



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

EFFECTO QUIMIOPROTECTOR DE LA LINAZA (*Linum usitatissimum* L.) SOBRE ESTADIOS TEMPRANOS DE CÁNCER DE COLON

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

M. C. Marcelo Hernández Salazar

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

SINODALES

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Presidente

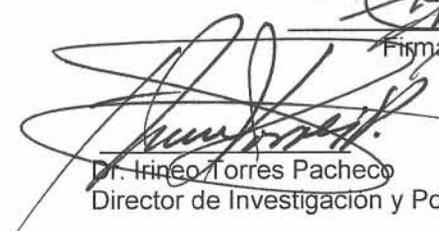
Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Secretario

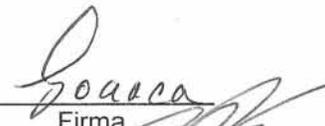
Dr. Lorenzo Guevara Olvera
Vocal

Dr. Luis Arturo Bello Pérez
Suplente

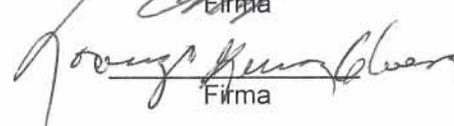
Dr. Eduardo Castaño Tostado
Suplente


M. S. P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre de 2014
México

RESUMEN

En este estudio fue evaluado el efecto quimioprotector de la linaza sobre estadios tempranos de cáncer de colon en un modelo animal; asimismo, con la finalidad de proponer un mecanismo de acción, se analizó la expresión de genes involucrados en el desarrollo de esta patología: como *p53*, *p21*, *rb*, *bcl-2*, *bax* y *caspasa-3*. Treinta y seis ratas macho, de la cepa Sprague Dawley, con un peso inicial de 79 ± 5 y con cuatro semanas de edad, fueron aleatorizadas en seis grupos experimentales (n=6): Control, Linaza, fracción no digerible total (por favor revisa que estas siglas las tengas en toda la tesis) (FNDT), azoximetano (AOM), Linaza + AOM y FNDT + AOM. A los animales de los grupos experimentales AOM, Linaza + AOM, FNDT + AOM se les indujo cáncer de colon químicamente con AOM (15 mg/kg de peso, diluido en 1 mL de solución fisiológica). Los tratamientos (linaza y su FNDT) fueron administrados vía sonda intragástrica diariamente durante nueve semanas y el grupo Control recibió agua *ad libitum*. La dosis de linaza analizada fue la de 16 g/kg de peso, la cual representa la dosis recomendada para consumo humano de dos cucharadas de linaza por día; entre tanto, la dosis de FNDT se hizo la equivalencia a la cantidad de fibra dietética suministrada por la dosis de linaza (8.5 g/kg de peso). La linaza fue el único tratamiento que disminuyó significativamente la multiplicidad de las criptas (10.50 ± 11.0), sugiriendo un efecto preventivo contra el desarrollo de cáncer de colon. Sin embargo, ambos tratamientos influyeron sobre la expresión de los genes analizados. El tratamiento linaza indujo la expresión de *p53* y *p21*, mientras que su FNDT provocó la expresión de *p21* independiente de *p53*, lo cual sugiere que ambos tratamientos indujeron arresto al ciclo celular. Además, la FNDT indujo apoptosis mitocondrial debido a que en el grupo experimental FNDT + AOM se observó expresión de *caspasa-3*, disminución de la expresión de *bcl-2* e incremento de la expresión *bax*. De acuerdo a los resultados, se sugiere que la expresión de los genes analizados se debió a la presencia de compuestos fenólicos asociados a la fibra dietética de los tratamientos.

(Palabras clave: linaza, fracción no digerible total, cáncer de colon, modelo animal, azoximetano)

SUMMARY

The chemopreventive protective effect of flaxseed was evaluated on an early stage of colon cancer by animal studies, studying the expression of some genes that are involved in this disease, such as *p53*, *p21*, *rb*, *bcl-2*, *bax* y *caspasa-3*. Thirty six male Sprague Dawley rats with an initial weight of 79 ± 5 g at 4 weeks of age were used in this study. The animals were randomly placed into six groups: (1) the control group, (2) flaxseed group, (3) total non-digestible fraction (TNDF) group, (4) the azoxymethane (AOM) group, (5) the flaxseed plus AOM and (6) the TNDF plus AOM group, each group with 6 animals. The rats of experimental groups AOM, flaxseed + AOM and TNDF + AOM groups were chemically induced, using AOM (15 mg/kg of body weight, dissolved in 1 mL of physiological saline). The treatments (flaxseed and its TNDF) were administered by intragastric intubation once a day during the experimental period and the control group received water *ad libitum*. The dose of flaxseed given to the rats were based on the recommended flaxseed dose of two tablespoons (16 g of ground flaxseed) per day, and the TNDF given to the rats correspond to the content of total dietary fiber in flaxseed (approximately 50%). The results showed that only flaxseed significantly decreased the crypt multiplicity (10.50 ± 11.0) compared with the AOM treatment (34.00 ± 11.0), suggesting a preventive effect. However, the treatments influenced the expression of the genes analyzed. The flaxseed induced the expression of *p53* and *p21*, and the TNDF triggered the independent expression of *p21*, which suggested that they induced cell cycle arrest. In addition, the TNDF triggered mitochondrial apoptosis because the TNDF + AOM group exhibited the expression of *caspase-3*, decreased *bcl-2* expression and increased *bax* expression. The results suggest that the expression of the analyzed genes is associated with the presence of dietary antioxidant linked to the cell wall of flaxseed.

(Key words: flaxseed, total non-digestible fraction, colon cancer, animal model, azoxymethane)

A Doña Chave†, Don Raúl Salazar† y Don José Ángel Ríos†.
Por el gran amor que me dieron. Por siempre estaré agradecido.

A mi esposa.
Por todo su amor que me ha dado.

A toda mi familia, en especial a mis dos más mamás.
Que siempre me han apoyado en toda mi vida.

A Dios.
No hace mucho tiempo leí en un libro algo que decía: apasionate por Dios, no por el sistema de creencias.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Flavia Loarca Piña por asesorarme y corregirme durante mi trabajo de tesis. Gracias por apoyarme y darme esta valiosa oportunidad. En la tesis de maestría escribí en esta misma sección que la admiraba y respetaba, mi sentimiento es el mismo.

Al Dr. Ramón Guevara González. No hay palabras para agradecer todo el apoyo que me ha brindado; igualmente para el Dr. Andrés Cruz Hernández.

Al Dr. Lorenzo Guevara Olvera y al Dr. Arturo Bello Pérez. Gracias por la asistencia y por sus críticas profesionales.

A la Dra Sandra Mendoza, por las facilidades otorgadas en su laboratorio durante la realización de la parte experimental de esta tesis.

Un agradecimiento especial y con admiración, al Dr. Eduardo Castaño Tostado, por su infinita honestidad.

A todos los compañeros del posgrado. En particular a los chicos del Laboratorio de Bioquímica Toxicológica, a los muchachos del Laboratorio de Nutracéuticos. Gracias por el todo su apoyo.

A todos aquellos que le dan vida a este posgrado, secretarias, bibliotecarios, conserjes, profesores y demás colaboradores. Muchas gracias por su atención y por su amistad.

A los amigos del Laboratorio de Biotecnología. Este trabajo no se hubiera hecho sin su apoyo. En verdad, muchas gracias.

A todas las personas que le dan vida la Universidad, en especial a la Facultad de Química, han hecho que la pase muy bien.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, porque nunca está demás una beca.

Y a todas aquellas personas que de alguna u otra forma han coincidido en mi vida, mil gracias. Todos ustedes, en su momento, me han enseñado algo, me han reflejado algo de mí. Este trabajo, este logro, lo comparto con todos ustedes.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 La semilla de linaza: generalidades	3
2.2 Compuestos antinutricios	4
2.3 Compuestos con actividad biológica	5
2.3.1 Ácido grasos poliinsaturado	6
2.3.2 Compuesto fenólicos y capacidad antioxidante	6
2.3.3 Fibra dietética (FD)	10
2.4 Compuestos fenólicos y su interacción con la FD	13
2.5 Fracción indigerible (FI)	18
2.6 Beneficios a la salud por el consumo de carbohidratos indigestibles y el papel que desempeñan en la prevención del cáncer de colon	19
2.7 Cáncer	24
2.7.1 Clasificación del cáncer	25
2.7.2 Proceso de carcinogénesis	26
2.8 Cáncer de colon	27
2.9 Modelos de estudio <i>in vivo</i>	30
III JUSTIFICACIÓN	33
IV OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo general	34
4.2 Objetivos específicos	34

V. HIPÓTESIS	35
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1 Material biológico y preparación de muestras	36
6.2 Compuestos fenólicos	36
6.3 Caracterización de las muestras en estudio	37
6.3.1 Análisis químico proximal	37
6.3.2 Extracto metanólico	37
6.3.3 Cuantificación de taninos condensados	37
6.3.4 Cuantificación flavonoides totales	37
6.3.5 Cuantificación de compuestos fenólicos totales	38
6.3.6 Determinación de la capacidad antioxidante por la inhibición del radical ABTS ^{•+}	38
6.3.7 Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo de FRAP	39
6.3.8 Bioaccesibilidad <i>in vitro</i> de compuestos fenólicos	39
6.3.9 Fracción indigerible (FI)	43
6.3.10 Fracción no digerible total (FNDT)	43
6.4 Etapa experimental <i>in vivo</i>	44
6.4.1 Medición del pH	45
6.4.2 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	45
6.4.3 Determinación de la actividad de β -glucuronidasa	46
6.4.4 Análisis de fosas crípticas aberrantes (FCA)	47
6.5 Análisis de la expresión de genes asociados al desarrollo de cáncer de colon	48
6.5.1 Extracción de RNA total	48

6.5.2 Detección y análisis de la calidad del RNA	50
6.5.3 Cuantificación del RNA	51
6.5.4 Obtención del cDNA	51
6.5.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	52
6.6 Diseño experimental y análisis estadístico	55
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
7.1 Caracterización de las muestras	56
7.1.1 Composición química proximal de las muestras de linaza (LN)	56
7.1.2 Contenido de taninos condensados (TC), compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT)	58
7.1.3 Composición química proximal y contenido de compuestos fenólicos en la fracción no digerible total (FNDDT)	60
7.1.4 Capacidad antioxidante	62
7.1.5 Bioaccesibilidad <i>in vitro</i> de compuestos fenólicos	64
7.1.6 Contenido de fracción indigerible (FI)	71
7.2 Efecto de la linaza y su fracción no digerible total (FNDDT) sobre el estadio temprano de cáncer de colon	73
7.2.1 Consumo de agua, alimento y ganancia de peso corporal	73
7.2.2 Fosas cripticas aberrantes (FCA)	76
7.2.3 pH y contenido de AGCC en el contenido cecal, colónico y heces	80
7.2.4 Actividad de β -glucoronidasa	83
7.3 Análisis de la expresión de genes asociados al desarrollo de cáncer de colon	88
7.3.1 Mecanismo de acción propuesto de los tratamientos, linaza y su FNDDT (fracción no digerible total), sobre ratas inducidas con AOM	93
VIII Conclusiones	98

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pag
2.1	Lista de mecanismos por el cual la fibra dietética puede proteger contra el desarrollo de cáncer de colon	23
6.1	Oligonucleótidos de los diferentes genes en estudio	54
7.1	Composición química proximal de muestras de linaza (LN) (% en base seca)	57
7.2	Contenido de taninos condensados (TC), compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT) en muestras de linaza (LN)	59
7.3	Composición química proximal y contenido de compuestos fenólicos en la fracción no digerible total (FNDDT) de la muestra LN1	61
7.4	Capacidad antioxidante de diferentes muestras de linaza (LN) y fracción no digerible total (FNDDT) analizadas por ABTS	62
7.5	Capacidad antioxidante de diferentes muestras de linaza (LN) analizadas por FRAP	64
7.6	Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) en muestras de linaza (LN) y fracción no digerible total (FNDDT) después de ser sometidas a un proceso de digestión <i>in vitro</i>	66
7.7	Contenido de flavonoides totales (FT) en muestras de linaza (LN) y fracción no digerible total (FNDDT) después de ser sometidas a un proceso de digestión <i>in vitro</i>	67
7.8	Capacidad antioxidante de diferentes muestras de linaza (LN) y fracción no digerible total (FNDDT) después de ser sometidas a un proceso de digestión <i>in vitro</i>	68
7.9	Contenido de fracción indigerible (FI) en muestra de linaza (LN) y fracción no digerible (FNDDT)	72

7.10	Efecto de la linaza y su fracción no digerible total (FNDT) sobre el número total y multiplicidad de fosas cripticas aberrantes (FCA) en ratas inducidas químicamente con azoximetano (AOM)	77
7.11	Efecto de los tratamientos sobre el pH del contenido cecal, colónico y heces de ratas inducidas y no inducidas	81
7.12	Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en contenido cecal, colonico y heces.	82

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pag
6.1	Estrategia experimental para determinar el índice de bioaccesibilidad	42
6.2	Estrategia experimental <i>in vivo</i>	45
6.3	Fotografía representativa de las diferentes zonas de colon de rata. A. Zona proximal (ciego y parte del colon ascendente), B. Zona media (colon ascendente y porción del colon descendente) y C. Zona distal (colondescendente hasta el ano)	48
7.1	Consumo de agua de los grupos experimentales	74
7.2	Consumo de alimento de los grupos experimentales	74
7.3	Ganancia de peso corporal de los grupos experimentales	75
7.4	Visualización de fosas cripticas aberrantes con azul de metileno (FCA)	78
7.5	Actividad total de β -glucoronidasa en el contenido cecal de ratas inducidas y no inducidas	84
7.6	Actividad total de β -glucoronidasa en el contenido colónico de ratas inducidas y no inducidas	85
7.7	Actividad total de β -glucoronidasa en heces de ratas inducidas y no inducidas	86
7.8	Expresión y normalización de genes involucrados en arresto al ciclo celular	90
7.9	Expresión y normalización de genes involucrados en apoptosis	91
7.10	Esquema del mecanismo de acción propuesto de linaza y su fracción no digerible total (FNDT) sobre el estadio temprano de cáncer de colon	96
7.11	Esquema del mecanismo de acción propuesto de la fracción no digerible total (FNDT) sobre el estadio temprano de cáncer de colon	97

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad compleja caracterizada por varias etapas: iniciación, promoción, proliferación (rápido crecimiento celular) y metástasis (propagación). Debido a esta complejidad, resulta difícil desarrollar un tratamiento para controlar o eliminarla (Thompson, 2003). De los diferentes tipos de cáncer, el de colon es la principal neoplasia del tubo digestivo que afecta tanto a mujeres y hombres de países occidentales, incluyendo a aquellos que están en vías de desarrollo, como es el caso de México (Manoj *et al.*, 2001). En México, del total de muertes registradas por los diferentes tipos de cáncer (en población de 20 años o más), el de colon representa el 5.3 y 4.3% para hombres y mujeres, respectivamente (INEGI, 2012).

Diversos estudios epidemiológicos sugieren que el aumento en la incidencia de cáncer de colon está relacionado directamente con la baja ingesta de alimentos vegetales. Por el contrario, se ha informado que el consumo de alimentos ricos en carbohidratos indigestibles (principal componente de la fibra dietética) está relacionado con la prevención de cáncer de colon por su efecto benéfico sobre la mucosa colónica (Jenab y Thompson, 2000). Debido a esto, el estudio de la fibra dietética (FD) ha adquirido gran importancia en nutrición y salud. La FD escapa de la digestión y absorción en el intestino delgado, llega al colon donde puede ser fermentada por la microbiota intestinal, formando entre otros productos, ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como: acético, propiónico y butírico. Aunque el ácido butírico es considerado el principal agente responsable contra la carcinogénesis colónica, existe evidencia científica que sugiere que los ácidos propiónico y acético pueden tener un efecto citotóxico en células de cáncer humano desencadenando apoptosis vía mitocondria (Jan *et al.*, 2002).

Asimismo, la fermentación colónica de la FD puede modificar la composición de la microbiota, la actividad enzimática y favorecer el crecimiento de microorganismos beneficiosos (como bifidobacterias) en detrimento de microorganismos perjudiciales. La modificación de la actividad enzimática producida a su vez por la modificación de la microbiota puede afectar la formación de carcinógenos y la concentración de sustancias promotoras de tumores con repercusiones positivas y/o negativas para el individuo; por

ejemplo, dietas ricas en grasa incrementan la actividad de enzimas como β -glucuronidasa, nitroreductasas y azorreductasas, enzimas que están implicadas en la formación o reactivación de compuestos carcinogénicos. Por el contrario dietas ricas en FD pueden disminuir la actividad de las enzimas ya citadas, y por lo tanto prevenir el desarrollo de cáncer de colon (Goñi y Martín-Carrón, 2001).

Las fibras viscosas, como mucílagos, pectinas, entre otros, son el tipo de FD que fermentadan en su totalidad y producen una muy buena proporción molar de ácido acético y propiónico (Saura-Calixto, 2006). La linaza es un alimento rico en mucílago, representando del 8-14% del peso seco de la semilla (Hall *et al.*, 2006; Figuerola *et al.*, 2008), y aunque no forma parte de la dieta regular del Mexico (Rendón-Villalobos *et al.*, 2008, su consumo ha ido en aumento, formando parte en la formulación de productos de panificación, cereales para desayuno, entre otros. El interés en la linaza como ingrediente de alimentos nutracéuticos se debe a que algunos resultados científicos sugieren que este alimento puede proporcionar una variedad de beneficios a la salud (Thompson, 2003), entre los que se pueden citar principalmente el efecto cardioprotector y la prevención de algunos tipos de cáncer (Hall *et al.*, 2006). Sin embargo, en este alimento, la FD no ha tenido el mismo interés de estudio con respecto al ácido α -linolénico y lignanos, a los cuales se les tribuye los efectos benéficos ya señalados (Hall *et al.*, 2006). Asimismo, se recomienda el consumo de 1-3 cucharas de linaza por día, tomando en cuenta que una cucharada proporciona aproximadamente 8 g de linaza (Hall *et al.*, 2006; Figuerola *et al.*, 2008), siendo la dosis más utilizada la de dos cucharas de linaza por día, incluso se ha podido observar que la emplean o sugieren algunos productos comerciales.

Tomado en cuenta la dosis de consumo más utilizada, dos cucharadas de linaza por día, aproximadamente 16 g de linaza, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto quimioprotector de la linaza sobre estadios tempranos de cáncer de colon en ratas inducidas químicamente con azoximetano y analizar la expresión de genes involucrados en el desarrollo de cáncer.

II.- ANTECEDENTES

2.1 La semilla de linaza: generalidades

La linaza (*Linum usitatissimum* L.) o semilla de lino se cultivó desde el comienzo del neolítico hasta el periodo Romano, principalmente para obtener fibra textil, pero también para producir semilla y aceite, el cual se utilizó en la producción de alimentos y algunas medicinas, entre otras aplicaciones (Kislev *et al.*, 2011).

Actualmente, la linaza se cultiva aproximadamente en cincuenta países, la mayoría de estos países están ubicados en el hemisferio norte. Canadá es el principal productor, seguido por China, Estados Unidos y la India. Históricamente, el cultivo de linaza se orientó hacia la producción de aceite de uso industrial, no obstante, actualmente hay un nuevo interés por consumir la semilla molida debido a su beneficio potencial para la salud; aunque hay evidencias científicas importantes que respaldan el consumo de linaza, mucha gente aún desconoce las ventajas de su consumo y sus posibles aplicaciones en alimentos (Hall *et al.*, 2006).

La linaza se ha consumido en diversas formas durante más de 5000 años como ingrediente alimenticio y por sus propiedades medicinales, los cuales se mencionan en el Ben Cao, la gran farmacopea China (Oomah y Mazza, 1998). Los componentes que contribuyen al mejoramiento de la salud son: lignanos, ácido α -linolénico y fibra dietética; también pueden ser considerados los flavonoides y ácidos fenólicos, ya que este alimento es considerado como fuente importante de estos dos fitoquímicos (Oomah y Mazza, 1998).

La semilla de linaza es de 4 a 6 mm de longitud, aplanada, de forma oval y con un extremo aguzado. La cubierta de la semilla es de apariencia suave y brillante, y su color puede variar entre marrón oscuro y amarillo claro. El peso de 1000 semillas es de 5 ± 1 g y su peso del hectolitro fluctúa entre 55 y 70 kg. La semilla tiene dos cotiledones aplanados que constituyen la mayor proporción del embrión, este último, está rodeado por las cubiertas de la semilla y por una delgada capa de endospermo. La testa tiene una capa exterior que contiene la mayoría de la fibra soluble y dos interiores ricos en fibra y

lignanós. Desde un punto de vista estructural, la testa, endospermo y cotiledones representan el 22, 21 y 57%, respectivamente (Figuerola *et al.*, 2008).

Existen variedades de semillas de color amarillo o doradas y de color marrón, a pesar de la creencia de que el color externo de la semilla es un indicador de la composición química, no se han encontrado variaciones que sustenten que haya una diferencia entre ellas más allá de las causadas por las condiciones de cultivo (Figuerola *et al.*, 2008).

Con respecto a su composición química, la linaza tiene alrededor de 40% de lípidos, 30% de fibra dietética y 20% de proteína. La composición proximal puede variar entre las variedades y de acuerdo a las condiciones ambientales en las que haya crecido la planta. En los cotiledones se encuentra el 87% de los lípidos y el 76% de la proteína de la semilla, en tanto que en el endospermo está sólo el 17% de los lípidos y el 16% de la proteína (Figuerola *et al.*, 2008).

2.2 Compuestos antinutricios

La linaza presenta algunos compuestos antinutricionales, el ácido fítico y los glucósidos cianogénicos son los principales; no obstante, en la literatura científica no se reportan efectos adversos provocados por el consumo de linaza (Hall *et al.*, 2006; Figuerola *et al.*, 2008).

El ácido fítico, un poderoso agente quelante de cationes y acomplejador de proteínas y almidón, está en cantidades que varían entre 0.8 y 1.5 g/100 g del peso seco de la semilla, dependiendo de cada variedad y las condiciones de crecimiento de la planta; estos valores son semejantes a los encontrados en cacahuete y soya, pero inferiores a los de otras leguminosas (2 a 5.2 g/100g). El ácido fítico representa entre el 60 y 90% del fósforo presente en la semilla, constituye la principal forma de almacenamiento de este elemento y se estima que tiene un papel muy importante en el desarrollo de la semilla (Figuerola *et al.* 2008).

Por el consumo excesivo de linaza, se han reportado algunos efectos negativos como la reducción de la absorción de algunos minerales (calcio, zinc y hierro), además, se

ha informado que disminuye la digestibilidad de proteínas. En contra parte a estos efectos, se han informado algunos atributos, como la disminución de la respuesta glucémica y la incidencia de cáncer de colon en ratas (Figuerola *et al.*, 2008).

Por su parte, los glúcidos cianogénicos tienen la capacidad de liberar cianuro por hidrólisis ácida o enzimática. En la semilla de linaza, los principales glúcidos cianogénicos son linustatina y neolinustatina, y pequeñas cantidades de linamarina y lotasutralina, estando localizados principalmente en los cotiledones. Como en la mayoría de las plantas, su contenido en la linaza difiere con la variedad, condiciones ambientales donde creció la planta y edad de la semilla, reduciendo el contenido desde 5.0 g/100 g en las semillas inmaduras a 0.1 g/100 g en semillas maduras (Figuerola *et al.*, 2008).

