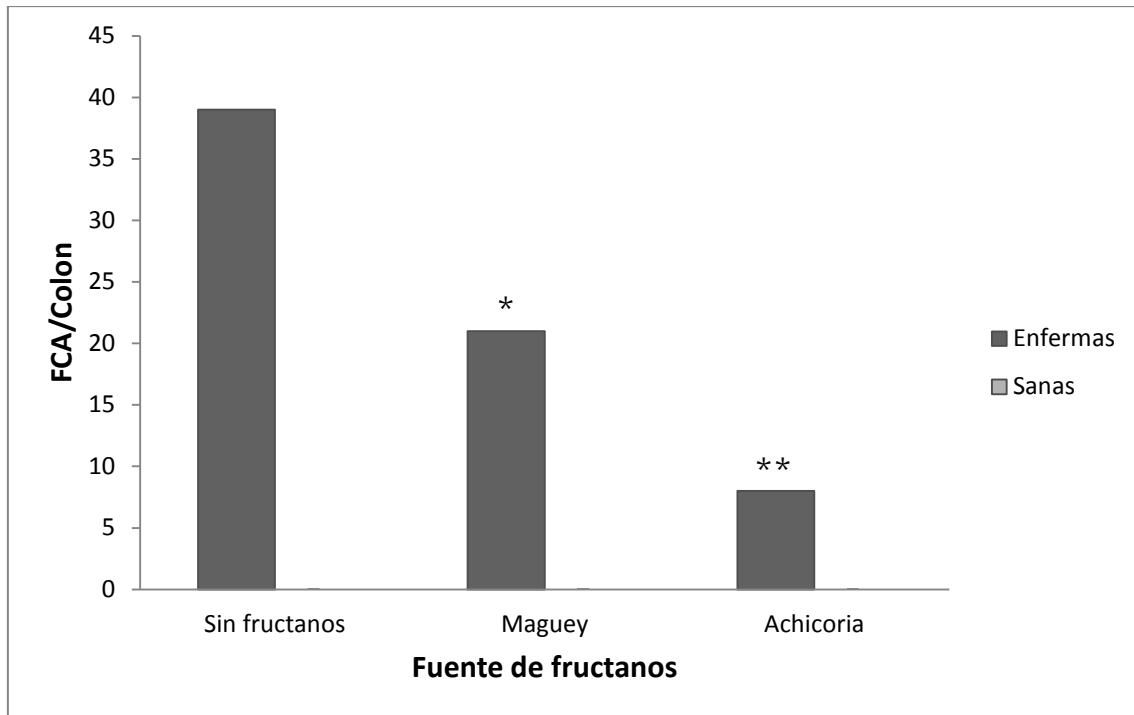


Figura 6-4 Focos de criptas aberrantes. Las ratas que no consumieron fructanos presentan una mayor cantidad de FCA que las ratas que sí los consumieron, tanto de maguey como de achicoria. Las ratas sanas no desarrollaron FCA. Los resultados corresponden al promedio de FCA en cada grupo de estudio (n=6) evaluados por la prueba de U Mann Whitney. *Significativamente diferente al tratamiento sin fructanos en el nivel de probabilidad de 0.05 **Significativamente diferente al tratamiento sin adición de fructanos y al tratamiento con fructanos de maguey en el nivel de probabilidad de 0.05.

7 Discusión

7.1 Lactobacilos presentes en heces de ratas

Con base en los resultados obtenidos, podemos afirmar que tanto la fuente de fructanos como el estado de salud tienen influencia significativa sobre la cantidad de lactobacilos en el modelo *in vivo* actuando como efectos aditivos.

Las ratas que consumieron fructanos de maguey presentaron una cantidad mayor de UFC de lactobacilos/g de heces que las ratas que no consumieron fructanos. Esta información coincide con la publicada por López y Urías (2007) al establecer que los fructanos de distintas especies del género *Agave* (*potatorum*, *angustifolia*) incrementan significativamente las poblaciones de lactobacilos en un modelo *in vitro*, aunque no concuerda con la misma publicación en la que demuestran que los fructanos de *C. intybus* son menos eficientes en términos de incremento de lactobacilos con respecto de los fructanos de maguey. Por otro lado, se encontró una cantidad mayor de lactobacilos en las heces de ratas que consumieron fructanos de achicoria que en las ratas que consumieron fructanos de maguey, y también que en las que no consumieron ningún tipo de fructano. Estos resultados coinciden con lo publicado por Rendón *et al.* (2011), en donde demostraron que los fructanos de *C. intybus* incrementan las poblaciones de lactobacilos *in vitro* en mayor medida que los fructanos de *A. angustifolis spp. tequilana*. Aunque difieren con lo publicado con este mismo autor (Rendón *et al.* 2012) cuando utilizó un modelo *in vivo* con fructanos de las mismas especies del género *Agave* para evaluar el efecto prebiótico, en donde manifiesta que los fructanos de achicoria son menos eficientes en términos de incremento de UFC/g de heces. Asimismo, nuestros resultados son contrarios a lo establecido por Castro *et al.* (2012). En ese proyecto utilizaron fructanos de *A. salmiana* (obtenidos por el mismo método de extracción empleado en nuestro proyecto para evaluar su capacidad de incrementar la cantidad de lactobacilos *in vitro* y resultaron ser más eficientes que los fructanos de *C.intybus*.

Se observó que las ratas sanas presentan una cantidad significativamente mayor de bacterias en las heces que las ratas enfermas. El valor de UFC de lactobacilos/g de heces en los individuos sanos que consumieron fructanos de maguey es estadísticamente igual a la de los individuos sanos que no los

consumieron, y se requiere realizar investigaciones más profundas para poder establecer la razón.

7.2 Evaluación de los valores de pH de las heces

No existe efecto de interacción entre el estado de salud y el tipo de alimento que reciben las ratas sobre el valor de pH de las heces, y el efecto que ejerce influencia significativa sobre esta variable es el tipo de fructano. La disminución del pH por la ingesta de fructanos de maguey coincide con lo publicado por López y Urías (2007) y por la ingesta de fructanos de *C. intybus* con lo publicado por Verghese *et al.* (2002), reportando incluso valores similares de pH a los obtenidos en este experimento.

7.3 Focos de criptas aberrantes

El examen microscópico realizado en el colon de las ratas indica que las sanas no desarrollaron FCA y que el tipo de alimento disminuye significativamente la cantidad de FCA en el colon de las ratas enfermas. Dentro de las ratas enfermas, la cantidad de FCA/colon se presentó en el siguiente orden decreciente: sin adición de fructanos > fructanos de maguey > fructanos de achicoria. Este resultado coincide con el de las investigaciones realizadas por Verghese *et al.* (2002), en donde se demostró que el consumo de fructooligosacáridos reduce de manera significativa la cantidad de FCA en el colon de ratas tratadas con AOM con respecto de las ratas que no los consumen. No se han encontrado investigaciones respecto a la evaluación de este efecto con fructanos de *A. salmiana*.

De ningún modo podemos pensar que los fructanos representan una terapia para revertir el cáncer de colon, pero sí podemos sugerir que observar hábitos alimenticios adecuados en conjunto con la ingesta de este tipo de productos de manera regular, puede ser un factor muy favorable para preservar la homeostasis del colon y reducir el riesgo de padecer cáncer.

La comparación entre el efecto quimiopreventivo de los fructanos de achicoria y los fructanos de maguey, favorece a los primeros en términos de incremento de bacterias benéficas para la salud y reducción de FCA. Si bien la razón no es clara, existen varios factores a los cuales pueden atribuirse estas diferencias.

El primero de ellos es el método de obtención de los polisacáridos, puesto que los fructanos de achicoria provienen de un proceso industrial, lo que implica condiciones muy diferentes a las de la obtención de los fructanos de maguey en nuestro laboratorio y seguramente factores como la pureza de los fructanos de achicoria y el tipo de impurezas presentes en los fructanos de maguey inciden en el resultado final. Esta hipótesis se refuerza con la publicación de Rendón *et al.* (2012), en donde emplearon un modelo *in vivo* de la misma especie de rata utilizada en este experimento para evaluar el efecto prebiótico de los fructanos de *Agave angustifolia*, provenientes de un proceso de purificación industrial y encontraron que incrementan en mayor medida la cantidad de lactobacilos en heces que los fructanos de *Chicorium intybus*. Se considera crítico el nivel de pureza de los materiales puesto que el mecanismo de acción involucrado en la reducción del riesgo de desarrollar cáncer (léase, disminución de FCA) se basa fundamentalmente en establecer un rango de concentración de 5 mM a 15 mM de ácido butírico (Scharlau *et al.*, 2009) en el microambiente intestinal por influencia de los productos de la fermentación de los fructanos. Para comprobar o descartar esta hipótesis es necesario medir la concentración de ácido butírico en las heces. En segundo lugar, la conformación estereoquímica de los fructanos de achicoria es muy diferente a la de los fructanos de maguey: la estructura de los fructanos de achicoria es lineal, y la estructura propuesta de los fructanos de maguey es ramificada (López y Urías, 2007). Es necesario profundizar en las investigaciones de estas causas para ofrecer conclusiones contundentes.