La hidrólisis ocurre cuando la semilla es dañada, debido a que la ruptura celular libera enzimas que actúan sobre los sustratos cianogénicos. El efecto metabólico que tiene el consumo de glucósidos cianogénicos en los seres humanos depende de la cantidad consumida, la frecuencia de consumo, el estado nutricional y de salud de la persona, y de la presencia de otros componentes en la dieta que pueden interactuar con ellos (Figuerola *et al.*, 2008).

Es importante destacar que el uso de la linaza habitualmente es como un ingrediente menor, y/o nutracéutico, en productos de panificación y cereales para desayuno que han sufrido tratamiento térmico, por lo que los glúcidos cianogénicos no representan un problema para el consumo. Cabe destacar que en productos horneados no se ha detectado la presencia de cianuro en ellos (Hall *et al.*, 2006; Figuerola *et al.*, 2008).

2.3 Compuestos con actividad biológica

La semilla de linaza contiene diversos compuestos que pueden ofrecer beneficios para la salud, tales como, reducción del riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares, mitigación de los efectos de la diabetes, patologías renales, obesidad, cáncer de colon y recto, reducción del nivel de colesterol sérico y promoción de la

evacuación intestinal. Entre ellos, es importante destacar a la fibra dietética, lignanos, ácido α -linolénico y proteína (Hall *et al.*, 2006).

2.3.1 Ácidos grasos poliinsaturados

La linaza contiene altas concentraciones de dos ácidos grasos poliinsaturados esenciales, los cuales no pueden ser producidos por el cuerpo humano, por lo tanto deben ser obtenidos de la dieta; estos son el ácido α -linolénico (ω -3) y ácido linoleico (ω -6), ambos nombres derivan de la palabra Latina utilizada para nombrar científicamente a la linaza: *linum*. En el cuerpo humano, el ácido α -linolénico es el precursor químico para sintetizar ácidos grasos ω -3 de cadena larga, como los ácidos eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA). El DHA sirve como un componente principal de la membrana fosfolipídica, en fotoreceptores de la retina, en la materia gris cerebral, testículos y espermas. Sin embargo, una pequeña cantidad de EPA está presente en el cuerpo humano, la cual es importante para prevenir enfermedades coronarias, arritmias y trombosis. Ambos ácidos reducen los niveles de colesterol y proporcionan fluidez a la membrana celular. Deficiencias de EPA y DHA pueden retrasar el crecimiento en niños, y su extrema o prolongada insuficiencia puede llegar a ser fatal. Una falta de dichos ácidos grasos poliinsaturados puede perjudicar el sistema inmune, cardiovascular, la función motriz y visual. El consumo diario para adultos de estos dos ácidos grasos esenciales es de unos cuantos gramos, con una proporción de 5/1 a 10/1 (ω -6/ ω -3) (Kislev *et al.*, 2011).

2.3.2 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Hall *et al.*, 2006), y son considerados los antioxidantes más abundantes en nuestra dieta (Manach *et al.*, 2004). Los compuestos fenólicos han sido sugeridos como contribuidores importantes y potentes en reducir el estrés oxidativo debido a su actividad antioxidante (Sreeramulo and Raghath, 2011).

Además de sus propiedades antioxidantes, los compuestos fenólicos pueden tener otras actividades biológicas específicas; por ejemplo, pueden afectar la expresión de genes (Yuan *et al.*, 2005) así como interferir en la señalización y adhesión celular (Wheeler *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2004). Es por esto que actualmente existe un gran interés científico por estudiar sus propiedades biológicas, ya que están relacionadas con la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, las cuales incluyen enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Williamson y Manach, 2005).

En las oleaginosas, los principales compuestos fenólicos que se encuentran son derivados hidroxilados de los ácidos benzoico y cinámico, cumarinas, flavonoides y lignanos (Hall *et al.*, 2006). El contenido aproximado de ácidos fenólicos en linaza es de 790 a 1030 mg/100 g, de los cuales el 48-66% se encuentra de forma esterificada (Hall *et al.*, 2006). Existen variaciones importantes entre variedades y por las condiciones ambientales donde se desarrollan las plantas. Los ácidos fenólicos más abundantes son el trans-ferúlico (46%), trans-sinápico (36%), *p*-cumárico (7.5%) y trans-caféico (6.5%). También, se ha reportado que la goma de linaza (mucílago) puede tener cantidades considerables de ácidos fenólicos (Figuerola *et al.*, 2008)

Los flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos cuyo esqueleto básico contiene 15 átomos de carbono en configuración C₆-C₃-C₆. A estos compuestos se le han asignado múltiples efectos biológicos, incluyendo actividades bacterianas, antivíricas, antiinflamatorias, antialérgicas y vasodilatadoras. Además, los flavonoides inhiben la peroxidación lipídica, la agregación de plaquetas, la permeabilidad y fragilidad capilar, así como la actividad de algunos sistemas enzimáticos, incluyendo la ciclo-oxigenasa y la lipooxigenasa. Los principales flavonoides presentes en los cotiledones de linaza son los glucósidos de flavonas C y O. El contenido de flavonoides en la linaza puede variar con el cultivar y el medio; la transformación genética que confiere a la linaza resistencia a los herbicidas, no parece afectar de forma significativa el contenido de flavonoides (Oomah y Mazza, 1998).

Los taninos son compuestos de intermedio o de alto peso molecular (mayor a 30,000 Da), los cuales son altamente hidrolizables y pueden formar complejos insolubles con los carbohidratos y proteínas. Los taninos pueden ser subdivididos dentro de dos grupos:

taninos hidrolizables y taninos condensados. El ácido tanínico es el más conocido de los taninos hidrolizables, consiste en una molécula de glucosa unida con cinco unidades de ácido gálico, y además esta molécula puede estar fuertemente esterificada con otras cinco unidades más de ácido gálico (Champ, 2002).

Los taninos condensados (TC) son polímeros lineales de unidades flavan-3-ol (catequina y galocatequina) y flavan-3,4-diol (leucocianidina y leucodelfinina), aunque también pueden encontrarse unidades de ácido gálico. Cada cadena polimérica de tanino condensado contiene una unidad final o terminal flavan-3-ol (Naczki *et al.* 1995). Se sabe que los TC son compuestos fenólicos complejos ya que presentan un peso molecular de 500-3000 daltons (Naczki *et al.*, 1994), aunque los más comunes son los de 5 000 daltons; no obstante, se han descrito moléculas de mayor peso molecular (Bravo, 1998).

En la linaza se han encontrado valores de TC alrededor de 136 mg/100 g (Wanasundara and Shaidi, 1994; Hall, 2001). Sobre los niveles de TC en la linaza prácticamente existe poca información científica, por lo que valdría la pena investigar más sobre este tema, ya que algunos autores señalan que la combinación de lignanos, ácidos fenólicos y taninos condensados puede contribuir a la actividad antioxidante de la linaza (Hall, 2001).

Los lignanos son compuestos difenólicos de las plantas superiores formados por el acoplamiento de dos moléculas de residuos de alcohol coniferílico (precursor de la lignina), los cuales se encuentran en la pared celular de las plantas (Touré y Xueming, 2010). Estos compuestos difenólicos tienen múltiples sustituyentes oxigenados en los anillos aromáticos y, en particular en la posición *para*, por lo que su estructura es diferente de la de los lignanos de mamíferos. Aunque no está claro cuál es el papel de los lignanos en las plantas, las propiedades antifúngicas e insecticidas de estos compuestos indican que podrían intervenir en los sistemas de protección, y en otras plantas su función podría ser la de reguladores del crecimiento (Figuerola *et al.*, 2008). Los lignanos también presentan actividad antimutagénica y antioxidante, y en el ser humano pueden actuar como agentes anticancerígenos (Figuerola *et al.*, 2008).

De acuerdo a Thompson (2003), la linaza es la fuente alimenticia más rica de lignanos. Los diglucósidos de secoisolariciresinol (SDG) y meteresinol, son los lignanos más abundantes en la linaza. Estos fitoestrógenos, por acción del ácido gástrico y de la glucosidasa bacteriana del tracto digestivo (principalmente del género *Clostridia*), son biotransformados en enterolactona y enterodiol, respectivamente, y reconocidos como lignanos de mamíferos. Estos compuestos poseen mayor capacidad antioxidante que sus precursores. El SDG es el lignano más abundante y se encuentra en cantidades de 1410 a 2590 mg/100g de semilla seca (Hall *et al.*, 2006). El contenido de lignanos en la linaza está muy influenciado por factores genéticos y en menor grado por las condiciones ambientales (Hall *et al.*, 2006).

Ahora bien, la capacidad antioxidante y secuestrante de radicales libres es una propiedad común de la gran mayoría de los compuestos fenólicos y está determinada por la estructura química del compuesto bioactivo, es decir, influye la presencia de grupos hidroxilo y glúcidos en la cadena hidrocarbonada (Baderschneider y Winterhalter, 2001; Montoro *et al.*, 2005).

Químicamente, un radical libre es cualquier especie que contiene uno ó más electrones desapareados y es capaz de mantener una existencia independiente. La mayoría del oxígeno que respiramos (95%) se utiliza a nivel mitocondrial, pero un pequeño porcentaje (1 a 3%), origina especies reactivas de oxígeno (radicales superóxido, hidroxilo, peroxilo, entre otros.). Los radicales libres se forman como consecuencia natural de nuestro metabolismo oxidativo, por acción de enzimas tipo oxidasas e hidrolasas, así como por efecto de radiaciones, contaminación ambiental e incluso por el consumo de tabaco (Saura-Calixto y Jiménez-Escling, 2001).

Un antioxidante es definido como una molécula que es capaz de mostrar o prevenir la oxidación de otra moléculas (Wikipedia, 2008; Moon y Shibamoto, 2009), mientras que un antioxidante biológico ha sido definido como “cualquier sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones comparado con algún sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación del sustrato” (Moon y Shibamoto, 2009).

El daño oxidativo de varias sustancias biológicas puede propiciar el desarrollo de varias enfermedades. En consecuencia, existen muchos trabajos científicos sobre la relación del daño oxidativo y algunos de las enfermedades que pueden derivar de un estado oxidativo como: cáncer (Paz-Elizur *et al.*, 2008), enfermedades del hígado (Preedy *et al.*, 1998), Alzheimer (Moreira *et al.*, 2005), artritis (Colak, 2008), inflamación (Mukherjee *et al.*, 2007), diabetes (Naito *et al.*, 2006; Jain, 2006), mal de Parkinson (Beal, 2003; Chaturvedi y Beal, 2008), aterosclerosis (Heinecke, 1997), SIDA (Sepulveda y Watson, 2002) y envejecimiento (Liu y Mori, 2006), entre otras (Moon y Shibamoto, 2009).

Ante estos hechos, se han desarrollado y aplicado diversos métodos analíticos para investigar la actividad antioxidante de los compuestos bioactivos presentes en plantas y alimentos de origen vegetal principalmente. En la mayoría de los estudios se han empleado métodos analíticos espectrofotométricos, por ejemplo, el método del β -caroteno, DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidracil), ABTS (2,2' -azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)), FRAP (ensayo del poder reductor férrico/antioxidante), entre otros. En general, se recomienda la práctica de dos métodos diferentes para la investigación de la actividad antioxidante de las muestras. Sin embargo, también se recomienda la combinación de métodos de captación de electrones o radicales, por ejemplo, DPPH, ABTS, ACA (ensayo del ácido carboxílico/aldehído) o FRAP, y métodos asociados con la prevención de peroxidación de lípidos (β -caroteno). Por lo tanto, en estudios recientes sobre la actividad antioxidante de plantas y sus componentes, se han utilizado más de dos métodos diferentes (Moon y Shibamoto, 2009).

2.3.3 Fibra dietética (FD)

Muchas definiciones relativamente actualizadas consideran a la FD como una combinación de sustancias químicamente heterogéneas, las cuales no son digeridas ni absorbidas en el intestino delgado de humanos, incluyendo polisacáridos de pared celular, almidón resistente, oligosacáridos, azúcares-alcohol, proteína resistente, compuestos de la reacción de Maillard, entre otros (Saura-Calixto, 2011).

Sin embargo, hasta los años setenta la fibra, entonces denominada fibra bruta o fibra cruda, era considerada como una fracción de los alimentos de valor energético y nutricional nulo, y por tanto los productos con mínimo contenido de fibra eran los preferidos por la industria alimentaria. Actualmente, la FD es el principal ingrediente de alimentos funcionales (constituye más del 50% del total de ingredientes usados a nivel mundial) y se está incorporando progresivamente a todo tipo de alimento y bebidas como factor de calidad nutricional muy apreciado por los consumidores (Saura-Calixto, 2006). Este cambio es consecuencia de la divulgación de las propiedades fisiológicas y nutricionales puestas de manifiesto por la investigación científica en este campo, que ha tenido un extraordinario desarrollo (Saura-Calixto, 2006).

En base a diversos estudios epidemiológicos, se ha propuesto la hipótesis de que la deficiencia de fibra en la dieta puede ser un factor significativo que, conjuntamente con otros relacionados con la alimentación y estilo de vida, propicia el desarrollo de enfermedades características de los países desarrollados (cáncer de colon, trastornos intestinales, diabetes, cardiovasculares). A partir de estos hallazgos la investigación científica está confirmando en gran medida la hipótesis de que la fibra ayuda a contrarrestar estos padecimientos (Saura-Calixto, 2006).

Los efectos fisiológicos de la fibra dietética se relacionan con sus propiedades fisicoquímicas y tecnológicas, como capacidad de retención de agua, capacidad de hinchamiento, viscosidad, formación de gel, capacidad de ligación de las sales biliares. Estas propiedades dependen de la relación fibra insoluble/soluble, tamaño de partícula, condiciones de extracción y fuente vegetal de origen (Figuerola *et al.*, 2005).

Con respecto a la linaza, esta oleaginosa tiene un alto contenido de fibra, la cual se encuentra principalmente en las capas externas de la semilla (testa o cascarilla), con una relación de 75% de fibra insoluble y 25% de fibra soluble o mucílago (Figuerola *et al.*, 2008).

La goma o mucílago de la linaza es una fuente de FD, y parece influir en la reducción del riesgo de diabetes y enfermedades cardiovasculares, la prevención de cáncer de colon y rectal, y en la reducción de la incidencia de obesidad (Oomah y Mazza, 1998).

La goma hidrocoloidal de linaza forma alrededor del 8% del peso seco de la semilla, pero el rendimiento depende del método de extracción y oscila entre 3.5 y 9.4%. El contenido del mucílago se puede ver afectado por el genotipo y la cosecha, pero no por el lugar de cultivo. Al parecer, las semillas de cubierta amarilla tienen menor contenido de goma. No obstante, las gomas extraídas de las semillas amarillas presentan mejores propiedades reológicas que las de semillas marrones, debido a que su fracción ácida es significativamente menor y contiene una mayor cantidad de polisacáridos neutros (Figuerola *et al.*, 2008).

El mucílago está compuesto por dos polisacáridos, uno neutro (aproximadamente 75%) y otro ácido. El polímero neutro está formado por una cadena de β -D-Xilosa unida con enlaces 1-4, que tiene cadenas laterales de arabinosa y galactosa en posición 2 y 3. El polímero ácido está formado por una cadena principal de residuos de (1-2)- α -L ramnopiranosil y de ácido (1-4)- D-galactopiranosilurónico, con cadenas laterales de fucosa y galactosa. El componente principal del polímero neutro es la Xilosa (62.8%) y el polímero ácido es la ramnosa (54.5%), por lo que la relación ramnosa/xilosa se usa frecuentemente para estimar la relación entre polisacáridos ácidos/neutros. Esta relación fluctúa entre 0.3 y 2.2. Los estudios realizados acerca de la composición del mucílago de la linaza indican que la composición de monosacáridos del mucílago varía significativamente entre diferentes cultivares de linaza. Los cultivares con mayor contenido de polisacáridos neutros muestran mayor viscosidad aparente y formación de geles más firmes. El mucílago de linaza es un hidrocoloide complejo polidisperso, y los diferentes comportamientos reológicos observados en los cultivares es provocado tanto por las diferencias en la proporción entre polímeros neutros y ácidos, el peso molecular y la conformación estructural de los polisacáridos (Hall *et al.*, 2006).

El mucílago de linaza, como los demás tipos de fibra dietética viscosas, puede reducir la respuesta postprandial de glucosa en sangre (Oomah y Mazza, 1998), por lo que se sugiere que la fibra soluble reduce la respuesta glucémica mediante un aumento de la viscosidad del contenido del intestino delgado, retrasando la digestión y absorción de hidratos de carbono (Schneeman, 2007). En otros estudios, se ha informado que las dietas complementadas con linaza, reducen significativamente los niveles séricos de colesterol

total y principalmente lipoproteínas de baja densidad (LDL). Los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) o bien aumentan ligeramente o permanecen constantes por el consumo de linaza; se sugiere que este efecto está relacionado con la fibra dietética de la linaza y no con el aceite como tal o al ácido α -linolénico presente en el mismo. De igual forma, existen estudios que han manifestado que el consumo de linaza en la dieta, ya sea cruda o en productos horneados, mejora la tolerancia a la glucosa, lo cual también puede ser debido al efecto de la fibra dietética de linaza y no al aceite (Oomah y Mazza, 1998).

Otro hecho interesante es que el mucílago de linaza extraído por diferentes métodos, puede presentar cantidades importantes de compuestos fenólicos totales, de 328 a 1422 mg/100 g de muestra (Velioglu *et al.*, 1998). En consecuencia, hay que tomar en cuenta que la fibra dietética siempre se encuentra en los alimentos o suplementos de fibra como una matriz vegetal que puede llevar compuestos bioactivos asociados, entre los que destacan compuestos fenólicos con capacidad antioxidante (Saura-Calixto, 2006). Por lo tanto, los compuestos fenólicos también pueden escapar del proceso digestivo y llegar al colon sin degradar; se sabe que los compuestos fenólicos pueden ser excretados y que favorecen la excreción de lípidos, asimismo pueden tener efectos positivos en el tracto intestinal y en el metabolismo de lípidos (Saura-Calixto, 2006).

Por esta razón, es posible que la fibra dietética total de la linaza (soluble e insoluble) acompleje y por tanto presente cantidades apreciables de compuestos fenólicos, los cuales pueden ser un factor adicional que puede potenciar la calidad de la FD de este alimento. Sin embargo, y dado el alto contenido de FD en la linaza, éste compuesto no ha recibido el mismo interés de estudio en comparación con el ácido α -linolénico y los lignanos (Hall *et al.*, 2006).

2.4 Compuestos fenólicos y su interacción con la fibra dietética (FD)

Ya se ha mencionado la importancia y efectos a la salud por parte de la FD y los compuestos fenólicos. Normalmente a estos compuestos dietarios la literatura científica los analiza por separado, como compuestos que no tienen relación alguna. Sin embargo, existen reportes que demuestran que alrededor del 50% de los antioxidantes dietarios

totales –principalmente compuestos fenólicos- se encuentran ligados a la matriz de fibra dietética de los alimentos vegetales, los cuales pueden alcanzar el colon. En otras palabras, FD y cantidades considerables de compuestos fenólicos siguen un proceso fisiológico común y sinérgico dentro del tracto digestivo. Por lo tanto, la presencia de compuestos fenólicos y otros compuestos asociados a la FD pueden afectar significativamente sus propiedades fisiológicas y los efectos a la salud (Saura-Calixto, 2011).

Numerosas definiciones actualizadas consideran a la FD como una combinación de sustancias químicamente heterogéneas no absorbidas en el intestino delgado, incluyendo polisacáridos no amiláceos, almidón resistente, oligosacáridos, polioles, proteína resistente, compuestos fenólicos, compuestos de maillard, entre otros. Sin embargo, a pesar de los avances e investigaciones intensivas en este campo, la definición de FD aun es controversial. La definición de la AACCC (American Association of Cereal Chemists, por sus siglas en idioma inglés) incluye compuestos distintos a los carbohidratos, mientras que el Codex Alimentario define FD como “polímeros de carbohidratos (dietarios y sintéticos) con diez o más unidades monoméricas, los cuales no son hidrolizados por enzimas endógenas en el intestino delgado de humanos”. Esta definición puede ser útil para análisis, etiquetado y propuestas comerciales, pero obviamente presenta algunas limitaciones para estudios nutricionales o de salud, dado que omite a la mayoría de los constituyentes dietarios indigestibles (Saura-Calixto, 2011).

Numerosos trabajos de investigación han abordado las propiedades químicas, fisiológicas y nutricionales de los “nuevos” componentes de la FD (almidón resistente, proteína resistente, oligosacáridos, polímeros sintéticos, entre otros); no obstante, poca atención se le ha dado a los antioxidantes dietarios, principalmente a los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos no representan una porción minoritaria de constituyentes en la FD y como tal, pueden contribuir significativamente con efectos saludables atribuidos tanto a la FD y a los compuestos fenólicos asociados (Saura-Calixto, 2011).

Las propiedades biológicas de los compuestos fenólicos dependen de su bioaccesibilidad y biodisponibilidad (Saura-Calixto, 2011). La bioaccesibilidad de los compuesto fenólicos puede ser definida como la cantidad de compuestos antioxidantes que

son liberados de la matriz del alimento después del proceso de digestión, ya por la solubilización directa de los antioxidantes dietarios en los fluidos intestinales en condiciones fisiológicas (37 °C, pH 1-7.5), y/o por la acción de las enzimas digestivas. La hidrólisis enzimática de proteínas, carbohidratos y lípidos favorece la liberación de antioxidantes dietarios de la matriz del alimento; por lo tanto, los antioxidantes dietarios pueden ser absorbidos en el intestino delgado. Por otro lado, se entiende por biodisponibilidad la porción de antioxidantes dietarios que es absorbida hacia el torrente sanguíneo, los cuales llegan a ser disponibles para su utilización metabólica, ejerciendo sus efectos en el sitio de acción. En consecuencia, bioaccesibilidad y biodisponibilidad son conceptos distintos. La biodisponibilidad de los compuestos fenólicos depende de su bioaccesibilidad de la matriz del alimento (Saura-Calixto, 2011; Haminiuk *et al.*, 2012).

En base a lo anterior, los antioxidantes dietarios pueden ser divididos en dos grupos: (1) antioxidantes bioaccesibles en el intestino delgado (vitaminas, compuestos fenólicos de bajo peso molecular y carotenoides, y (2) antioxidantes no bioaccesibles en el intestino delgado o antioxidantes dietarios asociados a FD. Éstos últimos comprenden principalmente compuestos fenólicos (compuestos fenólicos poliméricos y de bajo peso molecular ligados a FD o atrapados en el núcleo de la matriz de la FD) y cantidades minoritarias de carotenoides y otros compuestos. La mayoría de los estudios sobre antioxidantes dietarios se refieren al grupo 1, mientras que el grupo 2 es usualmente ignorado, probablemente porque se piensa que son minoritarios y fisiológicamente irrelevantes. Sin embargo, recientes hallazgos han mostrado que los antioxidantes dietarios del grupo 2 constituyen la porción mayoritaria en los alimentos y en la dieta (Saura-Calixto, 2011).

Los compuestos fenólicos están conformados por anillos aromáticos y grupos hidroxilo y tienen además la habilidad de unirse a polisacáridos y proteínas de diferentes sitios de la pared celular. Los compuestos fenólicos se unen por puentes de hidrógeno (entre el grupo hidroxilo del compuesto fenólicos y el átomo de oxígeno del enlace glucosídico del polisacárido), interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes como el éster entre ácidos fenólicos y polisacáridos. Las interacciones entre compuestos fenólicos y la pared celular del alimento vegetal pueden depender de la porosidad específica y de las

propiedades de la superficie, lo cual pueden restringir el tamaño de la partícula que penetra la pared celular. El tamaño de poro en la pared celular va de 4 a 10 nm de diámetro, esto puede restringir la penetración de moléculas de compuestos fenólicos con una masa mayor a 10 KDa, equivalente a 34 unidades de catequina (Saura-Calixto, 2011).

Las cantidades apreciables de compuestos fenólicos asociados pueden proveer capacidad antioxidante significativa a la FD y mejorar sus propiedades. La determinación de la capacidad antioxidante en FD puede ser útil para completar la caracterización de la fibra, estimar su potencial efecto a la salud y en consecuencia determinar su aplicación como un ingrediente funcional. La capacidad antioxidante de la FD es derivada del poder antioxidante de los compuestos fenólicos y otros constituyentes menores (carotenoides, compuestos de Maillard, trazas de minerales entre otros). Dicho parámetro provee una estimación integral que puede representar la cantidad de unidades antioxidante (Trolox equivalents) transportadas por la FD hacia el colon humano (Saura-Calixto, 2011).

Otro tema importante es la fermentación de compuestos fenólicos del grupo 2 en el colon humano –principalmente taninos poliméricos e hidrolizables asociados con FD por diferentes interacciones ya mencionadas-, dicho proceso es un evento fisiológico importante que puede tener efectos significativos en la salud intestinal. Como ya se indicó, los compuestos fenólicos asociados a FD no son absorbidos en el intestino delgado de los humanos, por lo tanto alcanzan el colon donde son sustratos fermentables por la microflora (microbiota) junto con los carbohidratos indigestibles. Se ha hipotetizado que el conjunto compuestos fenólicos/FD es capaz de ejercer una considerable capacidad reductora en el intestino delgado y grueso antes de la fermentación. Este material permanece en el tracto gastrointestinal por largo tiempo y presenta la capacidad de atrapar radicales solubles formados en el tracto gastrointestinal por interacciones en la superficie gástrica y proteínas (Saura-Calixto, 2011).

Se sabe que la microbiota humana puede hidrolizar, reducir, descarboxilar, desmetilar, deshidroxilar compuestos fenólicos produciendo varios metabolitos como ácidos dihidroxifenólicos, urolitin, equol, entre otros (Saura-Calixto, 2011). Igualmente los ácidos fenilacético, fenilpropiónico y fenilbutírico, así como las urolitinas A y B son metabolitos absorbibles de la fermentación colónica de compuestos fenólicos que pueden

ejercer un efecto sistémico (Saura-Calixto, 2011). Los metabolitos no absorbibles y no fermentables de los compuestos fenólicos permanecen en el lumen del colon, donde pueden contribuir con un ambiente antioxidante saludable secuestrando radicales libres y contrarrestando los efectos de pro-antioxidantes dietarios. Asimismo, los compuestos fenólicos pueden tener un efecto modulador sobre la microflora. La interacción entre la microbita y los compuestos fenólicos modifica el número y los tipos de bacterias; se ha reportado que por la acción de los compuestos fenólicos dietarios y sus metabolitos se favorece el crecimiento de bacterias benéficas (*Lactobacillus* spp) y la inhibición de bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*) (Saura-Calixto, 2011).

Por otro lado, existen pocos estudios *in vivo* dirigidos o relacionados con las propiedades saludables de los compuestos fenólicos asociados a FD. Las principales propiedades derivadas de la presencia de apreciables cantidades de antioxidantes dietarios en FD reportada en experimentos con animales son:

- a) Incremento de la excreción de lípidos, proteínas, agua y heces.
- b) Efecto positivo en el metabolismo de lípidos, reducción de la peroxidación lipídica, colesterol total, colesterol LDL y triacilgliceridos en ratas hipercolesterolemicas.
- c) Incremento de la actividad antioxidante en el intestino grueso y ciego.
- d) Inhibición de la proliferación celular en el epitelio colonico y reducción del número total de criptas en ratas.

Tales hechos sugieren un efecto positivo sobre la prevención de enfermedades cardiovasculares, igualmente en salud intestinal, incluyendo la prevención de cáncer de colon. Al respecto, los compuestos fenólicos del grupo 2 (principalmente proantocianidinas o taninos condensados) pueden producir un efecto quimiopreventivo contra cáncer de colon a través de diferentes mecanismos: generación de un ambiente antioxidante en el colon, inhibición del daño oxidativo al ADN e inflamación, inducción de apoptosis y prevención de la formación de pólipos (Saura-Calixto, 2011).

Bajo este contexto, algunos autores como Ferguson *et al* (2001) han señalado que la sobreproducción de radicales libres y por lo tanto del estrés oxidativo está ligado al cáncer. La literatura sobre protección contra el cáncer sugiere que la pared celular de los alimentos vegetales contiene cantidades significantes de compuestos fenólicos que pueden ser los mayormente responsables en la protección contra el cáncer (Saura-Calixto, 2011).

2.5 Fracción indigerible (FI)

Entre los diversos métodos para determinar la FD en los alimentos, el más ampliamente usado es el método oficial de la AOAC (Association of Official Analytical Chemist, por sus siglas en idioma inglés) propuesto por Prosky *et al.* (1988). Las principales etapas de este protocolo experimental son el tratamiento enzimático para remover proteína y almidón (Saura-Calixto, 2000). No obstante, existe evidencia de que una parte del contenido de almidón en el alimento, llamado almidón resistente (AR), escapa a la absorción y digestión del intestino delgado de humanos, junto con otras sustancias dietarias no incluidas en la definición de FD, como son, proteínas, ciertos compuestos polifenólicos y compuestos de Maillard (Saura-Calixto, 2000).

En general, la tendencia de los nutricionistas ha sido ampliar el concepto de FD para incluir a la mayoría de los constituyentes alimenticios que alcanzan el colon y sean sustratos para la microflora. Para esto, fue propuesto un método simple y reproducible para determinar la fracción indigestible de los alimentos, los cuales comprenden la mayoría de los componentes de alimentos de origen vegetal, que escapa a la digestión y absorción en el intestino delgado, alcanzando el colon donde sus componentes son susceptibles a la fermentación bacteriana. Las condiciones analíticas para la determinación de la fracción indigestible son cercanas a las condiciones fisiológicas (pH, temperatura y tiempo de incubación). La fracción indigestible está compuesta a su vez por dos fracciones: la fracción soluble (sobrenadante de la digestión enzimática) y una fracción insoluble (residuos de la digestión enzimática) (Saura-Calixto *et al.*, 2000).

Este método se caracteriza por su versatilidad y simplicidad, ya que puede ser de aplicación en el etiquetado y control de calidad de los alimentos. No obstante, pequeñas

variaciones en la etapa final del proceso pueden ampliar su uso. En ambas fracciones (soluble e insoluble) pueden realizarse diferentes análisis químicos, como cuantificar polisacáridos no amiláceos como azúcares neutros más ácido urónico; también se pueden analizar otros componentes como son AR, proteína resistente (por el método de Kjeldahl), taninos condensados, ligninas o minerales (después de su calcinación), todo esto puede determinarse en la fracción insoluble. Por otro lado, los oligosacáridos no digeribles pueden cuantificarse en la fracción indigestible soluble previo al proceso de diálisis (Saura-Calixto *et al.*, 2000).

2.6 Beneficios a la salud por el consumo de carbohidratos indigestibles y el papel que desempeñan en la prevención del cáncer de colon

Los carbohidratos constituyen una de las bases de cualquier dieta y tienen un papel relevante en la formulación de guías alimenticias. Desde un punto de vista nutricional, la cantidad total de carbohidratos en el alimento no proporciona información suficiente, ya que no permite identificar la gran variedad de carbohidratos que se encuentran en los alimentos y, principalmente, las propiedades fisiológicas potenciales de los mismos (Goñi y López-Oliva, 2006).

La actividad fisiológica de los carbohidratos en el tracto gastrointestinal está determinada por sus propiedades físicas y químicas, y del alcance y localización de su digestión dentro del tracto gastrointestinal. En los alimentos que se consumen en la dieta existen carbohidratos que son digeridos por enzimas propias de los mamíferos (α -amilasa y disacaridasas), tales como, almidón, sacarosa, fructosa, lactosa y maltosa. A dichos carbohidratos, se les conoce como carbohidratos digeribles, y se les considera como fuente de energía (Schneeman, 2007). Los carbohidratos digeribles son biodisponibles en el intestino delgado e inducen una respuesta glucémica dependiente tanto del individuo como de la composición del alimento y de la ración dietética (Goñi y López-Oliva, 2006).

Los carbohidratos resistentes a la digestión en el intestino delgado (no digeridos o digeridos pero no absorbidos) (Goñi y López-Oliva, 2006) pueden ser hidrolizados por enzimas microbianas e incluyen a los polisacáridos no amiláceos asociados a la fibra

dietética (celulosa, hemicelulosa, pectinas y gomas, entre otros) y oligosacáridos como: la inulina, rafinosa, estaquirosa, verbascosa, etc. Por lo tanto, estos compuestos son degradados en el intestino grueso, y sus propiedades físicas y químicas tienen efectos fisiológicos importantes en el tracto gastrointestinal (Schneeman, 2007).

Las propiedades asociadas a los polisacáridos no amiláceos y oligosacáridos incluyen: su capacidad de absorción de agua, viscosidad, efecto ligador de ácidos biliares e incremento de la materia fecal. Además, algunos de estos compuestos son sustratos primarios para el crecimiento de la microbiota en el intestino grueso (Schneeman, 2007).

Mucho compuestos de la fracción de polisacáridos no amiláceos son parte integral de la pared celular de las plantas y un componente significativo de la estructura de algunos alimentos. Es por esto que el Instituto de Medicina de los Estados Unidos (IOM, por sus siglas en idioma inglés), en un reporte sobre fibra dietética indicó que además de los efectos benéficos de los componentes individuales de la fracción de carbohidratos no amiláceos, la estructura que proporcionan a los alimentos es fisiológicamente importante (IOM, 2001). En consecuencia, no se puede ignorar el aspecto estructural de un alimento cuando se consideran los efectos fisiológicos de los carbohidratos (Schneeman, 2007).

Después de la absorción y digestión en el intestino delgado de nutrientes y carbohidratos glucémicos, la materia residual de la dieta pasa al intestino grueso. El intestino grueso contiene una microflora compleja que utiliza como fuente de sustrato la materia residual, los principales compuestos que son usados son, polisacáridos no amiláceos, almidón resistente, y secreciones digestivas (Schneeman, 2007). El proceso denominado fermentación colónica y los principales productos que se generan son: AGCC (acético, propiónico y butírico), gases (hidrógeno, metano y dióxido de carbono), ATP e incremento de la microflora (Goñi y Martín-Carrón, 2001).

Cummings *et al.* (1992) estimaron que aproximadamente 15 a 60 g de carbohidratos pueden ser fermentados diariamente en el intestino grueso. Además, Cummings y MacFarlane (1991) estimaron el óptimo crecimiento de la microbiota intestinal humana y que la microbiota necesita un aporte diario de 60 g de carbohidratos. Debido al proceso de fermentación se producen aproximadamente de 200 a 700 mmol de de

AGCC. Los AGCC son rápidamente absorbidos y metabolizados por el organismo y se relacionan con una gran parte de los efectos beneficiosos para el huésped (Goñi y Martín-Carrón, 2001).

El ácido butírico es utilizado como fuente de energía por los colonocitos; el ácido propiónico es absorbido y, a través de la vena porta, llega al hígado donde es metabolizado; el acético puede ser utilizado por células musculares y tejidos periféricos (Schneeman, 2007). No obstante, algunos investigadores como Delzenne (2003) y Önning (2007) mencionan que el ácido acético y propiónico pueden modular el metabolismo de lípidos en el cuerpo. En el hígado, el ácido acético puede tener función lipogénica y colesterogénica, mientras que el propiónico puede inhibir la síntesis de triacilglicéridos.

Además, por la producción de los AGCC y del incremento de la actividad microbiana en el intestino grueso, también hay una disminución en el pH, lo que modifica la población y la actividad enzimática microbiana, y como ya se hizo mención, un incremento en la microbiota (Bergman, 1990).

Algunos carbohidratos indigestibles están involucrados en procesos de laxación y eliminación de materia fecal. Los principales componentes de la materia fecal son agua, residuos de carbohidratos indigestibles provenientes de la dieta y masa microbiana (Cummings, 1993; Schneeman, 2007). Los polisacáridos no amiláceos son los únicos componentes de la dieta capaces de incrementar el peso de las heces (Cummings *et al.*, 1992; Schneeman, 2007). En estudios efectuados con humanos y animales, el peso de las heces ha sido significativamente correlacionado con el consumo de polisacáridos no amiláceos (Nyman, 1986; Schneeman, 2007).

Existe una fuerte relación entre el peso de las heces y la protección contra el cáncer de colon (Slavin, 2007). Los polisacáridos no amiláceos que están involucrados en este fenómeno, la mayoría forma parte de la fracción insoluble de la fibra dietética. Por ejemplo, se sabe que la fibra de salvado de trigo (mayormente insoluble) incrementa el peso de las heces hasta 5.4 g/g de fibra ingerida, las frutas y vegetales (soluble e insoluble) 4.9 g/g de fruta y verdura consumida, celulosa aislada (insoluble) 3 g/g de celulosa consumida, y pectina aislada (soluble) 1.3 g/g de pectina consumida (Cummings, 1993). Sin embargo,

algunas fuentes de fibra son principalmente solubles pero que incrementan significativamente el peso de las heces, tal es el caso de la avena y psyllium. El psyllium aumenta el peso de las heces hasta 4.0 g/g de fibra de psyllium consumido. Por el contrario, no todas las fibras insolubles son particularmente buenas en aumentar el peso de las heces, tal es el caso de la celulosa aislada (Slavin, 2007).

En el caso particular de la linaza, es una buena fuente de fibra dietética (60% insoluble y 40% soluble), no obstante hay poca información científica en relación al aumento del peso de las heces. Sin embargo, Ratnayake *et al.* (1992) en un estudio con ratas a las cuales les administraron una dieta de 0, 10, 20 y 40% de harina de linaza, observaron que la fibra de linaza tubo buen efecto en aumentar el peso húmedo de las heces (39 a 58%), incluso mejor que la fibra dietética de salvado (50% aproximadamente).

Por otra parte, el Instituto Americano para la Investigación del Cáncer y el Fondo Mundial para la Investigación del Cáncer han estimado que del 30 al 40 % de los distintos tipos de cáncer pueden ser prevenidos por una dieta adecuada, actividad física y mantenimiento del peso corporal adecuado (WCRF/AICR, 1997; Donalson, 2004). Con respecto a la dieta, se ha recomendado la ingesta de una proporción abundante de frutas y verduras, es decir de 4 o más porciones de fruta y de 10 o más porciones de vegetales al día (entiéndase por porción una manzana, media taza de brócoli o leguminosas), con la finalidad de disminuir el riesgo de cáncer (Donalson, 2004).

Existen diversos componentes de los alimentos vegetales que están vinculados con la prevención de algunos tipos de cáncer, por ejemplo, se sabe que los carbohidratos pueden prevenir el desarrollo de cáncer, así lo demuestran diversos estudios efectuados con fibra dietética (Slavin, 2007). Los carbohidratos indigestibles de la dieta pueden modificar la composición de la microbiota, la actividad enzimática en el tracto digestivo y favorecer el desarrollo de especies de microorganismos benéficos como las bifidobacterias en detrimento de las bacterias perjudiciales. La modificación de la actividad enzimática, producida a su vez por la modificación en la microbiota, puede afectar la formación de carcinógenos y la concentración de sustancias promotoras de tumores, con repercusiones positivas y/o negativas para el individuo. Por ejemplo, dietas ricas en grasa incrementan la actividad de enzimas β -glucoranasas, nitroreductasas y azorreductasas, implicadas en la

formación o reactivación de compuestos carcinógenos. En cambio, dietas ricas en polisacáridos no amiláceos se asocian con una menor incidencia de cáncer de colon, ya que disminuye la actividad de las citadas enzimas (Goñi y Martín-Carrón, 2001).

El mecanismo potencial y natural por el cual la fibra dietética protege contra el cáncer de colon se enlista en el Cuadro 2.1.

Cuadro 2.1 Lista de mecanismos por el cual la fibra dietética puede proteger contra el desarrollo de cáncer de colon.

-
- Incremento del volumen de las heces
 - Disminución del tiempo de tránsito de las heces
 - Disolución de carcinógenos
 - Ligamiento de ácidos biliares y otros carcinógenos potenciales
 - Disminución del pH en las heces
 - Inhibición de bacterias formadoras de carcinógenos
 - Cambios en la microbiota
 - Fermentación colónica
 - Disminución del pH colónico
 - Inhibición de carcinógenos
 - Incremento de antioxidantes en el lumen intestinal
 - Factores de crecimiento peptídicos
 - Alteración del estatus hormonal sexual
 - Cambios en la saciedad
 - Alteraciones en la respuesta insulínica y en el metabolismo de la glucosa
-

(Slavin, 2007)

No obstante, y como ya se ha mencionado, el efecto fisiológico más importante de la fibra dietética es su fermentación en el intestino grueso. Más del 75% de la fibra dietética proveniente de la dieta es desdoblada en el intestino grueso, produciendo dióxido de carbono, hidrógeno, metano y AGCC. De acuerdo a los cálculos realizados por Cummings y MacFarlane (1997), aproximadamente 20 g de fibra dietética producen 200 mM de

AGCC, de los cuales el 62, 25 y 16% corresponden a ácido acético, propiónico y butírico, respectivamente (Slavin, 2007).

La absorción de los AGCC es dependiente de la concentración y no existe evidencia alguna de un proceso saturable. El mecanismo por el cual los AGCC cruzan la mucosa colónica es por difusión pasiva del ácido no ionizado. Los AGCC son completamente metabolizados por la mucosa colónica. En colonocitos humanos se ha observado que el ácido butírico es metabolizado a CO₂ y cuerpos cetónico, y representa cerca del 80% del oxígeno consumido por los colonocitos (Slavin, 2007).

El ácido butírico puede ser considerado como un agente protector contra la carcinogénesis colónica (Velázquez *et al.*, 1997). En diversos estudios *in vivo* e *in vitro* se ha observado un efecto trófico por parte del ácido butírico. A partir de estudios *in vitro*, se sabe que el ácido butírico detiene el crecimiento de colonocitos neoplásicos e inhibe la hiperproliferación preneoplásica inducida por algunos promotores tumorales. De igual forma, el ácido butírico puede inducir diferenciación en líneas celulares de cáncer de colon, y por otro lado, regular la expresión de moléculas involucradas en la adhesión y crecimiento de los colonocitos (Slavin, 2007).

2.7 Cáncer

Al cáncer se le puede definir como el trastorno de los mecanismos que controlan la proliferación y la diferenciación de las células en los organismos pluricelulares (Clayson, 2000; Feregrino-Pérez, 2008).

El término cáncer ampara más de 100 formas de la enfermedad de acuerdo al tejido afectado; incluso dentro de un mismo tejido podemos encontrar diversas variedades de cáncer con distinta morfología y grado de malignidad (Gariglio y Orozco, 2000; Feregrino-Pérez, 2008).

Las células cancerígenas están definidas por dos propiedades hereditarias: 1) se reproducen a pesar de las restricciones normales, y 2) invaden y colonizan territorios normalmente reservados para otras células. Una célula anormal aislada que no prolifere

más que sus vecinas normales, no produce daño significativo, pero si su proliferación está fuera de control producirá un tumor o neoplasma. Si las células neoplásicas permanecen agrupadas se dice que el tumor es benigno, si las células neoplásicas invaden el tejido circundante se considera maligno. La capacidad de invadir implica la habilidad de liberarse, entrar en el torrente sanguíneo, o en los vasos linfáticos, y formar tumores secundarios o generar metástasis en otros lugares (Folkman, 2002; Feregrino-Pérez, 2008).

2.7.1 Clasificación del cáncer

El cáncer se clasifica de acuerdo con el tejido y el tipo de células de donde se origina: carcinomas de las células epiteliales, sarcomas de las células musculares, leucemias de las células hematopoyéticas, linfomas de las células del sistema inmunitario y gliomas de las células del sistema nervioso central (Albert *et al.*, 2000; Feregrino-Pérez, 2008).

Las mutaciones que afectan la expresión genética se consideran como un rasgo común de todos los cánceres, dando lugar a la existencia de dos tipos de casos: a) los hereditarios si la mutación incide en la línea germinal y se hereda, b) los esporádicos si la mutación aparece en las células somáticas (Feregrino-Pérez, 2008).

Una única mutación no es suficiente para convertir una célula sana típica en una célula cancerosa que prolifere sin restricciones, porque en realidad la génesis del cáncer requiere que se produzcan en la misma célula varios accidentes independientes. El la mayoría de los tipos de cáncer la incidencia se incrementa abruptamente con la edad, de modo que conforme el promedio de vida de las personas incrementa un mayor número de cáncer se desarrolla (Chau y Wang, 2003; Feregrino-Pérez, 2008).

El cáncer por consiguiente es un proceso multifase que requiere de varios eventos mutacionales independientes para que suceda una transformación neoplásica (Díaz *et al.*, 1998; Feregrino-Pérez, 2008). Hanahan y Weinberg (2000) consideran que las células cancerosas tienen seis características: ignoran las señales que controlan la proliferación celular (como las que promueven la diferenciación), adquieren capacidad para sostener la

proliferación celular, evaden la apoptosis, poseen capacidad invasiva y angiogénica. Estas características dan como resultado los siguientes eventos: a) iniciación, b) promoción, c) progresión, e d) invasión y metástasis, que son los pasos del proceso de carcinogénesis (Barrera *et al.*, 2003; Feregrino-Pérez, 2008).

2.7.2 Proceso de carcinogénesis

La carcinogénesis es un proceso complejo de varios pasos, involucrando una gran cantidad de eventos que ocurren a nivel celular, molecular y morfológico. El proceso entero puede ser dividido en varias etapas principales iniciación, promoción, progresión, invasión y metástasis. La definición exacta de cada etapa podrá ser posible sólo cuando se conozca precisamente los puntos clave que abarca cada etapa. La velocidad con que el proceso de carcinogénesis se desarrolla está dada por los agentes mutagénicos (iniciadores tumorales), así como por ciertos agentes no mutagénicos (promotores tumorales), los cuales afectan a la expresión genética, estimulan la proliferación celular y alteran el equilibrio homeostático de las células mutadas y no mutadas (Mathers, 2002; Feregrino-Pérez, 2008).