Un aspecto a destacar es que la variable UFC/g de heces resultó ser un biomarcador eficiente para conocer el tiempo en que el epitelio intestinal se había transformado, ya que observamos diferencias significativas en el valor de la variable entre los grupos de acuerdo a su tratamiento. Una vez extirpado el colon de las ratas, durante el análisis microscópico, pudimos apreciar la disminución de la cantidad de células de Goblet en la estructura en las criptas intestinales de las ratas enfermas con respecto de las observadas en el epitelio de las ratas sanas (Fig. 6-1). Esta observación coincide con la realizada por Piñols (2011). El papel de estas células es generar moco en el lumen intestinal por lo cual, sugerimos que la pérdida de éstas, genera un ambiente menos favorable para el desarrollo de bacteriano.

Se observó una correlación negativa entre la disminución del pH (consecuencia de la disminución del pH en el microambiente intestinal) y el incremento de la cantidad de bacterias en las heces de las ratas que consumieron fructanos, lo que representa otro factor de influencia relacionado con el efecto quimiopreventivo de estas moléculas.

Decidimos trabajar con ratas como unidades experimentales debido a las similitudes metabólicas y anatómicas que comparten con el ser humano, además de ser unidades experimentales muy baratas, pequeñas y de fácil manipulación, su tiempo de vida y salud óptima 96 semanas (Gad, 2006) comprende sin problemas la duración del experimento (13 semanas). Adicionalmente, esta especie no expresa lesiones colónicas de manera espontánea, con lo cual, se asegura que la inducción de la enfermedad se deberá específicamente al procedimiento diseñado para este fin (Gad, 2006).

8 Conclusiones

- I. Las variables UFC de lactobacilos/g de heces y pH de las heces bajo las condiciones de este experimento, fueron indicadores confiables respecto al estado de desarrollo del proceso preneoplásico.
- II. La ingesta de fructanos de *A. salmiana* se relaciona con la disminución de los biomarcadores tempranos de cáncer de colon (FCA) inducidos por silenciamiento genético con azoximetano en ratas de la cepa *Wistar*.
- III. Los fructanos de *C. intybus* disminuyen en mayor medida la cantidad de FCA que los fructanos de *A. salmiana*.
- IV. El consumo de fructanos de maguey y de achicoria disminuye el pH en el microambiente del colon.
- V. Los fructanos de *A. salmiana* poseen efecto prebiótico ya que estimulan el crecimiento de lactobacilos en ratas de la cepa *Wistar*.
- VI. Bajo las condiciones de este experimento, se observó que los fructanos de *C. intybus* incrementan en mayor medida que los fructanos de *A. salmiana* la cantidad de lactobacilos *in vivo*.
- VII. Una baja cantidad de bacterias del género *Lactobacillus* en el colon se relaciona con una mayor cantidad de FCA, lo que incrementa la probabilidad de desarrollar cáncer en este órgano.
- VIII. Con la finalidad de reducir la influencia de los errores sistemáticos y aleatorios sobre el resultado, los métodos de extracción y purificación de fructanos deben ser equivalentes para efectuar la comparación de su efecto quimiopreventivo.
- IX. El modelo animal utilizado no garantiza reproducibilidad de los resultados en humanos, por lo cual, se requiere de más investigación para extrapolar el efecto preventivo entre especies.