Los promotores tumorales pueden ocasionar cáncer con una frecuencia alta sólo si se aplican después de un tratamiento con un indicador mutagénico. Los cambios producidos por un iniciador tumoral son irreversibles en la mayoría de los casos y se pueden poner de manifiesto mediante tratamiento con un promotor tumoral, incluso después de un largo intervalo de tiempo. Por otra parte, el efecto inmediato del promotor es: a) estimular la división celular, b) la exposición previa al iniciador provoca el crecimiento a partir de una célula mutada, los promotores pueden ser exógenos como el humo del cigarro o endógenos como ciertas hormonas; la progresión abarca varias etapas en el proceso de carcinogénesis: conversión, invasión y metástasis; c) conversión celular, convierte las células hasta entonces premalignas en malignas a través de un proceso multifocal donde unas se transforman más rápido que otras; d) estimulación de la angiogénesis, a través de la inducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos, para la obtención de los nutrientes y el oxígeno necesario; e) invasión y metástasis, la célula de un tumor es capaz de debilitar

la adhesión a sus vecinas originarias, escapar del tejido de origen y refugiarse en otros tejidos (Mathers, 2002; Feregrino-Pérez, 2008).

2.8 Cáncer de colon

El cáncer de colon es una enfermedad maligna que en países desarrollados tiene mayor incidencia debido al tipo de dieta que ingieren (pobre en fibra dietética y rica en grasa) (Casimiro, 2002; Feregrino-Pérez, 2008). En los Estados Unidos de América se diagnostican aproximadamente 142 000 nuevos pacientes de cáncer de colon cada año y genera 57 000 muertes anuales, lo que representa la tercera causa más común de cáncer y ocupa la segunda causa de muerte en el norte de América (Michels, 2005; Feregrino-Pérez, 2008). En México, existe un claro ascenso con marcada diferencia entre los estados del norte de la República, donde la tasa de mortalidad estandarizada oscila entre 1.11 y 1.7 por cada 1 000 000 de habitantes. En el año 2012 el INEGI reportó que el cáncer de colon representa el 5.3 y el 4.3% de muertes por los diferentes tipos de cáncer, para hombres y mujeres, respectivamente (Feregrino-Pérez, 2008; INEGI, 2012).

El cáncer de colon es un proceso multifactorial influenciado por factores ambientales, genéticos y epigenéticos (Won *et al.*, 2004; Feregrino-Pérez, 2008). Se conoce poco sobre el mecanismo de control de la diferenciación celular y la homeostasis a lo largo de las criptas colónicas, no obstante, se cree que las alteraciones que tienen lugar durante la transformación neoplásica ocurren en estadios del proceso de diferenciación, donde las células deben decidir su destino en el tejido: continuar con el compartimiento proliferativo versus transitar hacia el comportamiento terminal diferenciado (Feregrino-Pérez, 2008).

Se conocen dos formas fundamentales de cáncer de colon: esporádico y hereditario. La mayoría de tumores colorrectales son considerados como tumores esporádicos, lo cual demuestra que existe un riesgo ambiental muy elevado que incide directamente sobre el desarrollo de este tipo de cáncer (Potter, 1999; Feregrino-Pérez, 2008). Las formas hereditarias de cáncer de colon más conocidas son la Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP) y el cáncer de colon hereditario no polipoideo (HNPCC), debida a alteraciones genéticas transmitidas por línea germinal (Feregrino-Pérez, 2008).

La transformación tumoral se inicia en la mucosa colónica a nivel de las criptas. Durante la progresión tumoral, las células neoplásicas atraviesan la membrana basal e infiltran la capa muscular propia y la serosa. El cáncer de colon tiene escasa tendencia al crecimiento longitudinal, excepto si existe infiltración perineural que permite la diseminación a través de la pared intestinal, en algunas ocasiones más allá de 10 cm del tumor primario. En el colon, el crecimiento se produce hacia el mesocolon y la capa serosa peritoneal, pudiendo invadir órganos y tejidos adyacentes al espacio retroperitoneal (Feregrino-Pérez, 2008).

El cáncer de colon se desarrolla a través de etapas bien definidas a nivel histológico, que van desde lesiones en la cripta del colon a la formación de pólipos o adenomas hasta la manifestación del cáncer (Feregrino-Pérez, 2008).

El adenoma, es una neoplasia benigna que tiene lugar en las criptas colónicas, caracterizada por una actividad mitótica continua, donde las células no se diferencian, de manera que el compartimiento proliferativo puede llegar a ocupar la cripta completa. Dentro de los tipos histológicos de cáncer de colon, los adenocarcinomas son los más frecuentes, y se pueden clasificar en tres grados: bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados. Los tumores diferenciados mantienen la estructura glandular con la polaridad del núcleo conservada, semejando el epitelio adenomatoso displásico. Los pobremente diferenciados, por el contrario, son estructuras sólidas con pérdida de la polaridad y gran pleomorfismo del núcleo. Sin embargo, la división en grados histológicos tiene como principal limitación la subjetividad, ya que dicha clasificación depende, en gran medida, del criterio específico del patólogo. Los adenocarcinomas mucinosos representan el 17% de los tipos de cáncer de colon y están caracterizados por la acumulación de mucinas en el espacio extracelular. Normalmente, este tipo de tumores tiene un peor pronóstico que los no mucinosos. Un subtipo especialmente agresivo, aunque poco frecuente, es el adenocarcinoma de células en “anillo de sello”, caracterizado por la típica acumulación de mucinas intracitoplasmáticas que desplazan el núcleo a un extremo de la célula. Otros tipos de cáncer de colon muy frecuentes son: el carcinoma de células pequeñas (mucho más agresivo que el

adenocarcinoma y con tendencia a generar metástasis linfática y hepáticas) y el carcinoma adenoescamoso (Duval y Hamelin, 2002; Feregrino-Pérez, 2008).

La secuencia adenoma-carcinoma se caracteriza por la acumulación de múltiples mutaciones que afectan a tres tipos diferentes de genes: a) los protooncogenes, cuya función es regular positivamente la proliferación celular y cuya activación constitutiva promueve la transformación tumoral; b) los genes supresores tumorales, que regulan negativamente la proliferación celular y cuya pérdida de función también promueve la carcinogénesis; y finalmente c) los genes reparadores del ADN, responsables de corregir los errores producidos durante la replicación del ADN y reparar las alteraciones inducidas en esta molécula por agentes mutagénicos externos (radiaciones UV, agentes químicos, entre otros). Las alteraciones en este tipo de genes conducen a la aparición de mutaciones múltiples en el genoma (lo que se conoce como fenotipo mutador) (Duval y Hamelin, 2002; Feregrino-Pérez, 2008) y termina afectando a los oncogenes y genes supresores tumorales, contribuyendo a la carcinogénesis. A esta última categoría de genes, podría añadirse los genes implicados en puntos de control del ciclo celular, cuyo estudio ha revelado que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Nigg, 2001; Feregrino-Pérez, 2008). Cada uno de estos eventos mutacionales confiere a las células del tumor una ventaja de crecimiento de forma consecutiva, que trae como resultado la expansión clonal en etapas múltiples y al final la progresión del tumor (Feregrino-Pérez, 2008).

Los avances en la biología molecular y en concreto el estudio de las neoplasias, ha permitido establecer posibles vías moleculares por las que se produce la oncogénesis colorrectal (Grife *et al.*, 1998; Feregrino-Pérez, 2008).

Una de estas vías se ha desarrollado a partir de estudios realizados en los tumores benignos llamados pólipos, que se consideran precursores del cáncer de colon. Estos pólipos forman una masa protuberante que emerge hacia la luz intestinal. Su progresión resulta un proceso en etapas con alteraciones en genes supresores y oncogenes, desarrollado lentamente durante varios años (Sasaki *et al.*, 2000; Feregrino-Pérez, 2008).

2.9 Modelos de estudio *in vivo*

Los modelos de estudio *in vivo* proporcionan una herramienta única para estudiar la biología del proceso de la enfermedad (Bird y Good, 2000). La rata es el animal que se ha usado comúnmente como un modelo experimental para estudiar la etiología del cáncer de colon, debido a que el desarrollo de este tipo de cáncer muestra semejanza con los seres humanos en la historia natural de la enfermedad (Alabaster *et al.*, 1996).

Existe una gran variedad de modelos animal, en donde son empleados distintos carcinógenos, la mayoría utiliza azoximetano (AOM), un potente carcinógeno el cual induce cáncer de colon con una alta incidencia en ratas y ratones (Takahashi y Wakabayashi, 2004).

En el pasado, la valoración de sustancias carcinógenas fue en base a la incidencia de tumores. Sin embargo, el desarrollo de tumores es un proceso relativamente lento ya que se necesitan de 6 a 8 meses para generarlos en modelos de ratas utilizando DMH (1,2 dimetilhidracina) o AOM; por lo cual, las lesiones preneoplásicas pueden ser un biomarcador útil para valorar el riesgo de desarrollar cáncer de colon o para identificar moduladores carcinogénicos colónicos en estudios a corto plazo. El uso de lesiones preneoplásicas como biomarcador no fue posible hasta 1987 cuando Bird (1987) desarrolló un método simple, rápido y barato para identificar las fosas cripticas aberrantes (FCA) (Perse y Cerar, 2011).

La elección más popular en los modelos *in vivo* son ratas macho de distintas cepas: F344, Sprague-Dawley o Wistar, de aproximadamente 5-6 semanas de edad, y de al menos 180 a 200 g de peso, dichos animales son inyectados subcutáneamente con dos dosis semanales de AOM de 15 mg/Kg de peso (Raju, 2008). Una vez que el AOM es inyectado viaja vía vena porta al hígado, en donde por medio de las enzimas citocromo P-450 es convertido a metilazoximetanol (MAM); el MAM es conjugado con ácido glucurónico, mediante la enzima UDP-glucuroniltransferasa, pasando al tracto digestivo para eliminarse por heces; en el colon puede ser desconjugado por la acción de la enzima de origen microbiano β -glucuronidasa, liberando formalina y el ion metildiazonio. El ión metildiazonio parece ser el compuesto carcinógeno final responsable de la metilación de

ADN (principalmente las bases guanina y timina), promoviendo el desarrollo del cáncer de colon, primeramente generando las lesiones denominadas FCA, seguido de la formación de adenomas (Montenegro *et al.*, 2003).

Las FCA son las primeras lesiones en el desarrollo del cáncer de colon que pueden ser identificadas microscópicamente sobre la superficie de la mucosa colónica después de teñir el tejido con azul de metileno. Dichas lesiones han sido identificadas en roedores tratados con carcinógenos conocidos y en humanos con alto riesgo de desarrollar cáncer de colon (que presentan historial clínico). Vale la pena señalar que numerosos estudios en roedores y humanos, incluyendo análisis molecular, han demostrado que las FCA son un biomarcador valioso e intermediario en el desarrollo del cáncer de colon. Hasta la fecha las FCA han sido utilizadas como un *endpoint* en la identificación de compuestos farmacológicos o naturales que puedan funcionar como agentes promotores o preventivos; asimismo, son útiles en el análisis de factores ambientales y dietéticos que puedan estar involucrados en el proceso del cáncer de colon (Perse y Cerar, 2011).

Un gran número de estudios ha demostrado que las FCA en animales y humanos son un grupo heterogéneo de lesiones que contienen alteraciones genéticas, epigenéticas y fenotípicas (Perse y Cerar, 2011). Histológicamente, las FCA exhiben diversas características que van de displasia atípica, media a severa. La mayoría de las FCA presentan características hiperplásicas mientras que un pequeño subgrupo contiene neoplasia intraepitelial (Perse y Cerar, 2011). Se ha demostrado que las FCA que poseen hiperplasia presentan diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas que las FCA con displasia, y algunos estudios sugieren que las FCA que poseen hiperplasia no pueden ser directamente relacionadas con tumorigénesis (Perse y Cerar, 2011). Sin embargo, existen algunos reportes que sugieren que algunas FCA con características hiperplásicas pueden progresar a FCA con displasia (Perse y Cerar, 2011).

El modelo de cáncer de colon inducido por AOM presenta frecuentes alteraciones genéticas, tal es el caso de los genes *K-ras* y *β-catenina* que presentan mutaciones puntuales en FCA con hiperplasia y displasia, respectivamente. Con respecto al gen *K-ras*, AOM induce una transición de G→A en el codón 12 y puede contribuir a la inducción de cambios hiperplásicos; mientras que *β-catenina* sufre una misma transición G→A en los

codones 32, 33, 34 y 41, y parece que está involucrada en la generación de FCA con displasia. La mutación de *K-ras* activa las rutas metabólicas MAPK y PI3K, la sobre expresión de *ciclina D1* y *COX-2* (ciclooxigenasa 2), y también incrementa la expresión de *iNOS* (óxido nítrico sintetasa inducible) con la presencia de estimulación inflamatoria. Por su parte, las mutaciones de *β-catenina* estabilizan la proteína en el citoplasma y activan la transcripción de los blancos de la señalización de *β-catenina/Tcf*, como *ciclina D1* y *c-myc*. La alteración *β-catenina* también puede estar involucrada en el incremento de la expresión *iNOS*. El óxido nítrico (NO) producido por *iNOS* causa daño en el ADN y neovascularización, asimismo puede influir en la sobre expresión de *COX-2*. La sobre expresión de *COX-2* produce un exceso de prostaglandinas, causando un incremento en la proliferación celular y disminución de la apoptosis, en cierta medida modulada por *EP₁₋₄*, subtipos de los receptores de la prostaglandina E₂ (PGE₂) (Takahashi y Wakabayashi, 2004).

III. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día no existe un tratamiento eficiente que permita controlar o eliminar el desarrollo de cáncer de colon; no obstante, el consumo de alimentos ricos en carbohidratos indigestibles (componente mayoritario de la fracción FD) ha sido recomendado para prevenir su desarrollo, sobre todo aquellos alimentos ricos en FD soluble, ya que se ha observado que existe una relación positiva entre la presencia de estos constituyentes y la proliferación celular de la mucosa colónica, debido a que representan un sustrato potencial de fermentación por la microbiota intestinal, produciendo AGCC (acético, propiónico y butírico), de los cuales, el ácido propiónico y butírico, han sido relacionados con la protección de esta enfermedad.

La linaza es un alimento rico en FD soluble que ha cobrado mucha popularidad en estos últimos años debido a su carácter nutracéutico. En México, la linaza es consumida como parte de la formulación de algunos productos de panificación y de cereales para desayuno. El consumo de linaza ha sido recomendado para prevenir el desarrollo de cáncer colon por su fracción de lignanos y no por su contenido de FD. Sin embargo, la linaza como alimento que posee una cantidad significativa de FD soluble, constituyente nutracéutico el cual no se ha evaluado si puede ejercer un efecto quimioprotectivo contra neoplasias colónicas a la dosis de consumo recomendado (dos cucharadas de linaza por día, tomando en cuenta que cada cuchara aporta aproximadamente 8 g de linaza).

En base a esto, es importante evaluar el efecto quimioprotector de la fibra dietética de la linaza en estadios tempranos de cáncer colónico inducido químicamente con azoximetano por medio de un modelo animal. Asimismo, analizar dicho efecto quimiopreventivo a nivel transcriptómico con la finalidad de observar que genes fueron los que se reprimieron o sobre expresaron con la administración de linaza a la dosis de 16 g/Kg.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto quimioprotector de la linaza sobre estadios tempranos de cáncer de colon en un modelo animal.

4.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar las muestras de linaza: análisis químico proximal y evaluación de compuestos fenólicos, así como de su capacidad antioxidante.
2. Extraer y caracterizar parcialmente la fracción no digerible total (FNDT) de linaza y determinar el índice de bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de las muestras en estudio (linaza y su FNDT).
3. Evaluar el efecto quimioprotector de la semilla de linaza y de su FNDT sobre estadios tempranos de cáncer de colon en ratas inducidas químicamente con azoximetano.
4. Analizar si los tratamientos (linaza y su FNDT) pueden afectar la expresión de algunos genes asociados al desarrollo de cáncer de colon, como *p53*, *p21*, *rb*, *bax* y *caspasa-3*.

V. HIPÓTESIS

La dosis de dos cucharadas (16 g) de linaza (*Linum usitatissimum* L.) disminuye significativamente el número total y multiplicidad de fosas cripticas aberrantes (FCA) en ratas inducidas químicamente con azoximetano.

La disminución del número de FCA, y/o multiplicidad, se debe a la fermentación de la fibra dietética soluble, ya que este proceso fisiológico está relacionado con la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), disminución del pH, decremento de la actividad de β -glucoronidasa, lo cual influye sobre la expresión de genes asociados al desarrollo de cáncer de colon.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico y preparación de muestras

Para el modelo animal se emplearon 80 ratas macho Sprague Dawley recién destetadas de 4 semanas de edad que fueron adquiridas por Harlan Sprague Dawley, Inc. Las condiciones en las cuales se mantuvieron los animales fueron las siguientes: en jaulas metálicas, ciclos de luz-oscuridad 12/12 y con agua y alimento *ad libitum*.

Cinco diferentes lotes de linaza comercial fueron analizados: lote L3569= LN1, lote L107= LN2, lote L3163= LN3, lote L03= LN4, lote L02= LN5. Las muestras de linaza fueron adquiridas en Nutrisa, SA de CV (México, Distrito Federal) y almacenadas a 4 °C hasta su procesamiento.

Una vez adquiridas las muestras, éstas fueron molidas con un molino para café (modelo GX410011, KRUPS, México) y en seguida se pasaron por una malla para conseguir un tamaño de partícula igual o menor 0.42 mm, posteriormente las muestras fueron sometida un proceso de secado a 50 °C toda la noche en un horno con flujo de aire (modelo 1675, SHEL LAB, USA) (Martínez-Flores *et al.*, 2006). Todo lo anterior se realizó para obtener harinas de linaza, las cuales fueron almacenadas a 4 °C en frascos ámbar para protegerlas de la luz.

6.1 Compuestos químicos

La α -amilasa porcina, pepsina, lipasa porcina, extracto de bilis porcino, ácido tánico, el reactivo Folin-Ciocalteu, el carcinógeno azoximetano (AOM) y el ácido butírico fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., (USA).

El persulfato de amonio y azul de metileno se adquirieron de Bio Rad. El KCl, acetona, ácido clorhídrico, metanol, ácido acético, propiónico y formico, entre otras sustancias químicas fueron de la marca J.T. Baker (México City, México). Los oligonucleotidos para

amplificar los genes *p21*, *p53*, *bax*, *bcl-2*, *rb*, *caspasa 3* y *gliceraldehido fosfato deshidrogenasa* fueron adquiridos de la marca Accesolab.

6.3 Caracterización de las muestras en estudio

6.3.1 Análisis químico proximal

El contenido de cenizas, humedad, proteína y lípidos fue determinado utilizando las metodologías descritas por la Asociación Americana de Químicos Analistas (AOAC, 2002).

- a) Determinación de cenizas (Técnica No. 945.46)
- b) Determinación de humedad (Técnica No. 925.23)
- c) Cuantificación de proteína (Técnica No. 920.15)
- d) Cuantificación de lípidos (Técnica No. 920.39)

Finalmente, para cuantificar proteína se utilizó el factor de conversión 6.25.

6.3.2 Extracto metanólico

Los compuestos fenólicos fueron extraídos mediante la metodología propuesta por Cardador-Martínez *et al.* (2002). Brevemente, 1g de muestra fue colocados en un matraz Erlenmeyer de 25 mL con 10 mL de metanol. Protegiendo la muestra de la Luz, ésta fue agitada a 40 rpm por 24 h a 25 °C. Al final del proceso, la muestra fue centrifugada a 5000 rpm por 10 min para obtener el extracto metanólico (EM).

6.3.3 Cuantificación de taninos condensados

Para cuantificar los taninos condensados (TC) se utilizó el protocolo propuesto por Feregrino-Pérez *et al.* (2008). Brevemente, 200 µl de una solución 1:1 de vanilina 1% HCL 8% se hicieron reaccionar con 50 µL del EM en cada uno de los pozos de la microplaca. Las absorbancias fueron leídas a 492 nm y después interpoladas en una curva estándar de (+)-catequina (0-0.8 mg/mL). Los resultados fueron reportados como miligramos equivalentes de (+)-catequina por gramos de muestra seca (mg eq Cat/g).

6.3.4 Cuantificación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales fue analizado por el método espectrofotométrico propuesto por Oomah *et al.* (2005). El método consistió en mezclar 50 μL del EM con 180 μL de metanol y 20 μL de una solución de 2-aminoetilfenilborato al 1% en los pozos de la microplaca. Una curva estándar de rutina (0-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fue utilizada para interpolar las absorbancias leídas a 404 nm. Por lo tanto, los resultados fueron expresados como microgramos equivalentes de rutina por gramo de muestra seca ($\mu\text{g eq Rut}/\text{g}$).

6.3.5 Cuantificación de compuestos fenólicos totales

La cuantificación de los compuestos fenólicos totales realizó por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). 50 μL del EM se hicieron reaccionar con 125 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, 625 μL de carbonato de sodio al 20% y 250 μL de agua destilada. Las absorbancias fueron analizadas a 760 nm y se interpolaron en una curva estándar de ácido ferúlico (0-16 μg de ácido ferúlico). Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido ferúlico por gramo de muestra seca ($\text{mg eq Fer}/\text{g}$).

6.3.6 Determinación de la capacidad antioxidante por la inhibición del radical ABTS^{•+}

Para este caso fue utilizada la metodología propuesta por Nenadis *et al.* (2004) la cual se describe a continuación: el radical ABTS se preparó haciendo reaccionar 5 mL de una solución acuosa de ABTS 7mM y 88 μL de una solución de persulfato de potasio 140 mM. La mezcla fue almacenada en la oscuridad por al menos 12 h. La solución del radical cationico fue diluida con etanol hasta obtener una absorbancia inicial de 0.7 ± 0.05 a 734 nm. 500 μL de la solución ABTS y persulfato de potasio se mezclaron con 25 mL de etanol para ajustar la absorbancia entre 0.7 y 1, estos valores se verificaron a 734 nm. Después de haber ajustado la absorbancia de la solución de ABTS, 20 μL del EM se hicieron reaccionar con 230 μL de ABTS; al mismo tiempo se preparó un control, constituido por 230 μL de ABTS y 20 μL de metanol. La disminución de la absorbancia fue monitoria a 734 nm a los 0, 6, 10, 30, 60 y 90 min.

La CA fue calculada por dos métodos diferentes, en términos de equivalentes de trolox y como porcentaje de actividad antirradical [AA (%)]; a continuación serán descritos.

Para medir la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC, por sus siglas en idioma inglés) se utilizó trolox como referencia (50-800 μM). Por otra parte, El porcentaje de actividad antirradical [AA (%)], fue calculado empleando la siguiente fórmula propuesta por Burda y Oleszek (2001):

$$\text{AA (\%)} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del control}} \right]$$

Por lo tanto, los resultados fueron reportados como porcentaje de actividad antirradical, y en micromoles equivalentes de trolox por gramo de muestra seca ($\mu\text{mol eq Trol/g}$).

6.3.7 Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo de FRAP

Para analizar la habilidad reductora de los EM se utilizó el ensayo de FRAP propuesto por Firuzi *et al.* (2005), pero con algunas modificaciones. Este ensayo analiza la capacidad de los antioxidantes de reducir el hierro (III) a hierro (II). Brevemente, 150 μL de la solución FRAP fue colocada en placa de 96 pozos; la cual se hizo reaccionar con 25 μL del EM y por separado con una solución conocida de Fe (II) (100-3000 μM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$); asimismo, como blanco se empleó agua destilada. La placa fue incubada a 37 $^\circ\text{C}$ y después se leyeron las absorbancias a 595 nm en los 0, 6, 10, 30, 60 y 90. Los resultados fueron expresados como micromoles equivalentes de sulfato ferroso por gramo de muestra seca ($\mu\text{mol eq FeSO}_4/\text{g}$).

6.3.8 Bioaccesibilidad *in vitro* de compuestos fenólicos

El método propuestos por Dinnella *et al.* (2007) fue adaptado para analizar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos presentes en las muestras de linaza y en su fracción no digerible total (FNDT). El método consistió en someter las muestras a un

proceso de digestión *in vitro*; cinco gramos de muestra fueron diluidos en 40 mL de agua destilada, en seguida el medio fue acidificado (pH 2) utilizando HCL 6N con agitación constante, posteriormente se adicionó 1.5 mL de una solución de pepsina porcina (Sigma Chem. Co. 3.8 unidades/mg de proteína, 160 mg/mL en HCl 0.1N) y se incubó la muestra a 37 °C por 2 h; terminada la reacción a la muestra se le agregó una solución de pancreatina-bilis (pancreatina 4 mg/mL, bilis 25 mg/mL en NaHCO₃ 0.1N) y se ajustó el pH a 7 con NaHCO₃ 0.9N. Al finalizar la reacción, las muestras fueron incubadas a 37 °C por 2 h; finalizado el tiempo de reacción se tomó una alícuota de 25 mL la cual fue centrifugada a 10,000 g por 25 min para obtener el sobrenadante (fase acuosa= FA), el volumen restante fue sometido a proceso de diálisis. El proceso de diálisis consistió en colocar el volumen restante (40-45 mL) en contacto con un tubo de diálisis de celulosa que contenía 25 mL de NaCl (9 mg/mL), la solución se mantuvo en agitación constante durante 1 h a 37 °C; pasado el periodo de diálisis, la solución salina que se colocó dentro del tubo de diálisis fue recuperada (fase dializada= D_{IN}), la cual representa la fracción bioaccesible de compuestos fenólicos.

Para obtener los extractos metanólicos (EM) se llevó a cabo una extracción en fase sólida empleando un cartucho de resina C18. El cartucho C18 se activó con metanol (5 mL) y agua destilada (5 mL). De la D_{IN} y FA se tomaron 2 mL y se hicieron pasar por la resina; después, las impurezas fueron eliminadas pasando 10 mL de agua acidificada (H₂SO₄ 0.01N), recuperando los compuestos fenólicos con 2 mL de metanol. Para la FA, previo a la recuperación de los compuestos fenólicos con 4 mL de metanol, las impurezas fueron eliminadas pasando 10 mL de hexano y después 10 mL de agua ácida. Una vez obtenidos los EM de las diferentes fases (D_{IN} y FA, respectivamente) se procedió a determinar el contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y taninos condensados; igualmente la CA fue analizada, pero únicamente por el método de ABTS.

Ecuaciones que se utilizaron para obtener los valores de la concentración de la muestra en equilibrio (muestra eq) y el índice de bioaccesibilidad expresado como porcentaje (IB%).

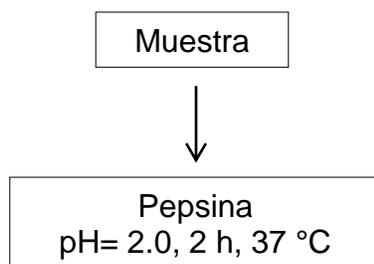
$$\text{Muestra eq} = \frac{(\text{Conc IN} * \text{Volumen FA})}{(\text{Volumen FA} + \text{Volumen DIN})}$$

Donde **Conc IN** es la concentración inicial obtenida de la muestra en el volumen final de reacción (70-75 mL); **Volumen FA** indica el volumen de la FA empleado en el proceso de diálisis (45-47 mL); **Volumen DIN** representa el volumen de solución salina colocado en el tubo de diálisis, el cual fue en todos los caso de 25 mL.

Una vez obtenido el valor muestra eq del sistema, el siguiente paso fue calcular los valores de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT), taninos condensados (TC) y capacidad antioxidante (CA) utilizando los métodos ya descritos para predecir el IB% y el CA_{DIN}% usando la siguiente ecuación:

$$IB\% = \frac{(DIN * 100)}{(FA + DIN)}$$

$$CA_{DIN}\% = \frac{(FA * 100)}{(DIN + FA)}$$



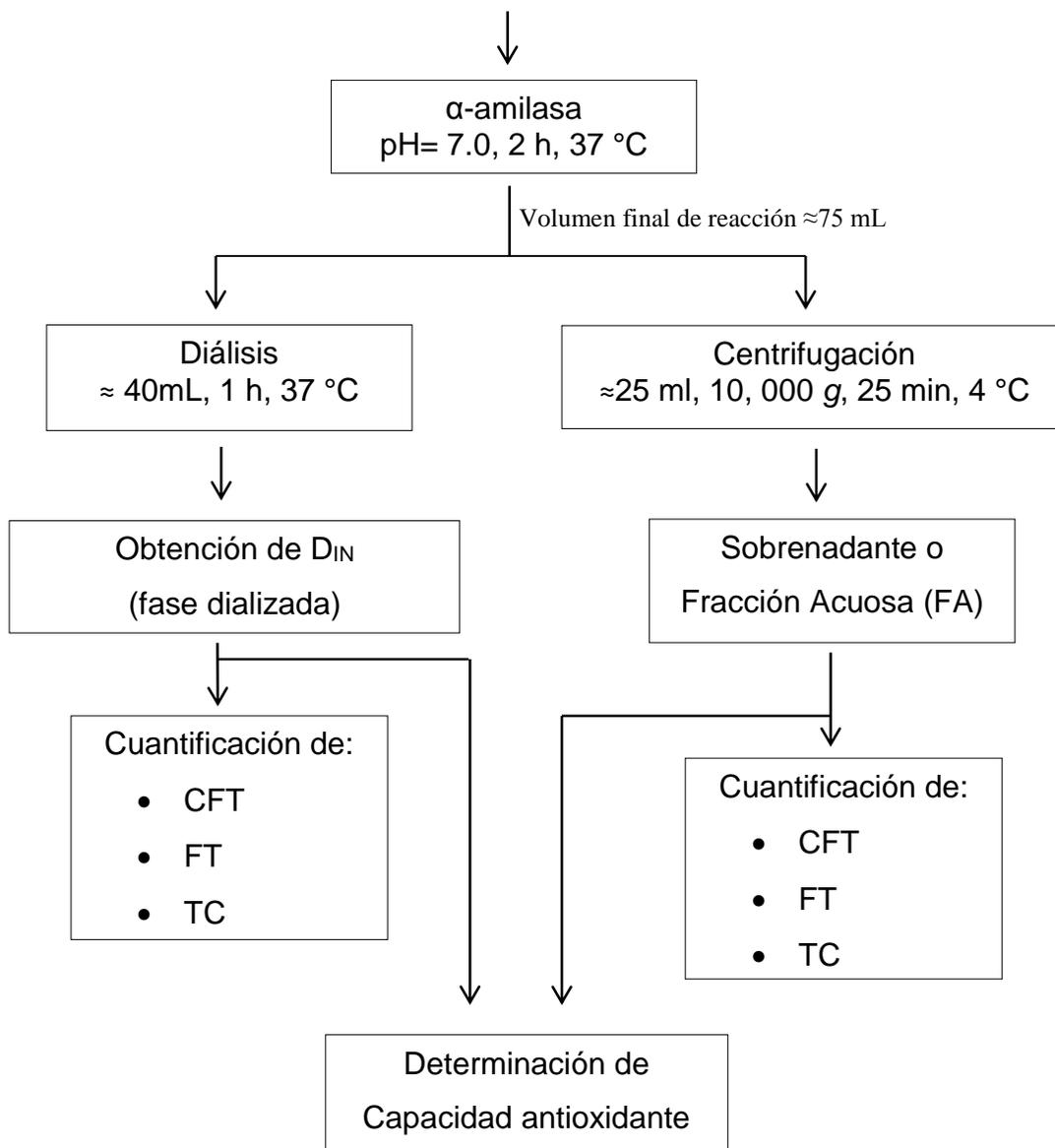


Figura 6.1 Estrategia experimental para determinar el índice de bioaccesibilidad. Después del tratamiento enzimático, la fase acuosa (FA) y dializada (D_{IN}) fueron obtenidas para analizar el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT) y taninos condensados (TC); además, se analizó la capacidad antioxidante por ABTS.

6.3.9 Fracción indigestible (FI)

Para cuantificar la fracción indigestible (FI) fue utilizado el método propuesto por Saura-Calixto *et al.* (2007), con algunas modificaciones. Las muestras fueron incubadas

con enzimas digestivas para simular la digestión en el intestino delgado. Brevemente, 300 mg de muestra fueron incubados con pepsina (EC 3.4.23.1, 0.2 mL de una solución de 300 mg/mL en buffer de HCl-KCl 0.2 M; pH 1.5, 40 °C, 1 h, Sigma P-7012), pancreatina (1 mL de una solución de 5 mg/mL en buffer de fosfatos de sodio 0.1 M; pH 7.5, 37 °C, 6 h, Sigma P-1750), lipasa (EC 3.1.1.3, 2 mL de una solución de 7 mg/mL en buffer de fosfatos 0.1 M; pH 7.5, 37 °C, 6 h, Sigma L-3126), extracto porcino de bilis (2 mL de una solución 17.5 mg/mL en buffer de fosfatos 0.1 M; pH 7.5, 37 °C, 6 h, sigma B-8631) y α -amilasa (EC 3.2.1.1, 1 mL de una solución de 120 mg/mL en buffer 0.1 M; pH 6.9, 37 °C, 1 h, Sigma A-3176). Después, las muestras fueron centrifugadas (15 min, 25 °C, 3000 g) y los sobrenadantes fueron removidos. Los residuos fueron lavados dos veces con 5 mL de agua destilada y posteriormente centrifugados para combinar los sobrenadantes. Los residuos fueron secados (105 °C, 16 h) y cuantificados gravimétricamente como FI insoluble. Por otro lado, los sobrenadantes fueron dializados (tubos de diálisis con tamaño de poro 12, 000-14, 000 MWCO) en agua (flujo de 7 L/h) a 25 °C por 48 h. El dializado (lo retenido en el tubo de diálisis) fue hidrolizado con ácido sulfúrico concentrado a 100 °C por 90 min, cuantificando la FI soluble con ácido dinitrosalicílico (Englyst y Cummings, 1988). El contenido de FI total fue obtenido sumando los valores de las tres repeticiones de FI soluble e insoluble.

6.3.10 Extracción de la fracción no digerible total (FNDT)

Para este método se utilizó el protocolo propuesta por Kurtzman y Halbrook (1970). A 300 g de harina de linaza (muestra LN1) se le adicionaron 1.5 L de agua y se agitó por 1 min. Después, se centrifugó y al precipitado se le adicionó 100 ml de ácido tánico al 10% ajustando el pH a 4. Después, la muestra fue agitada durante 5 min y centrifugada a 9, 000 g/10 min. Al precipitado se le adicionó un total de 300 mL de acetona en una serie de 3 lavados, cada uno de 100 mL; posteriormente, la muestra fue homogenizada y centrifugada a 9 000 g/min, en cada lavado. El precipitado obtenido fue la fracción no digerible total (FNDT). La FNDT fue parcialmente caracterizada. La composición química proximal fue analizada mediante las metodologías oficiales de la AOAC (2002). Por otro lado, el contenido de TC, CFT y FT fue cuantificado por los

métodos espectrofotométricos ya mencionados; igualmente, la CA fue determinada por el método de ABTS.

6.4 Etapa experimental *in vivo*

Una vez obtenida y caracterizada la FNDDT se procedió a realizar el ensayo biológico. Ochenta ratas macho de la cepa Sprague Dawley fueron utilizadas para el modelo animal, a los cuales se les dio una semana de adaptación previa a la formación de los 6 grupos experimentales (n= 12). Los animales recibieron agua y alimento *ad libitum* y los tratamientos (Linaza y FNDDT) fueron administrados durante 9 semanas vía sonda intragástrica (Figura 6.2).

A partir de la primera semana de tratamiento el consumo de agua, alimento y la ganancia de peso de las ratas fue registrada semanalmente. También las heces fueron recolectadas de cada uno de los grupos a la semana 3, 7 y 10; simultáneamente, las heces fueron congeladas con nitrógeno líquido y almacenado a -70 ° C hasta la determinación de los AGCC y la actividad de la enzima β -glucuronidasa. Al final del periodo experimental, los animales fueron sacrificados y posteriormente se realizó el análisis histológico de la zona distal del colon para la cuantificación de fosas cripticas aberrantes (FCA), expresando los resultados como número total y multiplicidad de las criptas.

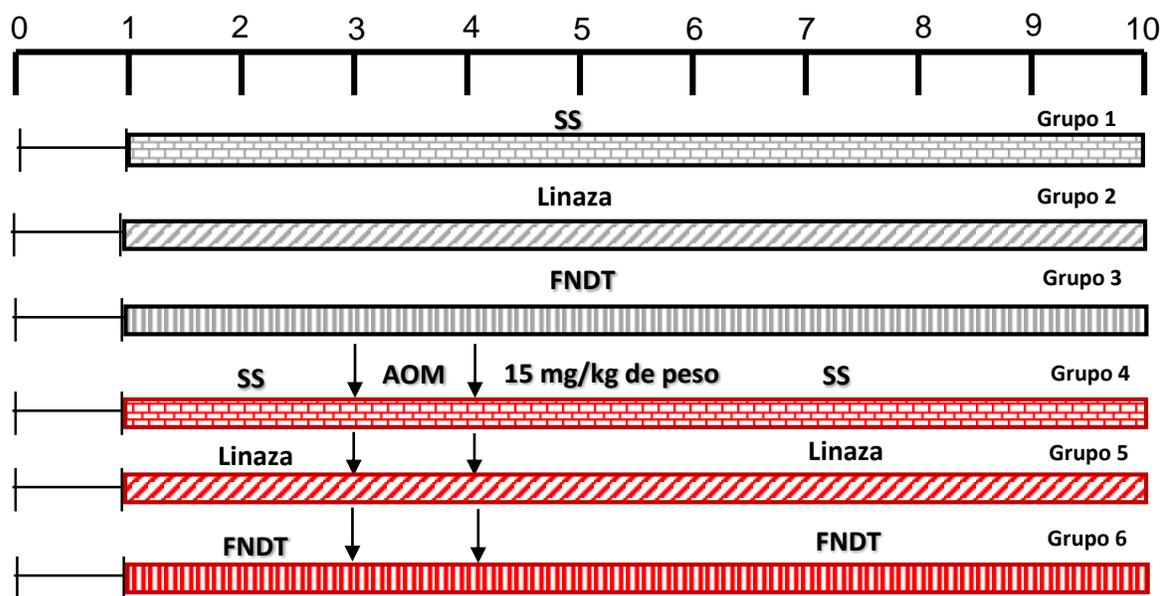


Figura 6.2 Estrategia experimental *in vivo*. SS= solución salina, FNDT= fracción no digerible total, AOM= azoximetano.

6.4.1 Medición del pH

El pH del contenido cecal, colónico y fecal fue medido empleando el procedimiento descrito por Nakanishi *et al.* (2003). Brevemente, un gramo del contenido cecal, colónico o heces fue suspendido en agua (5 veces su volumen); posteriormente la muestra fue homogenizada y el pH fue medido.

6.4.2 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Para determinar el perfil y la concentración de AGCC en el contenido cecal, colónico y fecal fue empleado el protocolo descrito por Zhao *et al.* (2006) pero con algunas modificaciones. Brevemente, un gramo de contenido cecal, colónico y fecal fue suspendido en agua (5 veces su volumen) y homogenizado. La suspensión fue centrifugada a 8 000 *g* por 10 min a 4 °C; posteriormente, el pH fue ajustado (2-3) con HCl 0.1 M. Por último, la

solución fue filtrada con una membrana (0.45 μm) e inyectada en un cromatógrafo de gases (Hp 6890 Plus, acoplado a un detector de flama).

El volumen de muestra inyectado fue de 1.5 μL . La columna fue la siguiente: Hp 30 M, CARBOWAX 30 M; 25.0 M X 320 μM X 0.30 μm nominal. Como gas acarreador fue utilizado helio a un flujo de 0.5 mL/min. La temperatura inicial del horno fue de 95 $^{\circ}\text{C}$, la cual fue mantenida por 2 min y elevada a 140 $^{\circ}\text{C}$ a 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Los ácidos acético, propiónico y butírico fueron empleados como estándares externos (0-100 mM/mL) para cuantificar los AGCC de las muestras.

6.4.3 Determinación de la actividad de β -Glucoronidasa.

La actividad total de la enzima β -glucoronidasa fue determinada empleando el conjugado β -D-glucoronido de fenoltaleína como sustrato, donde la enzima presente en la muestra lo hidroliza y la fenoltaleína liberada fue monitoreada a una longitud de onda de 540 nm (Jenab *et al.*, 1999).

Brevemente, a 0.5 g de contenido fecal se le adicionaron 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.02 M a pH de 7.0. Ésta solución fue homogenizada por medio de un politrón y posteriormente sonicada durante 6 min a 4 $^{\circ}\text{C}$. Las muestras fueron centrifugadas a 500 g por 15 min recolectando el sobrenadante para llevar a cabo el ensayo enzimático. Para la mezcla de reacción se tomaron 800 μL de PBS 0.02 M, 100 μL de β -D-glucurónido de fenoltaleína 1 nM y 100 μL de extracto fecal. Esta mezcla se incubó por 1 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Al finalizar la incubación, se adicionó 2.5 mL de solución de glicina alcalina, 1 mL de ácido tricloroacético al 5% y 1 mL de agua HPLC, se mezcló e incubó por 10 min a temperatura ambiente, enseguida la absorbancia fue medida a 540 nm. La relación de fenoltaleína liberada fue determinada en base a una curva estándar de fenoltaleína (0-13 μg) (Jenab *et al.*, 1999). La actividad enzimática total de la β -glucoronidasa fue expresada en nanomoles por minuto por gramo de contenido fecal empleando la siguiente ecuación:

$$\text{N mol/min/g de contenido} = \frac{\mu\text{g fenolftaleína}}{(\text{PM})(\text{g muestra})} \times 100$$

Donde: $\mu\text{g fenolftaleína}$, son los μg de fenolftaleína liberada, 100 es el factor de dilución, PM, es el peso molecular de la fenolftaleína y g muestra, son los gramos del contenido cecal, colónico o heces.

6.4.4 Análisis de fosas crípticas aberrantes (FCA)

El análisis y cuantificación del sistema de FCA se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Bird (1987) mediante una tinción de azul de metileno. Brevemente, a los animales sacrificados se les disectó el colon, el cual fue abierto longitudinalmente y lavado con una solución de fosfatos de potasio (20 mM) estéril y fría. El colón fue dividido en zona proximal (3 a 5 cm a partir de la base ciego-colon) y zona distal (7 cm a partir de la base anal). La parte entre la zona proximal y distal se consideró zona media del colon (Figura 6.3).

Una vez obtenidas las zonas colónicas de interés (proximal y distal), estas se fijaron en paraformaldehído 10% por 24 horas. Después de la fijación, el colon fue teñido con azul de metileno 0.2% por 10 minutos y posteriormente lavado con solución amortiguadora de fosfatos de potasio (20 mM) y agua destilada para quitar el excedente de azul de metileno. La zona distal fue analizada con un microscopio óptico con objetivo 20X. Las FCA fueron distinguidas del tejido normal por su deformidad en el tamaño y forma, agrandamiento hacía la mucosa superficial y agrupamiento de núcleos en la zona apical de la cripta colónica; todo esto de acuerdo al método usado por Bird (1987).

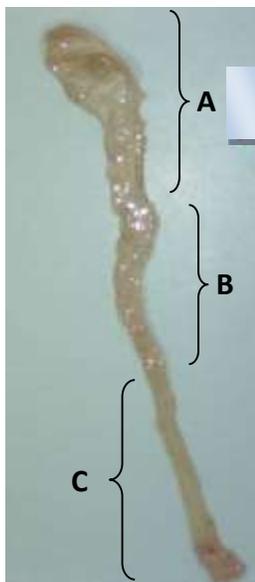


Figura 6.3 Fotografía representativa de las diferentes zonas de colon de rata. **A.** Zona proximal (ciego y parte del colon ascendente), **B.** Zona media (colon ascendente y porción del colon descendente) y **C.** Zona distal (colondescendente hasta el ano) (Feregrino-Pérez, 2008).

6.5 Análisis de la expresión de genes asociados al desarrollo de cáncer de colon

6.5.1 Extracción de RNA total

La extracción del RNA total se realizó acoplado los métodos de TRIzol® RNA Isolation Reagents (Life Technologies Corporation, Invitrogen™) y SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road Madison, WI 53711-5399 USA). A continuación se describe el proceso:

- 1) 100 mg de muestra fueron homogenizados con 1 mL de TRIzol®.
- 2) Posteriormente, la muestra fue incubada por 5 min a temperatura ambiente.
- 3) 200 µL de cloroformo fueron agregados por mL de TRIzol® utilizado.
- 4) La muestra fue agitada vigorosamente por 15 seg, enseguida, la muestra fue incubada de 2-3 min a temperatura ambiente.

- 5) Después, la muestra fue centrifugada a 13, 000 rpm/15 min a 4 °C.
- 6) La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo.
- 7) Sucesivamente, 350 µL de buffer de dilución (SV Total RNA Isolation System) fueron agregados a la fase acuosa. La muestra fue mezclada por inversión; asimismo, fue centrifugada a máxima velocidad durante 10 min.
- 8) El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo empleando una micropipeta cuidando de no resuspender el precipitado ya que es en donde se encuentran los desechos. El volumen del sobrenadante debe de ser de aproximadamente 500 µL. Nota: algunas veces los desechos forman una capa solida en la parte superior del sobrenadante.
- 9) 200 µL de etanol 95% fueron agregados y se mezclaron pipeteando de 3-4 veces. Dicha mezcla fue transferida a la columna (Spin Column Assembly). La mezcla fue centrifugada a 13, 000 rpm/1.5 min.
- 10) Enseguida, la canasta (spin basket) fue removida para retirar los desechos; volviéndose a colocar en la columna después de la operación señalada.
- 11) 600 µL de la solución de lavado fueron colocados en la columna; posteriormente la columna y la canasta fueron centrifugados a 13, 000 rpm/1.5 min.
- 12) Después, los desechos fueron removidos y a continuación se preparó la siguiente mezcla de reacción para cada extracción: 40 µL de yellow care buffer, 5 µL de MnCl₂ 0.09 M y 5 µL de DNase I. Nota: la mezcla es preparada en un tubo aparte y los reactivos se agregan siguiendo el orden previamente señalado; de igual modo, se mezcla cuidadosamente pipetiando la mezcla; finalmente, la Dnase I es descongelada en hielo.
- 13) La mezcla de reacción fue directamente colocada sobre la membrana de la columna. Es preciso cerciorarse de que la solución esté en contacto con toda la

superficie de la membrana. La solución es de color amarillo para facilitar este proceso.