9 Bibliografía

- Aguirre R., J. R.; Charcas, H; Flores, J. L. El Maguey Mezcalero Potosino; Universidad Autónoma de San Luis Potosí y Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología: San Luis Potosí S. L. P., México. 2001. 87 P.
- Bertkova, I, E. Hijova, A. Chmelarova, G. Mojzisova, D. Petrasova, L. Strojny, A. Bomba, R. Zitnan¹; The Effect of Probiotic Microorganisms and Bioactive Compounds on Chemically Induced Carcinogenesis in Rats; *Neoplasma* 57, 5, (2010) 422-428
- Cani, P. D.; M. A. M. Neyrinck; N. Maton; N. Delzenne. 2005. Oligofructose Promotes Satiety in Rats Fed a High-Fat Diet: Involvement of Glucagons-Like Peptide-1. *Obesity Research* 13: 1000-1006.
- Castro, A.; 2012; Tesis para obtener el título de Química Farmacobióloga. Título: Extracción y purificación de fructanos de *Agave salmiana* y su efecto como prebiótico.
- Clayton, A.L.; Hazzalin, C. A.; Mahadevan, L.C.; 2006; Enhanced Histone Acetylation Review and Transcription: A Dynamic Perspective *Molecular Cell* 23, 289–296
- Cuello, C.M. y Aguirre, J.R., “Especies de Maguey”. *El Cenizotle*. 2: 4-5, 22p, 2008.
- Daubioul, C.; L. De Williams; H. Taper; N. Delzenne. 2000. Dietary Oligofructose Lessens Hepatic Steatosis, But Does Not Prevent Hypertriglyceridemia in Obese Zucker Rats. *J. of Nutrition*. 130: 1314-1319.
- Daubioul, C.; N. Rousseau; R. Demeure; B. Gallez. H. Taper; B. Declereck; N. Delzenne. 2002. Dietary Fructans, But no Cellulose, Decrease Triglyceride Accumulation in the Liver of Obese Zucker Falfa Rats. *J. Nutr.* 132: 967-973.
- Degirolamo, Ch., Modica, S., Palasciano, G., Moschetta, A.; Bile Acids and Colon Cancer: Solving the Puzzle with Nuclear Receptors; Review; *Trends in Molecular Medicine* 2011 October, Vol 17, No. 10, 564-572.
- Delzenne, N.M.; C. Daubioul.; A. Neyrinck; M. Lasa; H. S. Taper. 2002. Inulin and Oligofructose Modulate Lipid Metabolism in Animals: Review of Biochemical Events and Future Prospects. *British Journal of Nutrition*. 87: 255-259.
- Dugdale, D.C.; 2010; National Library of Medicine. Artículo/Cáncer/Cáncer De Colon. Estados Unidos De América, Agosto De 2010. [En Línea] url:<<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001289.htm>> [Consulta: 16 De Junio De 2011].
- Gad, Shayne C.; *Animal Models in Toxicology*; Taylor & Francis Group; Boca Ratón, Florida, U.S.A, 2007. Chapter 3: Pp. 150 – 212.
- Guoren Deng, Geun-Am Song, Erik Pong, Marvin Sleisenger, and Young S. Kim; 2004; Promoter Methylation Inhibits APC Gene Expression by Causing Changes in Chromatin Conformation and Interfering with The Binding of Transcription Factor CCAAT-Binding Factor; *Cancer Research* 64, 2692–2698
- Habermann, N.; 2010; Dissertation for obtaining the degree of doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.): Chemopreventive effects of *n*-3 polyunsaturated fatty acids and fish in human colon cells; Faculty of Biology and Pharmacy, Friedrich-Schiller-University Jena
- Hanahan, D.; Weinberg, R. A.; 2011; Hallmarks of Cancer: The Next Generation; *Cell* 144
- Hendry, G. 1993. Evolutionary Origins and Natural Functions of Fructans. A Climatological, Biogeographic And Mechanistic Appraisal. *New Phytol.* 123: 3-14.