- 14) La solución fue incubada por 15 min a 20-25 °C.
- 15) Pasado el tiempo de incubación, 200 µL de la solución Dnase stop fueron agregados en la columna y fueron centrifugados a 13, 000 rpm/1.5 min.
- 16) Ulterior a la centrifugación, se agregaron 600 µL de la solución de lavado (RNA wash solution) y la columna fue centrifugada a 13, 000 rpm/1.5 min; inmediatamente, la spin basket fue removida para retirar los desechos y a continuación 250 µL de la solución de lavado fueron añadidos para después centrifugar la columna a alta velocidad (13, 000 rpm) por 2 min.
- 17) La columna fue transferida a un tubo ependorf nuevo; después, se le colocó 100 µL de agua libre de nucleasas.
- 18) Inmediatamente, la columna fue centrifugada a 13, 000 rpm/1.5 min. Finalmente, la columna fue desechada y el RNA recolectado en el tubo ependorf fue almacenado a -70 °C; ipso facto, el RNA fue analizado para constatar su calidad.

6.5.2 Detección y análisis de la calidad del RNA

Para esta prueba se elaboró un gel de agarosa desnaturalizante de la siguiente forma:

Reactivos	Para 25 mL
Agarosa	0.3 g
MOPS 10X	2.5 mL
Formaldehido al 37%	0.75 mL
H ₂ O-DEPC	21.75 mL

La agarosa fue fundida en agua DEPC, después se dejó enfriar a 42 °C aproximadamente, enseguida se adicionó MOPS 10X, igualmente se adicionó el formaldehído y 0.5 µL de bromuro de etidio. La agarosa se vació en la cámara de electroforesis colocando el peine con el tamaño de pozo adecuado para el volumen de las muestras. Se esperó a que solidificara para retirar el peine y agregar a la cámara el regulador de corrida MOPS 1X, el cual se preparó a partir de MOPS 10X utilizando agua-DEPC para alcanzar la concentración ya mencionada. Posteriormente, las muestras de ARN fueron colocadas con el regulador de carga el cual proporciona mayor densidad a las muestras para que éstas permanezcan dentro del pozo, asimismo para observar el avance de la electroforesis.

6.5.3 Cuantificación del ARN

El ARN fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro (Termo scientific, NanoDrop 2000 spectrophotometer). Una vez que se conoció la concentración de ARN, se procedió a obtener la primera cadena de ADN empleando el método de la transcriptasa reversa o RT por sus siglas en idioma inglés.

6.5.4 Obtención de cDNA

La obtención del cDNA o ADN de cadena complementaria se realizó utilizando el Kit enzimático diseñado por FERMENTAS (First Strand cDNA Synthesis Kit #K1612) a partir de 3 µg de ARN, el cual se describe a continuación:

- 1) Los siguientes reactivos fueron mezclados en un tubo para PCR:

Reactivos	Para 1 reacción (1 Rx)
Oligo dT	1 µL
RNA	1 µg
Agua libre de nucleasas	11 µL

Vol total de la reacción	11 μ L
--------------------------	------------

- 2) Los reactivos fueron mezclados suavemente con la punta de la pipeta y después se incubó a 65 °C/5 min. Después, los tubos se colocaron en hielo por 1 minuto (choque térmico). Por último se les dio un pulso en la centrifuga.
- 3) Ulterior a la incubación, se adicionó los siguientes reactivos en el tubo de PCR:

Reactivos	Rx
Buffer de reacción 5x	4 μ L
Inhibidor Ribolock RNase (20 u/ μ L)	1 μ L
dNTPs mix (10 mM)	2 μ L
Transcriptasa reversa M-MULV 20 (20 u/ μ L)	2 μ L
Volumen total Rx	20 μ L

- 4) La reacción se mezcló suavemente y se le dio un pulso en la centrifuga.
- 5) Sucesivamente, se incubó a 37 °C/60 min.
- 6) Para finalizar la Rx ésta fue calentada a 75 °C/5 min.

El producto final de reacción de la transcriptasa reversa fue empleado directamente para realizar la PCR pero utilizando los oligos específicos para cada gen en estudio

6.5.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez que se obtuvo el cDNA se procedió a amplificar los fragmentos de genes a examinar; para esto se realizó la siguiente mezcla de Rx en un tubo para PCR:

Mezcla de Rx	1 Rx
H ₂ O	19.9 μ L
Buffer Titanium Taq PCR (10X)	2.5 μ L
dNTPs (50X)	0.5 μ L
5' primer (20 μ M)	0.5 μ L
3' primer (20 μ M)	0.5 μ L

Enzima Taq Titanium (50X)	0.1 μ L
AND	1 μ L
<hr/>	
Volumen total	25 μ L

Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.6% y la expresión de los genes fue analizada en un software midiendo la intensidad de pixeles (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008). Además, se utilizaron oligonucleótidos específicos que permitieron observar la expresión de los genes involucrados en la carcinogénesis y así poder comparar entre los tratamientos o grupos experimentales (Control, AOM, Linaza + AOM y EPS + AOM); los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía Invitrogen (Cuadro 4.2).

Una vez mezclados los reactivos para la amplificación del gen en estudio se siguieron los siguientes pasos:

1. La mezcla de PCR fue colocada en un tubo para PCR
2. 1 μ L de cDNA fue colocado
3. 0.5 μ L de oligonucleótido sentido y antisentido fue colocado para analizar la expresión un determinado gen.
4. El tubo fue colocado en el termociclador y se ejecutaron por separado los programas de corrida para cada uno de los genes en estudio.

Las condiciones de PCR que fueron utilizadas son las siguientes: 95 °C/1 min, después, 35 ciclos de 95 °C/30 seg, 50 °C/1 (temperatura de alineamiento) min 72 °C/1 min y 72 °C/2min. La temperatura de alineamiento vario dependiendo del gen a estudiar y puede ser observada en el cuadro 4.2

6.1 Oligonucleotidos de los diferentes genes en estudio

Gen	Secuencia	pb	Condiciones de alineamiento
Caspasa 3	Sentido: 5'-TTC ATC ATT CAG ACC TGC-3' Antisentido: 3'-ACG GGT AAG GAT GTG CAT GAA T-5'	247	50 °C/45 seg
p21	Sentido: 5'-GGA CAG TGA GCA GTT GAG C-3' Antisentido: 3'-GAG TGC AAG ACA GCG ACA AGG-5'	288	62 °C/1 min
p53	Sentido: 5'-GCA GCA CAG GAA CCT GGA ACT-3' Antisentido: 3'-ATG ATG GTA AGG ATG GGC-5'	582	62 °C/1 min
bcl-2	Sentido: 5'-GGG AGA ACA GGG TAT GAT AAC-3' Antisentido: 3'-GCA GAT GCC GGT TCA GGT ACT-5'	540	62 °C/1 min
bax	Sentido: 5'-GGC CCA CCA GCT CTG AAC AGT-3' Antisentido: 3'-TCA GCT CGG GCA CTT TAG-5'	370	62 °C/1 min
rb	Sentido: 5'-CAG ATT TCA TAC CTC AGA CCC TCT-3' Antisentido: 3'-ACA CTT GTA TGA GGG AAA AC-5'	364	62 °C/1 min
β-catenina	Sentido: 5'-GCT GAC GTC GTA CTC AGG CA-3' Antisentido: 3'-TCC ACA TCC TCT TCC TCA GG-5'	211	62 °C/1 min
K-ras	Sentido: TGT GGT AGT TGG AGC TGG TGG CGT AGG CA Antisentido: GGC ATC GTC AAC ACC CTG TCT TGT CTT CGC	564	50 °C/45 seg
Ciclina D1	Sentido: TCT TCC CGC TGG CCA TGA ACT ACC TGG A Antisentido: GCC ACC ATG GAG GGT GGG TTG GAA ATG	498	50 °C/1 min
c-myc	Sentido: GTG AGA AGG GCT TTG CCT CCA GGC TTG CT Antisentido: AGC GAA GCT CAC GTT GAG GGG CAT CGT	412	50 °C/1 min
COX-2	Sentido: TCC TGT GGC TGA TGA CTG CCC AAC TCC CAT Antisentido: GCA CCA GAC CAA AGA CTT CCT GCC CCA CA	554	50 °C/1 min
iNOS	Sentido: ATC TTT GCC ACC AAG ATG GCC TGG AGG AAC Antisentido: GAT CTT GAC CGT GAG CCT GCA GGA CCA GA	435	50 °C/1 min
gadph	Sentido: 5'-GCT CCT ACC ATT CAT GCT GAC A-3' Antisentido: 3'-TCA AGA CGA ATA AAC TCA TCG-5'	291	60 °C/1 min

6.6 Diseño experimental y análisis estadístico

Para el experimento *in vivo* se realizó un diseño experimental de un factor (tratamiento) completamente aleatorizado en réplicas. Por otro lado, se analizaron todos los resultados mediante un análisis de varianza de una vía, con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Las pruebas utilizadas para conocer la diferencia significativa de las muestras o de los grupos experimentales fueron las siguientes: prueba de Tukey en el caso de la caracterización de las muestras y Dunnett en el ensayo *in vivo*. Para todo este proceso fue utilizado el paquete estadístico JMP versión 5.0.1.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización de las muestras

La primera parte de este trabajo consistió en caracterizar a las muestras de linaza previo al estudio *in vivo*, es decir, conocer su composición química proximal, sus valores de taninos condensados (TC), compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT) y su capacidad antioxidante (por mencionar algunos parámetros). Posteriormente, se tomó la decisión de utilizar la muestra LN1 para extraer la fracción no digerible total (FNDDT), misma que también fue caracterizada, debido a que esa muestra presentó el mayor contenido de TC y fue la segunda mejor en presentar el contenido más alto de carbohidratos totales. Sin embargo, en esta sección no fue utilizada ninguna prueba estadística debido a que no se contaba con replicas reales; en otras palabras, se analizaron muestras comerciales de linaza pero sin conocer la variedad, el origen geográfico, así como el año de la cosecha de las muestras, datos que hubiesen servido para realizar comparaciones entre muestras, o mejor dicho, para hacer una discusión.

7.1.1 Composición química proximal de muestras de linaza (LN)

Los valores del análisis químico proximal para los diferentes lotes de linaza (LN1-LN5) se muestran en el Cuadro 7.1. Los valores encontrados para humedad fueron de 3.22 a 4.60% y para cenizas de 2.84 a 3.62%.

De acuerdo a la literatura, el contenido de proteína en linaza se encuentra en el intervalo de 10.50 a 31% (Oomah y Mazza, 1993; Hall *et al.*, 2006). En este estudio los valores de proteína encontrados (30.98 a 37.44%) están por encima del intervalo señalado. Únicamente, la muestra LN2 (30.98%) coincide con ese intervalo; sin embargo, Bhatt y Cherdkiatgumchal (1990) reportaron valores similares (43.90 y 37.50%) con lo encontrado en este estudio para harinas de linaza.

En lo que respecta al contenido de lípidos, Daun *et al.* (2003) y Hall *et al.* (2006) reportaron valores en el intervalo de 38 a 45%, lo cual coincide con lo encontrado en este estudio, excepto para la muestra LN1 (36.09%); no obstante, Wakjira *et al.* (2004) reportaron contenido de lípidos de 29.1 a 35.9% para semillas de linaza desarrolladas en Etiopía, coincidiendo con lo encontrado en la muestra LN1.

El contenido de carbohidratos totales fue de 10.30-22.00% (Cuadro 7.1). De acuerdo a la literatura, la mayor parte de los carbohidratos en la linaza pertenecen a la fibra dietética, hasta un 28% del peso seco de la semilla, y solo una pequeña cantidad son carbohidratos solubles (1-2%) (Figuerola *et al.*, 2008). Al respecto, Bautista-Justo *et al.* (2007) reportaron un valor de carbohidratos totales de 10.6%, siendo similar a la muestra LN5%

En general, los resultados que se obtuvieron de la composición química proximal coinciden con lo que se ha reportado en la literatura. Sin embargo, debido a que no se cuenta con información detallada de las muestras (variedad, origen geográfico o año de la cosecha) es difícil explicar las diferencias que se observaron.

Cuadro 7.1 Composición química proximal de muestras de linaza (LN) (% en base seca).

Muestra	Humedad	Cenizas	Proteína*	Lípidos	CHO'S** Totales
LN1	3.36 ± 0.03	3.62 ± 0.02	36.27 ± 0.2	36.09 ± 0.19	20.66
LN2	4.60 ± 0.32	3.13 ± 0.01	30.98 ± 0.10	39.30 ± 0.57	22.00
LN3	3.56 ± 0.03	3.31 ± 0.02	33.34 ± 0.15	42.28 ± 0.66	17.51
LN4	3.69 ± 0.04	2.84 ± 0.04	35.73 ± 0.03	42.94 ± 0.03	14.79
LN5	3.22 ± 0.04	3.25 ± 0.05	37.44 ± 0.11	45.79 ± 1.15	10.30

Cada valor representa la media de tres repeticiones ± la desviación estándar; n=3.

LN1-LN5 = diferentes lotes de linaza.

Los resultados son expresados como porcentaje en base seca.

(*) La proteína fue calculada como N X 6.25.

(**) Los carbohidratos totales (CHO's) fueron calculados por diferencia.

7.1.2 Contenido de taninos condensados (TC), compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT)

En el cuadro 7.2 se muestran los valores de TC, CFT y FT. El contenido de TC que se encontró en los diferentes lotes de linaza fue de 8.48 a 24.04 mg eq Cat/g (Cuadro 7.2). La muestra LN1 presentó el valor más alto de TC, 24.04 mg eq Cat/g. Con respecto al contenido de TC en semilla de linaza, prácticamente existe poca información en la literatura científica; no obstante, Wanasundara y Shahidi (1994) informaron valores de 136 mg eq (+)-catequina/100 g, lo cuales no coinciden con los valores encontrados en este estudio.

Existen reportes de TC de otros tipos de oleaginosas, por ejemplo en cascarilla de cuatro variedades de canola (Westar, Cyclone, Excel y Delta), en el cual emplearon el método de la vanillina-HCl, y coincidieron con los valores que se hallaron en este estudio. En la variedad Westar encontraron un valor de 98 a 1556 mg eq (+)-catequina/100 g, en la muestra Cyclon de 994-1574 mg eq (+)-catequina/100 g, en la variedad Excel 144 mg eq (+)-catequina/100 g y la variedad Delta presentó el valor más bajo, 14 mg (+)-catequina/100 g (Naczka *et al.*, 1994).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la linaza presenta cantidades importantes de TC, ya que los valores son similares con otros alimentos de importancia nutracéutica, como leguminosas (7.66 mg/g) y frutas (12.33 mg/g) (Saura-Calixto *et al.*, 2007).

En CFT, se encontraron valores que van de 2.30 a 3.42 mg eq ac fer/g. Algunos autores han reportado 5 mg/g (Velioglu *et al.*, 1998); sin embargo, en un trabajo más reciente realizado por Quezada y Cherian (2012) reportaron valores de 1.54 y 1.72 mg eq de ácido ferúlico/g para linaza (semilla entera) y harina de linaza, respectivamente. Igualmente, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la linaza presenta cantidades importantes de CFT ya que en otros alimentos vegetales de importancia nutracéutica, como cereales, leguminosas y frutas se han reportado valores de 1.07, 1.54, y 5.38 mg/g, respectivamente (Saura-Calixto *et al.*, 2007).

Para FT los valores encontrados fueron de 48.86 a 226.12 $\mu\text{g eq rut/g}$. Quezada y Cherian (2012) reportaron valores más altos para semilla entera (1700 $\mu\text{g/g}$) y harina de linaza (2800 $\mu\text{g/g}$). Sin embargo, Oomah *et al.* (1996) encontraron valores de 3.5-7.1 $\mu\text{g/g}$.

Cuadro 7.2 Contenido de taninos condensados (TC), compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT) en muestras de linaza (LN).

Muestra	TC (mg eq Cat/g) ^a	CFT (mg eq ac Fer/g) ^b	FT ($\mu\text{g eq Rut/g}$) ^b
LN1	24.04 \pm 0.6	2.30 \pm 0.07	48.86 \pm 1.1
LN2	8.73 \pm 0.51	3.42 \pm 0.03	197.82 \pm 2.04
LN3	9.11 \pm 0.44	3.34 \pm 0.05	164.76 \pm 1.11
LN4	13.33 \pm 0.91	2.57 \pm 0.07	129.97 \pm 2.94
LN5	8.48 \pm 0.41	3.06 \pm 0.09	226.12 \pm 3.18

Los valores representan la media de dos experimentos independientes \pm el error estándar; n=6.

LN1-LN5 = diferentes lotes de linaza.

^a Miligramos equivalentes de (+) -catequina/gramo de muestra (mg eq Cat/g).

^b Miligramos equivalentes de ácido ferúlico/gramo de muestra (mg eq Fer/g).

^c Microgramos equivalentes de rutina/gramo de muestra ($\mu\text{g eq Rut/g}$).

7.1.3 Composición química proximal y contenido de compuestos fenólicos en la fracción no digerible total (FNDDT)

Dado que la muestra LN1 presentó el mayor contenido TC (taninos condensados) y fue la segunda mejor que mostró un alto contenido de carbohidratos totales (Cuadro 7.1 y 7.2), se tomó ese criterio para obtener la fracción no digerible total (FNDDT) mediante el protocolo propuesto por Kurtzman y Halbrook (1970). El cuadro 7.3 muestra los valores de la composición química proximal y el contenido de compuestos fenólicos.

En la FNDDT se encontraron valores más bajos de humedad y cenizas, dichos valores fueron de 0.140 y 2.54%, respectivamente. Para el contenido de proteína se obtuvo un valor más alto (34.48%) con respecto a la muestra LN1, igualmente se observó el mismo patrón para el contenido de lípidos (38.49%) y carbohidratos totales (24.39%)

Debido a que durante el proceso extracción de la FNDDT se utilizó acetona, esto posiblemente provocó una deshidratación en la muestra y junto con el carácter hidrofóbico impartido por el aceite de linaza disminuyó el contenido de humedad en la FNDDT. El carácter hidrofóbico por parte del aceite del linaza fue reportado por Rendón-Villalónos *et al.* (2008) en la adición de linaza a diferentes concentraciones en tortillas de maíz. El contenido de cenizas pudo haber disminuido por los lavados con acetona que se efectuaron en la muestra. Por el contrario, el proceso ocasionó un aumento en el contenido de proteína y lípidos, lo cual sugiere que el proceso de extracción provocó una mayor liberación de proteína y lípidos de las células de la semilla; asimismo, incrementó el contenido de fibra dietética, principalmente de sus componentes celulosa, hemicelulosa y lignina, lo cual se vio reflejado en el contenido de carbohidratos totales y fracción indigerible, Cuadros 7.3 y 7.9, respectivamente.

Cuadro 7.3 Composición química proximal y contenido de compuestos fenólicos en la fracción no digerible total (FNDT) de la muestra LN1.

	FNDT	LN1
Humedad ^a	0.140 ± 0.01	3.36 ± 0.03
Ceniza ^a	2.54 ± 0.05	3.62 ± 0.02
Proteín ^a	34.48 ± 0.33	36.27 ± 0.2
Lípidos ^a	38.49 ± 0.53	36.09 ± 0.19
CHO'S ^a	24.35	20.66
Taninos condensados (mg eq Cat/g) ^b	78.79 ± 3.71	24.04 ± 0.6
Compuestos fenólicos totales (mg eq ac Fer/g) ^c	8.14 ± 0.07	2.30 ± 0.07
Flavonoides totales (µg eq Rut/g) ^d	195.56 ± 10.02	48.86 ± 1.1

Los valores representan la media de dos experimentos independientes ± el error estándar; n= 6.

FNDT= fracción no digerible total; LN1= muestra de linaza, lote L3569.

^a Los resultados son expresados como porcentaje en base seca.

^b Miligramos equivalentes de (+)-catequina/gramos de muestra (mg eq Cat/g).

^c Miligramos equivalentes de ácido ferúlico/gramo de muestra (mg eq Fer/g).

^d Microgramos equivalentes de rutina/gramos de muestra (µg eq Rut/g).

Prácticamente en todos los parámetros analizados se presentó un aumento en los valores de TC, CFT y FT, dicho aumento fue hasta de tres veces para TC y CFT, y en el caso de los FT hasta de cuatro veces en la FNDT (Cuadro 7.3). Vergara-Castañeda *et al.* (2010), utilizando el mismo protocolo para obtener la FNDT, reportaron un patrón similar después de obtener un extracto de polisacáridos de frijol común (variedad Bayo Madero). Los autores encontraron un aumento de hasta dos veces para el contenido de TC y CFT, atribuyéndolo al proceso de extracción. Posiblemente, el hecho de someter la muestra en contacto con ácido tánico y posteriormente realizar lavados con acetona, como lo marca el protocolo (Kurtzman y Halbrook, 1970), se generó un debilitamiento de los enlaces

covalente (éster) y puente de hidrógeno, igualmente de algunas interacciones hidrofóbicas que unen a los compuestos fenólicos con polisacáridos de la fibra dietética y algunas proteínas (Saura-Calixto, 2011), ocasionado un incremento en la concentración.

7.1.4 Capacidad antioxidante

Una vez que se conocieron los valores TC, CFT y FT, se procedió a analizar la capacidad antioxidante de las diferentes muestras de linaza. Se analizó el poder secuestrante por medio de la técnica de ABTS y el poder reductor mediante la técnica de FRAP. En el caso de la técnica de ABTS, los resultados fueron expresados como porcentaje de actividad antiradical (AA%) y equivalentes de trolox (TEAC); y para la técnica de FRAP, los resultados fueron expresados como micromoles equivalentes de sulfato ferroso. Los resultados se muestran en los Cuadros 7.4 y 7.5.

Cuadro 7.4 Capacidad antioxidante de diferentes muestras de linaza (LN) y fracción no digerible total (FNDT) analizadas por ABTS.

Muestra	AA (%)*	TEAC ($\mu\text{mol eq trol/g}$)**
LN1	53.51 \pm 0.30	27.01 \pm 0.15
LN2	62.62 \pm 0.55	31.46 \pm 0.27
LN3	56.44 \pm 0.54	28.45 \pm 0.27
LN4	47.62 \pm 1.07	24.15 \pm 0.56
LN5	42.37 \pm 0.77	21.59 \pm 0.38
FNDT	72.90 \pm 0.79	36.46 \pm 0.38

Los valores representan la media de dos experimentos independientes \pm el error estándar; n=6.

(*) Capacidad antioxidante expresada como porcentaje de actividad antiradical [AA (%)].

(**) Capacidad antioxidante en términos de equivalentes de trolox (TEAC); los resultados son expresados como microgramos equivalentes de trolox por gramo de muestra ($\mu\text{mol eq trol/g}$).

Los valores del AA (%) fueron de 42.37 a 72.90%. Las muestras que presentaron valores intermedios fueron LN2 (62.62%), LN3 (56.44%) LN1 (53.53%) y LN4 (47.37%). En términos de equivalentes de trolox, igualmente la FNDDT mostró el valor más alto (36.46 $\mu\text{mol eq trolox/g}$) y la muestra LN5 el valor más bajo (21.59 $\mu\text{mol eq trolox/g}$). Quezada y Cherian (2012) encontraron valores más altos de 0.90 y 1.95 mmol equivalentes de trolox/g para semilla y harina de linaza, respectivamente, valores que difieren de lo encontrado en este trabajo.

Sin embargo, los resultados encontrados en este trabajo, sugieren que la linaza presenta una capacidad antioxidante importante en términos de equivalentes de trolox. Por ejemplo, Hernández-Salazar *et al.* (2010), utilizando la técnica de ABTS y a partir de un extracto metanólico, reportaron valores de capacidad antioxidante para frijol negro (cv. Cotlaxtla), garbanzo (cv. Blanco Sinaloa 92) y lenteja (var. Común) de 13.2, 5.1 y 9.0 $\mu\text{mol eq trolox/g}$, respectivamente. Igualmente, otros autores han reportado valores más bajos de capacidad antioxidante en algunos cereales (1.3 $\mu\text{mol eq trolox/g}$), vegetales (6.7 $\mu\text{mol eq trolox/g}$) y frutas (10.2 $\mu\text{mol eq trolox/g}$); no obstante, en almendras, cacahuates y nueces se ha reportado un valor promedio de 33.6 $\mu\text{mol eq trolox/g}$ (Serrano *et al.*, 2007), lo cual es similar a lo encontrado en las muestras FNDDT y LN2 (36.46 y 31.46 $\mu\text{mol eq trolox/g}$, respectivamente).

En relación a los resultados obtenidos por la técnica de FRAP (Cuadro 7.4), es posible sugerir que las muestras de linaza presentaron buena habilidad reductora. Los resultados encontrados están en el intervalo de 40.23 a 64.16 $\mu\text{mol eq FeSO}_4/\text{g}$, siendo la muestra LN1 la que presentó el valor más alto (64.16 $\mu\text{mol eq FeSO}_4/\text{g}$). La capacidad antioxidante de muestras de linaza analizada por FRAP no ha sido ampliamente estudiada. Por lo tanto, los resultados aquí presentados son una contribución al conocimiento.

Por otro lado, algunos investigadores han sugerido que el ensayo de ABTS puede utilizar los mecanismos de transferencia de átomos de hidrógeno y electrones (para reducir metales, compuestos carbonilos y radicales libres) al mismo tiempo; no obstante, alguno de esos mecanismos llegará a ser dominante, pero dependerá de la estructura del antioxidante, de las propiedades de solubilidad de los compuestos fenólicos presentes en el extracto, del sistema de solvente empleado y de su coeficiente de partición (Quezada y Cherian, 2012).

Por su parte, FRAP utiliza exclusivamente el mecanismo de transferencia de electrones y ha sido considerado como un análisis razonable para observar la habilidad que tienen los antioxidantes de mantener un estatus redox en célula o tejidos (Quezada y Cherian, 2012).

De acuerdo a las diferencias que presentan ambos métodos, en cuanto a sus mecanismos de acción, el método de FRAP fue empleado en este trabajo para generar más información; por tal razón, se recomienda el uso de al menos dos métodos analíticos con mecanismo de acción diferente (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo por ambos métodos (ABTS y FRAP) sugieren que los compuestos bioactivos con actividad antioxidante de linaza presenta buena habilidad para secuestrar radicales libres y de mantener un estatus redox en un sistema biológico.

Cuadro 7.5 Capacidad antioxidante de diferentes muestras de linaza (LN) analizadas por FRAP.

Muestra	($\mu\text{mol eq FeSO}_4/\text{g}$)*
LN1	64.16 ± 2.65
LN2	50.79 ± 1.25
LN3	48.26 ± 0.92
LN4	40.23 ± 0.95
LN5	44.73 ± 2.04

Los valores representan la media de dos experimentos independientes \pm el error estándar; n=6.

(*) Capacidad antioxidante expresada como micromoles equivalentes de sulfato ferroso por gramo de muestra ($\mu\text{mol eq FeSO}_4/\text{g}$).

7.1.5 Bioaccesibilidad *in vitro* de compuestos fenólicos

Una vez que se determinó el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante, las muestras de linaza fueron sometidas a un proceso de digestión *in vitro*, el

cual mimetiza los cambios fisiológicos ocurridos en el estómago e intestino delgado (Dinnella *et al.*, 2007). Posterior a este proceso, se analizó el impacto que tuvo sobre el contenido de taninos condensados (TC), compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT), igualmente, sobre la capacidad antioxidante con la finalidad de conocer la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos. La permeabilidad a través de una membrana de diálisis puede considerarse como una simulación aceptable de la absorción intestinal pasiva de compuestos fenólicos solubles. La solución que permanece a fuera de la membrana de diálisis representa el remanente en el tracto gastrointestinal y la solución que penetra la membrana indica la fracción bioaccesible de compuestos fenólicos (Dinnella *et al.*, 2007). Los resultados de bioaccesibilidad se muestran en los Cuadros 7.6, 7.7 y 7.8.

El proceso de digestión *in vitro* impactó considerablemente en el contenido de CFT (Cuadro 7.6), ya que en la fase acuosa (FA) se encontraron valores de 12.53 a 16.98 mg eq Fer/g (miligramos equivalentes de ácido ferúlico por gramo de muestra). Es decir, tomando en cuenta los valores encontrados sin someter las muestras de linaza al proceso de digestión *in vitro*, se encontró un incremento promedio de hasta 4.67 veces posterior al proceso de digestión; no obstante, en la muestra de FNDD únicamente fue de 2.08 veces; posiblemente debido a que ésta muestra pasó por un proceso de extracción previo a la digestión *in vitro*. Cabe destacar, que entre las muestras de linaza analizadas, la muestra LN1 presentó el mayor incremento de CFT (hasta 6.82); además, junto con la FNDD presentaron el valor más alto de CFT posterior al proceso *in vitro*. Los valores que se obtuvieron de IB% para CFT estuvieron en el intervalo de 12.03 a 19.09%. Los resultados sugieren que en linaza y FNDD, bajo las condiciones del proceso de digestión *in vitro*, alrededor del 83% del total de CFT alcanzarán el colon, donde posiblemente tengan un efecto benéfico.

Cuadro 7.6 Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) en muestras de linaza (LN) y fracción no digerible total (FNDDT) después de ser sometidas a un proceso de digestión *in vitro*.

Muestra	No digerida (mg eq Fer/g)*	D _{IN} (mg eq Fer/g)*	FA (mg eq Fer/g)*	IB%**
LN1	2.30 ± 0.07 ^d	3.71 ± 0.20 ^a	15.70 ± 0.17 ^{ab}	19.09
LN2	3.42 ± 0.03 ^b	2.54 ± 0.02 ^b	13.61 ± 0.33 ^{bcd}	15.72
LN3	3.34 ± 0.05 ^{bc}	2.86 ± 0.09 ^b	13.61 ± 0.33 ^d	15.72
LN4	2.57 ± 0.07 ^d	1.71 ± 0.05 ^c	12.53 ± 0.70 ^{cd}	12.03
LN5	3.06 ± 0.09 ^c	2.89 ± 0.08 ^b	14.05 ± 0.71 ^{bc}	17.04
FNDDT	8.14 ± 0.07 ^a	3.48 ± 0.19 ^a	16.98 ± 0.47 ^a	17.01

Los valores representan la media de dos experimentos independientes ± el error estándar; n=6.

Letras diferentes por columna indican diferencia estadística significativa por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

D_{IN}= fase dializada contenida en el tubo de diálisis; FA= fase acuosa.

(*) Miligramos equivalentes de ácido ferúlico por gramos de muestra (mg eq Fer/g).

(**) Índice de bioaccesibilidad (IB) expresado en porcentaje.

En el Cuadro 7.7 se muestran los resultados del contenido de FT posterior al proceso de digestión *in vitro*. Nuevamente, se observó un impacto considerable posterior a dicho proceso. Los resultados que se encontraron en la FA estuvieron en el intervalo de 853.49 a 3846 $\mu\text{g eq Rut/g}$ (microgramos equivalentes de rutina por gramo de muestra); sin embargo, el incremento que se encontró fue muy variable: en la muestra LN1 fue de 78.73 veces, en la muestra LN4 de 22.65 veces, en la FNDDT de 10 veces y en las muestras restantes (LN2, LN3 y LN5) en promedio fue de 4.51 veces. En FT los valores de IB% fueron más bajos con respecto a lo encontrado en CFT, y estuvieron en el intervalo de 4.92 a 10.29%. Los resultados sugieren que bajo las condiciones del proceso de digestión *in vitro*, existe un mayor contenido de flavonoides totales que podrían alcanzar el colon, el cual es alrededor del 93%.

Cuadro 7.7 Contenido de flavonoides totales (FT) en muestras de linaza (LN) y fracción no digerible total (FNDT) después de ser sometidas a un proceso de digestión *in vitro*.

Muestra	No digerida ($\mu\text{g eq Rut/g}$)*	D _{IN} ($\mu\text{g eq Rut/g}$)*	FA ($\mu\text{g eq Rut/g}$)*	IB%**
LN1	48.86 \pm 1.1 ^e	162.97 \pm 16.90 ^a	3846.54 \pm 56.31 ^a	4.06
LN2	197.82 \pm 2.04 ^b	77.16 \pm 6.75 ^c	853.49 \pm 42.65 ^d	8.29
LN3	164.76 \pm 1.11 ^c	88.93 \pm 4.04 ^{bc}	795.60 \pm 37.34 ^d	10.05
LN4	129.97 \pm 2.94 ^d	152.33 \pm 18.07 ^a	2943.06 \pm 98.97 ^b	4.92
LN5	226.12 \pm 3.18 ^a	113.89 \pm 8.70 ^{abc}	993.09 \pm 56.74 ^d	10.29
FNDT	195.56 \pm 10.02 ^b	138.71 \pm 19.26 ^{ab}	2061.93 \pm 84.18 ^c	6.30

Los valores representan la media de dos experimentos independientes \pm el error estándar; n=6.

Letras diferentes por columna indican diferencia estadística significativa por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

D_{IN}= fase dializada contenida en el tubo de diálisis; FA= fase acuosa.

(*) Microgramos equivalentes de rutina por gramos de muestra (mg eq Rut/g).

(**) Índice de bioaccesibilidad (IB) expresado en porcentaje.

Conocido el impacto que tuvo el proceso de digestión *in vitro* sobre el contenido de compuestos fenólicos, la capacidad antioxidante fue analizada por la técnica del ABTS. Los resultados se muestran en el Cuadro 7.8. En la FA se encontraron valores de 84.32 a 145.80 $\mu\text{mol eq trol/g}$ (micromoles equivalentes de trolox por gramos de muestra), lo cual indica un incremento promedio de hasta 4.02 veces; sin embargo, en algunas muestras se observó un incremento de 6.04 y 5.74 veces (muestras LN4 y LN5, respectivamente). De acuerdo a los resultados de RFA% (remanente de capacidad antioxidante en la fase acuosa), es factible sugerir que aproximadamente un 95% de la capacidad antioxidante no es bioaccesible, por lo tanto podrá llegar al colon donde tendrá algún efecto benéfico.

Cuadro 7.8 Capacidad antioxidante de diferentes muestras de linaza (LN) y fracción no digerible total (FNDT) después de ser sometidas a un proceso de digestión *in vitro*.

Muestra	No digerida ($\mu\text{mol eq trol/g}$)*	D _{IN} ($\mu\text{mol eq trol/g}$)*	FA ($\mu\text{mol eq trol/g}$)*	RFA% **
LN1	27.01 \pm 0.15 ^c	7.25 \pm 0.92 ^a	84.32 \pm 2.18 ^d	92.0
LN2	31.46 \pm 0.27 ^b	5.00 \pm 0.35 ^{ab}	106.382 \pm 1.16 ^c	95.91
LN3	28.45 \pm 0.27 ^c	5.05 \pm 0.27 ^{ab}	99.11 \pm 1.20 ^c	95.15
LN4	24.15 \pm 0.56 ^d	6.83 \pm 0.14 ^{ab}	145.80 \pm 1.40 ^a	95.52
LN5	21.59 \pm 0.38 ^e	4.29 \pm 0.42 ^b	123.92 \pm 1.16 ^b	96.65
FNDT	36.46 \pm 0.38 ^a	7.76 \pm 1.17 ^a	84.34 \pm 2.79 ^d	91.57

Los valores representan la media de dos experimentos independientes \pm el error estándar; n=6.

Letras diferentes por columna indican diferencia estadística significativa por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

D_{IN}= fase dializada contenida en el tubo de diálisis; FA= fase acuosa.

(*) Microgramos equivalentes de trolox por gramo de muestra ($\mu\text{mol eq trol/g}$).

(**) Remanente de capacidad antioxidante contenida en la fase acuosa (RFA) expresado en porcentaje.

Posterior al proceso de digestión *in vitro* los TC no pudieron ser cuantificados ni en la FA ni en la D_{IN}, ya que el valor de las absorbancias siempre se presentó por debajo del límite de detección. La literatura científica indica que la mayoría de los TC son compuestos insolubles y de alto peso molecular (Haminiuk *et al.*, 2012), lo cual puede explicar su ausencia en ambas fases (FA y D_{IN}) y sugerir que en la linaza los TC presentan nula bioaccesibilidad. El aumento de CFT y FT posterior al proceso de digestión puede ser explicado por la acción de las enzimas empleadas (α -amilasa, pancreatina y extracto de bilis) y por los cambios en el pH (Saura-Calixto, 2011). La baja bioaccesibilidad de CFT y FT puede ser influenciada por la estructura química de los compuestos fenólicos y por su

interacción con diferentes macromoléculas como proteínas y carbohidratos que forman parte de la fibra dietética (Haminiuk *et al.*, 2012).

Comúnmente, los compuestos fenólicos no glucosilados pueden ser directamente absorbidos en el intestino delgado; no obstante, la mayoría de ellos se encuentra en forma glucosilada y polimérica por lo que deben ser hidrolizados enzimáticamente previo a su absorción (Haminiuk *et al.*, 2012). Igualmente, en el experimento aquí establecido, los compuestos fenólicos pudieron haber estado forma glucosilada y polimérica, ocasionando un incremento en su tamaño molecular, lo cual impidió su penetración a la membrana de diálisis y así disminuyó su bioaccesibilidad. Con respecto a las interacciones con la FD, se ha informado que las fibras solubles pueden reducir el índice de absorción principalmente por un atrapamiento físico de los compuestos fenólicos dentro de la matriz de fibra y quimo (Palafox-Carlos *et al.*, 2011). Lo anterior, posiblemente también se pudo haber presentado en el proceso de digestión *in vitro* y favoreció la baja bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos, tomando en cuenta que la linaza es una fuente importante de FD soluble conocida como mucílago (Hall *et al.*, 2006).

Los compuestos fenólicos han sido considerados como el grupo más numeroso, ubicuo e importante del reino vegetal (Naczk and Shaidi, 2004; Haminiuk *et al.*, 2012). Estos compuestos como antioxidantes donan un electrón a cualquier radical libre y lo convierten en una molécula inocua (Haminiuk *et al.*, 2012). También pueden proteger contra el daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN, además de que tienen un impacto significativo sobre la expresión de genes. La ingesta o concentraciones de éstos en el plasma se asocian con el bajo riesgo de enfermedades crónicas degenerativas en personas que consumen dietas saludables (Saura-Calixto, 2011). No obstante, estudios previos han revisado las evidencias que sugieren que la microestructura de los alimentos afecta la bioaccesibilidad y biodisponibilidad principalmente de los compuestos fenólicos (Palafox-Carlos *et al.*, 2011); asimismo, la FD tiene un papel específico en la absorción de compuestos fenólicos (Palafox-Carlos *et al.*, 2011; Saura-Calixto, 2011), lo cual no ha habido sido analizado en la linaza.

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo, sugieren que los compuestos fenólicos en la linaza presentan baja bioaccesibilidad; además, suponen que el poder

antioxidante se incrementó posterior al proceso de digestión *in vitro* y que dicho poder antioxidante llegará al colon donde ejercerá un efecto benéfico. Esto se puede traducir en la prevención de cáncer de colon: mediante la generación de un ambiente antioxidante en el colon, inhibición del daño oxidativo al ADN e inflamación, inducción de apoptosis y prevención de la formación de pólipos (Saura-Calixto, 2011).

Al respecto, López-Oliva *et al.* (2006) alimentaron ratas Wistar con una dieta con celulosa o con FD rica en compuestos fenólicos de uva vinícola; los autores reportaron que la dieta con FD rica en compuestos fenólicos promovió hipoplasia epitelial en la mucosa del colon, reducción de apoptosis, disminución del número de criptas y de la capacidad proliferativa. En otro estudio, un poco más reciente, López-Oliva *et al.* (2010) reportaron, en ratones APC_{min} alimentados con una dieta estándar o suplementada con 1% de la FD anteriormente mencionada, que la dieta suplementada redujo significativamente el número de pólipos, especialmente en la parte media del colon después de seis semanas, así como una reducción de tumorigénesis en el intestino delgado. Estos resultados sugieren un efecto positivo sobre el desarrollo de cáncer de colon por parte de FD ricas en compuestos fenólicos. En relación a esto, Ferguson *et al.* (2001) han señalado que la pared celular de los alimentos vegetales contiene cantidades significativas de compuestos fenólicos, los cuales probablemente pueden proteger contra el desarrollo de cáncer.

Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la FD de linaza; no obstante, el estudio de bioaccesibilidad *in vitro* puede indicar algunas aproximaciones, ya que su FA (fase acuosa) puede estar conformada principalmente por FD soluble (mucílago), y como lo mostró el estudio *in vitro*, es rica en compuestos CFT y FT. Para los taninos condensados (TC), éstos pueden estar presentes en su FD insoluble en concentraciones importantes. Otros antioxidantes dietarios importantes en la linaza son los lignanos, ácido ferúlico y ácido p-hidroxibenzoico; en la oleaginosa se encuentran concentraciones de 9 a 30 mg/g de harina desgrasada, 313 mg/100 g de harina desgrasada y 6454 mg/100 g de harina desgrasada, para lignanos, ácido ferúlico y ácido p-hidroxibenzoico, respectivamente (Hall *et al.*, 2006; Touré y Xueming, 2010). Se ha informado que los lignanos se encuentran principalmente en la pared celular de la linaza, y en el caso del ácido ferúlico y p-hidroxibenzoico se ha reportado que son uno de los

principales compuestos fenólicos asociados a FD en alimentos vegetales, junto con los taninos condensados (Saura-Calixto, 2011). Lo anterior hace suponer el potencial nutracéutico de la linaza en lo que respecta a la prevención de cáncer de colon y debido a la baja bioaccesibilidad de sus compuestos fenólicos.

7.1.6 Contenido de fracción indigerible (FI)

Previo al estudio *in vivo* se determinó el contenido de FI por el método de Saura-Calixto *et al.* (2000). Este método fue empleado porque se presentaron problemas para separar el mucílago utilizando el método oficial para cuantificar fibra dietética (FD) de la AOAC (2002). El protocolo para cuantificar la FI de alimentos vegetales propuestos por Saura-Calixto *et al.* (2000) incluye etapas de centrifugación y diálisis, las cuales permitieron la extracción y cuantificación del mucílago. El método para cuantificar la FI es utilizado como una opción fisiológica al análisis de la FD en estudios nutricionales (Saura-Calixto y Goñi, 2004), ya que los carbohidratos indigeribles pueden ser representados por la FI, fracción que contiene los principales sustratos de fermentación colónica, como la FD, almidón resistente, gomas o mucílagos, proteína resistente y otros compuestos asociados, como compuestos fenólicos (Saura-Calixto, 2006). Asimismo, el contenido de FI total fue analizado para conocer el contenido de carbohidratos indigeribles que los animales ingirieron en el ensayo *in vivo*, igualmente, se usó para ajustar la dosis de FNNT que se administró a los animales.

Los valores de FI soluble, insoluble y total de las muestras de LN1 y FNNT se muestran en el Cuadro 7.9. En el contenido de FI soluble prácticamente no se observaron cambios; sin embargo, como se esperaba en la FNNT se encontró un valor más alto de FI insoluble (45.59%), el cual fue de 2.7 veces. Este hecho se puede deber al método utilizado para extraerla FNNT; posiblemente, la aplicación de ácido tánico y los lavados con acetona provocaron una mayor concentración de celulosa, hemicelulosa y lignina (principales componentes de la FD insoluble).

Cuadro 7.9 Contenido de fracción indigerible (FI) en muestra de linaza (LN) y su fracción no digerible (FNDDT).

Muestra	FI (% en base seca)*		
	Soluble	Insoluble	Total**
LN1	17.77 ± 0.73	36.50 ± 1.96	54.27
FNDDT	16.96 ± 0.88	45.59 ± 0.79	62.55

Los valores representan la media de dos experimentos independientes ± el error estándar; n=6.

(*). Los resultados son expresados como porcentaje en base seca.

(**). El valor de fracción indigerible total fue calculado por diferencia.

De acuerdo a la definición de FI, la FI soluble está constituida principalmente por FD soluble y compuestos bioactivos asociados como compuestos fenólicos (Saura-Calixto, 2006). La mayor parte de FD soluble en la semilla de linaza está conformada por mucílago, el cual se encuentra en un intervalo de 3.6 a 10% (Hall *et al.*, 2006). Sin embargo, Luo *et al.* (2003) extrajeron mucílago con agua caliente (90-95%) durante 50-60 minutos y obtuvieron una producción de mucílago del 13-14%, lo cual es similar con lo obtenido en FI soluble.

Aproximadamente dos terceras partes del contenido de FI total correspondieron a FI insoluble. La mayor proporción de FI insoluble sobre la soluble se debe al hecho de que la fracción insoluble está conformada por una mayor cantidad de constituyentes indigeribles, destacando la presencia de FD insoluble (celulosa, hemicelulosa y lignina), proteína resistente, compuestos polifenólicos (lignina, taninos condensados y flavonoides) y posiblemente almidón resistente (Saura-Calixto *et al.*, 2000).

En resumen, los resultados sugieren que los tratamientos utilizados en el ensayo *in vivo* presentan importantes concentraciones de carbohidratos indigeribles, así como otras biomoléculas asociadas, sobre todo la muestra de FNNT.

7.2 Efecto de la linaza y su FNNT sobre el estadio temprano de cáncer de colon

Una vez caracterizadas las muestras de linaza y la fracción no digerible total (FNNT) de la muestra LN1 se procedió a realizar el ensayo *in vivo*. La muestra de linaza LN1 fue utilizada para obtener su FNNT debido a que ésta presentó el valor más alto de taninos condensados y fue la segunda mejor que mostró un alto contenido de carbohidratos totales (Cuadros 7.1 y 7.2, respectivamente); además, después del proceso de digestión *in vitro*, la muestra LN1 exhibió el valor más alto de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales (Cuadros 7.6 y 7.7, respectivamente).

7.2.1 Consumo de agua, alimento y ganancia de peso corporal

El consumo de agua, alimento y la ganancia de peso corporal fueron medidos semanalmente, durante el experimento *in vivo* con la finalidad de observar si la administración de azoximetano (AOM) o la de los tratamientos (Linaza y FNNT) influía en dichas variables. Los resultados son expresados como la delta de cada promedio por grupo \pm el error estándar y se presentan en las Figuras 7.1, 7.2 y 7.3.

El grupo experimental Linaza + AOM consumió menos agua y alimento; no obstante, no fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto al grupo AOM (Figura 7.1 y 7.2). En general, en este estudio se observó que la administración de los tratamientos, así como la inducción química de cáncer de colon por AOM no influyó significativamente ($p > 0.05$) en el consumo de agua, alimento y ganancia de peso corporal. La comparación se realizó con respecto al grupo tratado con AOM.