- Hughes, R; Rowland, I.R.; 2001; Stimulation of Apoptosis by two Prebiotic Chicory Fructans in the Rat Colon; *Carcinogenesis* vol. 22 no.1 pp.43 – 47
- Instituto Nacional De Estadística y Geografía (INEGI); Artículo: Estadísticas a Propósito del Día Mundial Contra el Cáncer/Datos Nacionales; 2009 [En Línea].url:<<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2009/cancer09.asp?S=inegi&c=2676&ep=8>> [Consulta, 11 De Mayo De 2011].
- Instituto Nacional De Salud Pública (INSP). Noticia: Crecen Sobrepeso y Obesidad Infantil en México 1.1% al Año. 2010 [En Línea]. Url:<<http://www.insp.mx/noticias/nutricion-y-salud/1200-crecen-sobrepeso-y-Obesidad-Infantil-en-Mexico-11-al-ano.html>> [Consulta: 2 de Mayo de 2011].
- Kaur, N; Gupta, A. K. 2002. Applications of Inulin and Oligofructose in Health and Nutrition; Indian Academy of Sciences; *J. Biosci.* 27 703-714
- León, M. V.; Roque Sáenz F; Focos De Criptas Aberrantes, El Comienzo de la Historia; Artículo de Revisión; 2007. *Gastr. Latinoam.* Vol. 18 No. 4: 383-389.
- López, M. G.; N. Mancilla-Margalli; G. Mendoza-Díaz; 2003; Molecular Structures of Fructans From Agave Tequilana Weber var. Azul. *J. Agric. Food and Chem.* 51: 7835-7840.
- López, M. G; Urías-Silvas, J.E.; 2007; Agave fructans as prebiotics; *Recent Advances in Fructooligosaccharides Research*, ISBN: 81-308-0146-9
- Mancilla-Margalli, N.; M. G. López; 2006; Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns From Agave and Dasyliirion Species. *J. Agric. Food and Chem.* 54: 7832-7839.
- Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R., & Copped, F. (2011). Genetics, Cytogenetics, and Epigenetics of Colorectal Cancer. *Journal Of Biomedicine and Biotechnology*, Volume 2011, Article ID 792362, 19 pages.
- Minucci, S., Saverio, P.; Histone Deacetylase Inhibitors and The Promise of Epigenetic (And More) Treatments for Cancer; Review; Nature Publishing Group; *Nature Reviews/Cancer* Vol. 6. Jan 2006.
- Montenegro, M.A.; Sánchez Negrette, M.; Lértora, W.J.; Catuongo, M.S. Focos de Criptas Displásicas Inducidas con 1,2 – Dimetilhidrazina en Intestino Grueso de Ratas Tratadas con Molibdeno y Cátedra De Patología General y Sistemática, Facultad De Ciencias Veterinarias, UNNE; *Rev. Vet.* 14:1, 2003.
- Nason, A. (1999). *Biología* (36 Ed.). Distrito Federal, México: Limusa Editores.
- National Cancer Institute (NCI). Cancer Topics: Metastatic Cancer. 2011 [En Línea]. Url: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/sites-types/metastatic>> [Consulta: 13 de Octubre De 2011].
- Navarro, M. O. (18 De Marzo De 2009). Tesis Doctoral: Estudio De La Expresión Del Gen Cd200r En Células Epiteliales Del Intestino: Regulación Transcripcional Por Anioikis. Granada, España.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. [En Línea]. Secretaria de Salud. Url:<<http://www.salud.gov.mx/unidades/cdi/nom/mo015ssa24.html>> [Consulta: 02 de Junio De 2011].
- Organización Mundial De La Salud (OMS). Nota Descriptiva No. 297. Centro De Prensa: Cáncer. 2012 [En Línea]. Url:<

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>> [Consulta: 24 de Junio De 2012].

- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. The Antioxidant/Anticancer Potential of Phenolic Compounds Isolated from Olive Oil. *European Journal Of Cancer* 2000 Jun; 36 (10): 1235-1247.
- Owen, R.W., Spiegelhalder, B., Bartsch, H.; Generation of Reactive Oxygen Species by Faecal Matrix; *Gut* 2000; (46) 225:232.
- Park, Y.J.; Rainer, Claus; Wiechenam, Dieter; Plass, Christoph; 2012; Genome-Wide Epigenetic Modifications in Cancer; *Prog Drug Res.* 2011 ; 67: 25–49.
- Perrin, P., Pierre F., Patry, Y., Champ, M., Berreur, M., Pradal, G., Bornet, F., Meflah, K., Menanteau, J. 2000; Only Fibres Promoting a Stable Butyrate Producing Colonic Ecosystem Decrease the Rate of Aberrant Crypt Foci in Rats; Human Nutrition Centre of Nantes; *Gut* 2001;48:53–61.
- Pierre, F., Freeman, A., Taché, S., Van Der Meer, R., Corpet, D.; Beef Meat and Blood Sausage Promote the Formation of Azoxymethane-Induced Mucin-Depleted Foci and Aberrant Crypt Foci in Rat Colons. *American Society Of Nutritional Sciences*, Manuscript Received May 2004
- Piñols-Felis, Carme; Tesis: Estudio de los Cambios en la Mucosa Colónica de Rata y Cinética Celular Durante la Carcinogénesis Experimental Inducida con 1,2 – Dimetilhidracina; Servei De Publicacions, Universitat De Lleida En Biblioteca Virtual, Miguel De Cervantes Saavedra. Salamanca, España.<Url:http://tdx.test.cesca.es/bitstream/handle/10803/8235/cpinyols_pt1.pdf?sequence=1> [En Línea: 9 De Mayo de 2011]
- Pool-Zobel, B.; J. Van Loo; I. Rowland; M. B. Roberfroid. 2002. Experimental Evidences on the Potential of Prebiotic Fructans to Reduce The Risk of Colon Cancer. *British Journal of Nutrition.* 87: 273-281.
- Pöschl, G., Seitz, H. K. 2004. Alcohol and Cancer. *Alcohol & Alcoholism* Vol. 39, No. 3, Pp. 155–165, 2004
- Prophet, Edna; *Laboratory Methods In Histotechnology* (1992); Ed. Armed Forces Institute of Pathology; Pp 57-58.
- Reddy, B. S. 1999. Possible Mechanisms by Which Pro-And Prebiotics Influence Colon Carcinogenesis and Tumor Growth. *American Society for Nutritional Sciences*. Supplement 1478-1482.
- Rendón, J.A., Juarez, B.I., Pinos, J.M., Aguirre, J.R., Delgado, R.E.; 2011; “Effects of different kind of fructans on in vitro growth of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis*”. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5(18): 2706-2710.
- Rendón, J.A., Juarez, B.I., Pinos, J.M., Aguirre, J.R., Delgado, R.E.; 2012; Effects of Different Sources of Fructans on Body Weight, Blood Metabolites and Fecal Bacteria in Normal and Obese non-diabetic and Diabetic Rats; *Plant Foods Hum Nutr* (2012) 67:64–70
- Sancho, E.; 2005; Molecular mechanisms involved in colorectal cancer initiation and progression; *IRB Barcelona Annual Report 2005-2006*
- SAS Institute. 1998. SAS®. Language Guide For Personal Computers Release 6.03 Edition. SAS Institute. Cary. N.C. Usa. 1028 P.
- Scharlau, D., Borowicki, A., Habermann, N., Hofmann, T., Klenow, S., Miene, C., Munjal, U., Stein, K., Gleis, M.; Mechanisms of Primary Cancer Prevention by Butyrate and Other

Products Formed During Gut Flora-Mediated Fermentation of Dietary Fibre; Review; Mutation Research 682 (2009) 39–53

Sharma, S.; Kelly, T.K.; Jones, P. A.; Epigenetics in Cancer; 2010; Carcinogenesis vol.31 no.1 pp.27–36.

Singh, J., Hamid, R., Reddy, B. 1997. Dietary Fat and Colon Cancer: Modulating Effect of Types and Progression Stages of Colon Cancer Amount Of Dietary Fat On Ras-P21 Function During Promotion. Cancer Res 1997, 57:253-258.

Sohn, Emerich S. Fiala,2 Silvia P. Requeijo, John H. Weisburger, And Frank J. Gonzalez; 2001. Differential Effects Of CYP2E1 Status on the Metabolic Activation of the Colon Carcinogens Azoxymethane and Methylazoxymethanol1; American Health Foundation and National Cancer Institute, NIH; Cancer Research 61, 8435–8440, December 1.

Suehiro, Yutaka, C. W. 2008. Epigenetic-Genetic Interactions in the Apc/Wnt, Ras/Raf, and p53 Pathways in Colorectal Carcinoma. Clinical Cancer Research, 2560-2569.

Vasse, M, D Thibout, J Paysant, E Legrand, C Soria and M Crépin. 2000. Decrease of Breast Cancer Cell Invasiveness by Sodium Phenylacetate (Napa) is Associated with an Increased Expression of Adhesive Molecules. British Journal of Cancer. 2001.84 (6), 802-807

Vergheze, M.; D. R. Rao; C. B. Chawan; L. L. Williams; L. Shackelford. 2002. Dietary Inulin Suppresses Azoxymethane-Induced, Preneoplastic Aberrant Crypt Foci in Mature Fischer 344 Rats. American Society for Nutritional Sciences. 2809-2813.