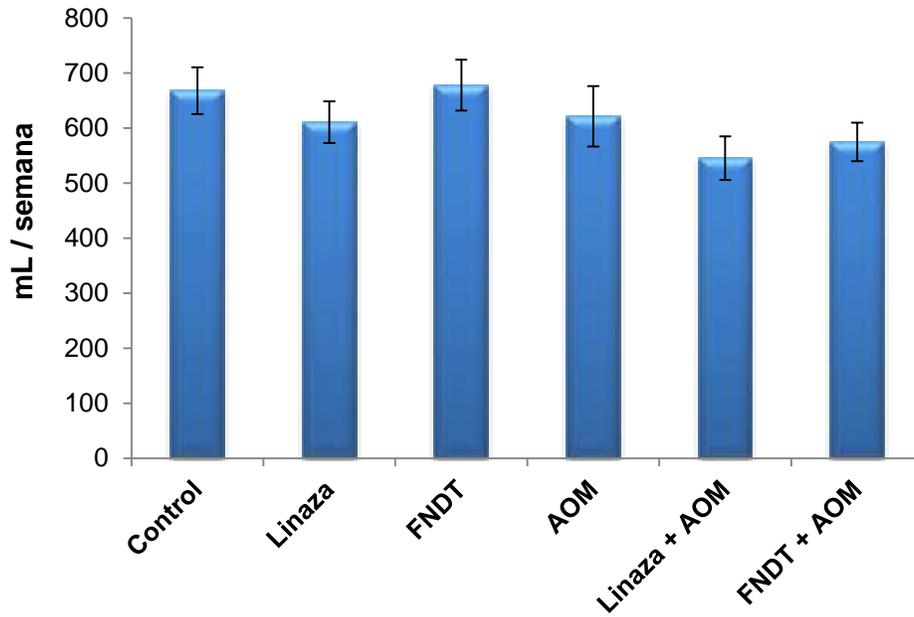


Figura 7.1 Consumo de agua de los grupos experimentales. Los resultados representan la delta del promedio de cada grupo \pm el error estándar (n= 12).

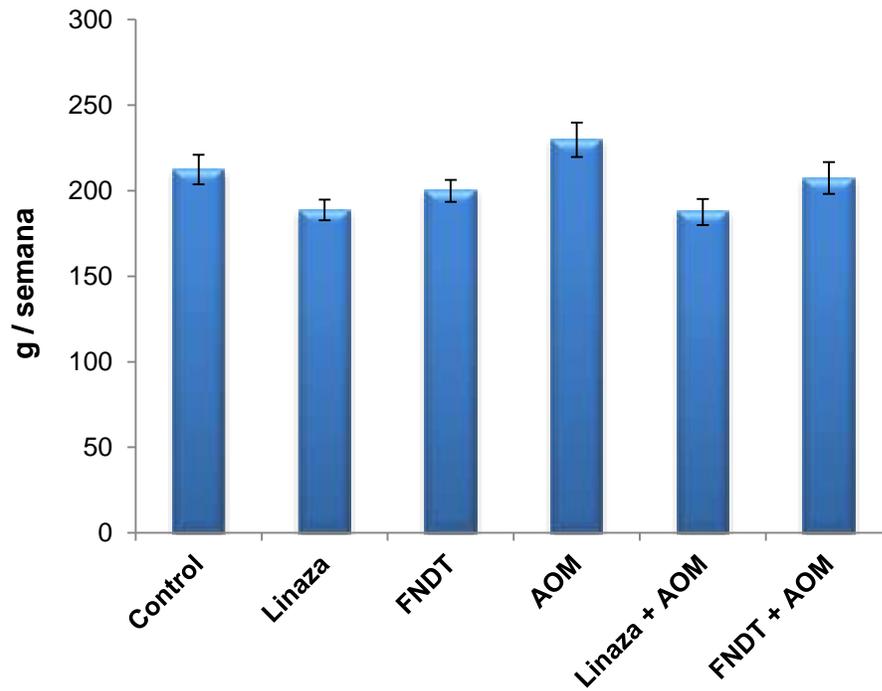


Figura 7.2 Consumo de alimento de los grupos experimentales. Los resultados representan la delta del promedio de cada grupo \pm el error estándar (n= 12).

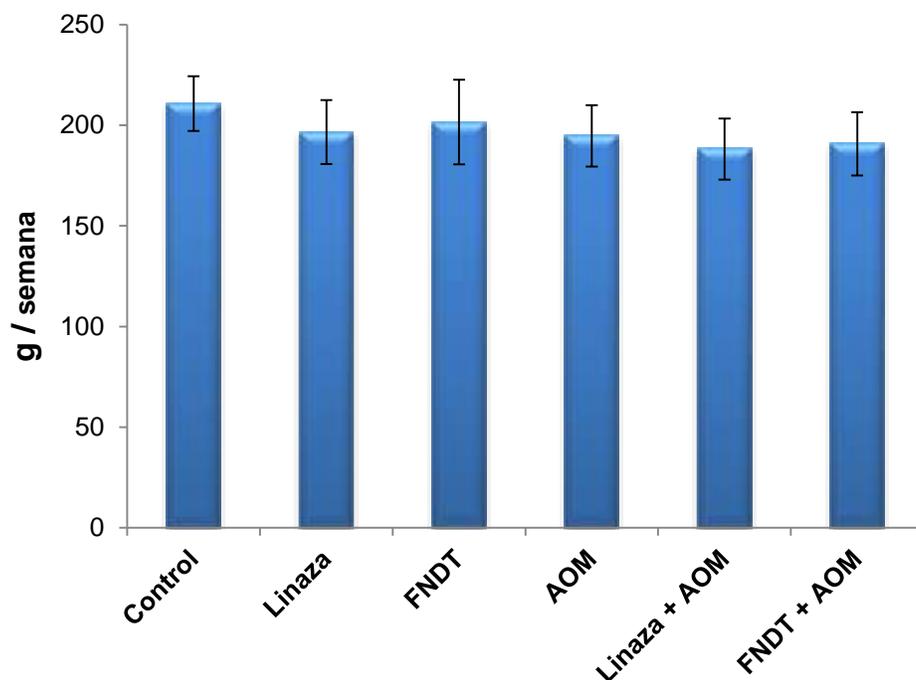


Figura 7.3 Ganancia de peso corporal de los grupos experimentales. Los resultados representan la delta del promedio de cada grupo \pm el error estándar (n= 12).

Estas observaciones concuerdan con lo reportado por Nochera y Alabaster (2009), quienes obtuvieron cambios significativos ($p>0.05$) en el consumo de alimento y en la ganancia de peso corporal de ratas tratadas con AOM y con una dieta combinada con linaza; Igualmente, Vergara-Castañeda *et al.* (2010), sugirieron que la aplicación AOM y tratamientos (frijol común y su extracto de polisacáridos) no influyeron en la ganancia de peso, consumo de agua y alimento debido a que su evaluación se realizó en un estadio temprano de cáncer de colon. No obstante, existen datos contradictorios. Por ejemplo, Rao *et al* (1998) observaron una disminución en la ganancia de peso corporal de hasta un 10% en ratas tratadas con AOM y con una dieta que contenía un 10% de pectina.

Los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que la administración de linaza a la dosis recomendada (aproximadamente 16 g) no afecta significativamente ($p>0.05$) el consumo de agua y alimento, así como la ganancia de peso corporal en ratas inducidas y no

inducidas, posiblemente porque la administración de los tratamientos fue relativamente corta.

7.2.2 Fosas cripticas aberrantes (FCA)

El número de total y multiplicidad de FCA se muestra en el Cuadro 7.10, y en la Figura 7.4 se presentan las imágenes de dicho sistema, en donde se puede apreciar el número de cripta(s) que puede conformar a una fosa. En lo que respecta al número total de FCA, en los grupos Linaza + AOM y FNDDT + AOM, aunque se observó una disminución de las FCA (56.00 ± 19.2 y 80 ± 21.8 , respectivamente) ésta no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$). En el caso de la multiplicidad de las criptas, en esta variable fue posible observar una disminución significativa ($p < 0.05$) en el grupo Linaza + AOM, específicamente en las FCA formadas por 4 criptas o más (Cuadro 7.10 y Figura 7.4).

La multiplicidad de las FCA incrementa con el tiempo y son un indicador útil para predecir el desarrollo de tumores (Wargovich *et al.*, 1995). En este sentido, se ha demostrado que FCA conformadas por cuatro criptas o más ($4 \geq$ criptas), son más promisoras a desarrollar tumores (Rao *et al.*, 1998). En el Cuadro 7.10, se puede observar el alto número de FCA conformadas por $4 \geq$ criptas por parte del grupo de AOM (34.00 ± 11.0). De acuerdo a la multiplicidad de las criptas, los resultados sugieren un efecto preventivo de la linaza.

Cuadro 7.10 Efecto de la linaza y su fracción no digerible total (FNDT) sobre el número total y multiplicidad de fosas cripticas aberrantes (FCA) en ratas inducidas químicamente con azoximetano (AOM).

Grupo experimental	No. Total de FCA	Multiplicidad			
		1 cripta	2 criptas	3 criptas	4 ≥ criptas
Control	1.33 ± 1.3	0.33 ± 0.3	0.33 ± 0.3	0.33 ± 0.3	0.00 ± 0.0
Linaza	4.17 ± 3.77	3.67 ± 3.2	0.50 ± 0.5	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
FNDT	1.67 ± 0.84	1.17 ± 0.5	0.16 ± 0.16	0.16 ± 0.16	0.16 ± 0.16
AOM	146.75 ± 28.7	51.75 ± 12.3	40.25 ± 4.4	20.75 ± 4.7	34.00 ± 11.0
Linaza + AOM	56.00 ± 19.2*	27.67 ± 11.8	12.00 ± 3.2*	5.67 ± 1.7*	10.50 ± 3.5*
FNDT + AOM	90.83 ± 22.9	30.67 ± 7.5	25.00 ± 6.2*	13.17 ± 5.8	22.17 ± 5.4

Los valores representan la media ± el error estándar (n=6).

(*) Indica diferencia estadística significativa con respecto al grupo tratado con azoximetano (AOM) (Dunnett; α=0.05).

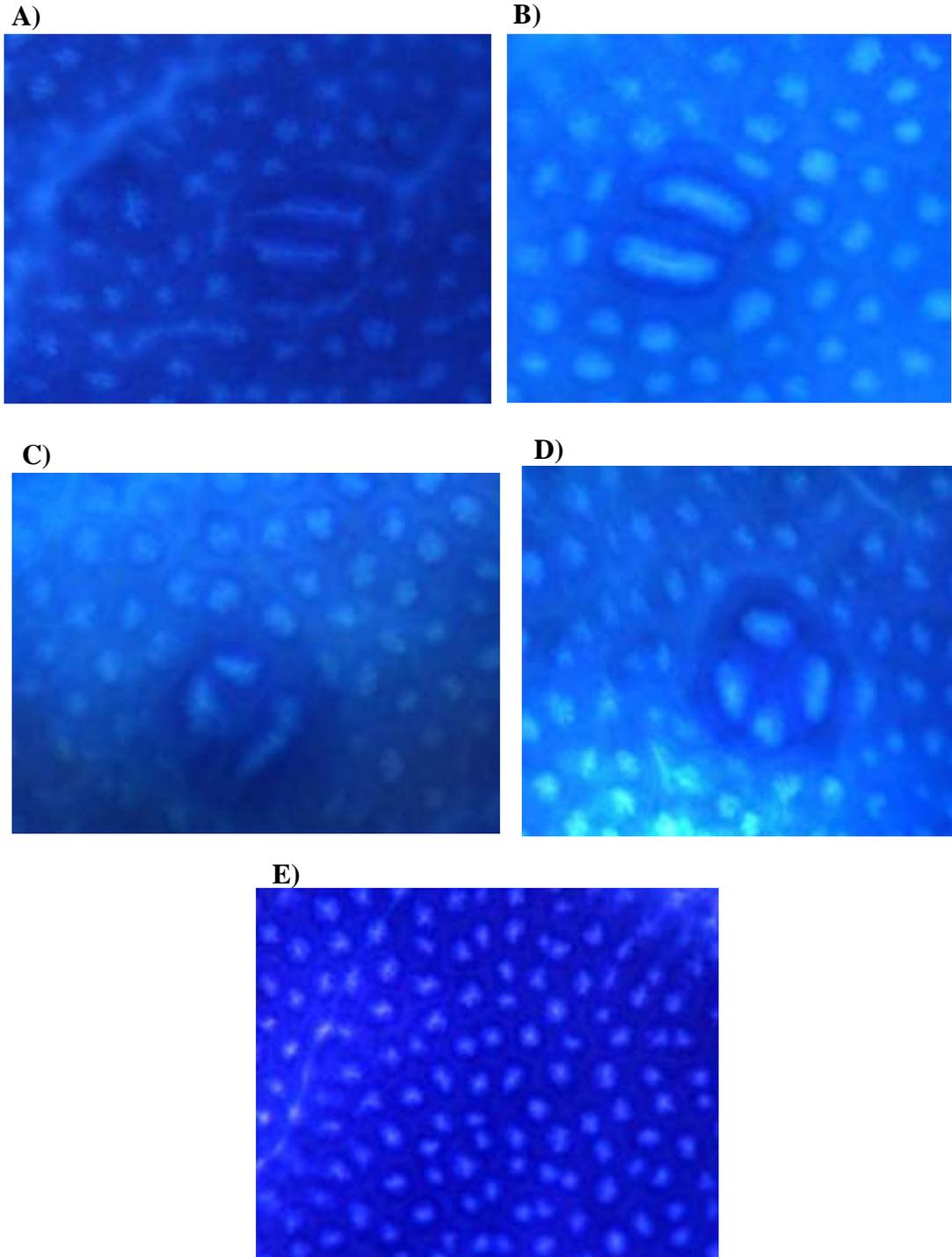


Figura 7.4 Visualización de fosas cripticas aberrantes con azul de metileno (FCA): **A.** Foshas aberrantes conformadas por una y dos criptas. **B.** Fosa aberrante conformada por dos criptas. **C.** Fosa aberrante conformada por tres criptas. **D.** Fosa aberrante conformada por cuatro criptas. **E.** Tejido colónico sin FCA. Las fotografías A, B, C y D pertenecen al grupo AOM (azoximetano) mientras que la fotografía E al grupo Control.

El sistema de FCA ha sido utilizado ampliamente para observar el efecto de la dieta, así como de agentes biológicos y quimioterapéuticos sobre cambios morfológicos y genéticos del tejido colónico en respuesta a dichos factores (Das *et al.*, 2007). Del mismo modo, algunos autores han utilizado esta herramienta para evaluar el potencial preventivo contra el cáncer de colon de algunos alimentos ricos en FD así como de ingredientes alimenticios.

Al respecto, Nochera y Olabaster (2009) demostraron que la FD insoluble de salvado de trigo en combinación con alimentos ricos en FD soluble (como linaza y soya) disminuyó significativamente el número total y multiplicidad ($4 \geq$ criptas) de FCA en comparación al efecto estudiado por separado de la linaza o el salvado de trigo. Dichos autores concluyeron que la dieta tiene un efecto importante en la prevención del cáncer de colon, y que la combinación de alimentos en la dieta puede ser más importante que el consumo de uno solo; no obstante, los autores no señalaron ningún mecanismo de acción que explique dicho efecto preventivo.

En este trabajo, se analizó el efecto preventivo o quimiopreventivo de la linaza y de su FNDT por separados y administrados vía sonda intragástrica. Cabe señalar que existen pocos estudios al respecto. Jenab y Thompson (1996) analizaron el efecto quimioprotector de la linaza utilizando como base el consumo promedio de 15 g sobre el número total y multiplicidad de FCA. Los autores observaron que la linaza a largo plazo disminuyó significativamente la multiplicidad de las criptas, sugiriendo su posible efecto contra el cáncer de colon; dicho efecto preventivo, fue asociado al incremento dosis-dependiente de la actividad cecal de β -glucuronidasa y a la excreción urinaria de lignanos, y no la producción de AGCC o disminución del pH asociado a la fermentación de la FD.

En este estudio (a corto plazo) se encontró un patrón similar, ya que se observó una disminución significativa de la multiplicidad de las criptas ($4 \geq$ criptas) por parte del grupo Linaza + AOM (Cuadro 7.11). La dosis de linaza administrada fue en base al consumo recomendado de dos cucharadas por día, es decir aproximadamente 16 g de linaza/día (Figuerola *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 2006), similar a la administrada por Jenab y Thompson (1996). Igualmente, no se observó una disminución significativa del pH, ni cambios importantes en el perfil de los AGCC, producto de la fermentación de los carbohidratos

indigeribles (en su mayoría componentes de la FD). Estas observaciones serán discutidas en una sección posterior.

7.2.3 pH y contenido de AGCC en el contenido cecal, colónico y heces

La fermentación colónica de carbohidratos indigeribles está asociada con una disminución en los valores del pH y con una consecuente proliferación benéfica de la microbiota, como las bifidobacterias (Hernández-Salazar *et al.*, 2010). Por lo tanto, los cambios en el pH son frecuentemente usados como un indicador indirecto de la fermentación de materiales indigeribles, por lo que se decidió analizar el pH del contenido cecal, colónico y en heces de las ratas en estudio, cuyos valores se muestran en el Cuadro 7.11.

En el contenido cecal de las ratas, los grupos tratados con Linaza y FNNT mostraron una disminución significativa ($p < 0.05$) en los valores de pH con respecto al grupo tratado con AOM; en lo que respecta a los grupos Linaza + AOM y FNNT + AOM no se observó diferencia estadística significativa en el contenido cecal, colónico y heces de los animales (Cuadro 7.11).

Los valores de pH encontrados en este estudio no fueron tan bajos como se esperaba, incluso, parecen no corresponder a una producción alta o significativa de AGCC, principalmente de ácido acético. Aunque no se puede hacer una comparación directa, se ha observado en algunos estudios *in vitro* una relación inversa entre la producción de ácido acético y la disminución del pH (Hernández-Salazar *et al.*, 2010).

Cuadro 7.11 Efecto de los tratamientos sobre el pH del contenido cecal, colónico y heces de ratas inducidas y no inducidas.

Grupo Experimental	pH		
	Contenido cecal	Contenido colónico	Heces
Control	7.65 ± 0.12 ^{A abc}	7.46 ± 0.18 ^{A a}	6.95 ± 0.45 ^{A b}
Linaza	7.33 ± 0.01 ^{A bc}	7.49 ± 0.02 ^{A a}	7.09 ± 0.37 ^{A ab}
FNDT	7.25 ± 0.05 ^{A c}	7.60 ± 0.11 ^{A a}	7.56 ± 0.12 ^{A ab}
AOM	7.81 ± 0.03 ^{A a}	7.51 ± 0.21 ^{A a}	7.38 ± 0.25 ^{A ab}
Linaza + AOM	7.87 ± 0.02 ^{A a}	7.68 ± 0.07 ^{AB a}	7.72 ± 0.03 ^{B ab}
FNDT + AOM	7.68 ± 0.13 ^{AB ab}	7.40 ± 0.16 ^{B a}	7.97 ± 0.05 ^{A a}

Los valores representan la media ± error estándar de tres repeticiones.

Letras mayúsculas indican diferencia estadística significativa por fila y letras minúsculas por columna (Tukey, $\alpha=0.05$).

Como ya se ha mencionado, la producción de AGCC (como ácido acético, propiónico y butírico) es considerado el producto más importante de la fermentación de los carbohidratos indigeribles (Slavin, 2007). Para tratar de probar que el efecto quimioprotector de los tratamientos (linaza y FNDT) estuviese asociado a la fermentación de su fracción de carbohidratos indigeribles, se analizó el contenido de los AGCC. Los resultados se muestran en el Cuadro 7.12.

En el contenido cecal, no se observó diferencia estadística significativa ($p>0.05$) en los niveles ácido acético por la administración de los tratamientos; en los grupos AOM, Linaza + AOM y FNDT + AOM los niveles de ácido propiónico y butírico no fueron significativamente diferentes ($p>0.05$).

Cuadro 7.12 Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en contenido cecal, colonico y heces.

Grupo	AGCC (mM / g de muestra)*								
	Contenido cecal			Contenido colónico			Heces		
	Acético	Propiónico	Butírico	Acético	Propiónico	Butírico	Acético	Propiónico	Butírico
Control	14.94 ± 0.5 ^a	7.01 ± 0.3 ^{ab}	6.33 ± 0.4 ^a	16.35 ± 0.7 ^a	6.21 ± 0.5 ^b	4.56 ± 0.4 ^{ab}	19.99 ± 1.5 ^a	6.74 ± 0.3 ^a	4.85 ± 0.2 ^b
Linaza	15.61 ± 0.7 ^a	7.65 ± 0.2 ^{ab}	4.98 ± 0.3 ^b	13.91 ± 0.3 ^{ab}	7.88 ± 0.4 ^{ab}	4.37 ± 0.2 ^{ab}	21.24 ± 0.9 ^a	6.84 ± 0.2 ^a	5.80 ± 0.2 ^{ab}
FNDT	15.95 ± 0.8 ^a	6.80 ± 0.3 ^b	5.41 ± 0.3 ^{ab}	16.72 ± 0.4 ^a	6.50 ± 0.5 ^{ab}	3.89 ± 0.2 ^b	23.47 ± 3.5 ^a	6.95 ± 0.6 ^a	7.26 ± 0.9 ^a
AOM	16.42 ± 0.7 ^a	7.43 ± 0.2 ^{ab}	6.25 ± 0.3 ^a	13.44 ± 0.3 ^b	8.17 ± 0.1 ^a	4.41 ± 0.0 ^{ab}	25.26 ± 1.6 ^a	6.83 ± 0.2 ^a	5.88 ± 0.3 ^{ab}
Linaza + AOM	15.35 ± 0.6 ^a	8.01 ± 0.2 ^a	6.28 ± 0.1 ^a	14.88 ± 0.9 ^{ab}	6.30 ± 0.5 ^{ab}	4.02 ± 0.2 ^b	20.02 ± 0.8 ^a	6.47 ± 0.2 ^a	4.63 ± 0.3 ^b
FNDT + AOM	14.82 ± 0.8 ^a	7.92 ± 0.1 ^{ab}	4.95 ± 0.2 ^a	14.95 ± 1.1 ^{ab}	7.35 ± 0.5 ^{ab}	5.34 ± 0.4 ^a	20.24 ± 0.4 ^a	6.86 ± 0.2 ^a	6.98 ± 0.2 ^a

Los valores representan la media ± error estándar de tres repeticiones.

Letras diferentes por columna indican diferencia estadística significativa (Tukey $\alpha=0.05$).

(*) milimolar por gramos de muestra.

En el contenido colónico, los grupos Control y Linaza presentan los valores más altos de ácido acético; no obstante, entre los grupos AOM, Linaza + AOM y FNNT + AOM, no se observaron cambios estadísticamente significativos ($p>0.05$). El mismo patrón fue observado en los niveles de ácido propiónico y butírico para los grupos AOM, Linaza + AOM y FNNT + AOM.

Por último, en heces no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) entre los grupos experimentales AOM, Linaza + AOM y FNNT + AOM, en el contenido de ácido acético y propiónico; solo se observaron cambios significativos en el contenido de ácido butírico por parte del grupo FNNT + AOM (6.98 ± 0.2).

En resumen, éstos resultados sugieren que la administración de linaza y su FNNT no repercutieron de manera importante en la microbiota colónica de las ratas experimentales, ya que posiblemente el aporte de carbohidratos indigeribles por parte de los tratamientos administrados no fue suficiente para generar cambios significativos en los niveles de AGCC. Se sabe que la cantidad de sustrato disponible es uno de los principales factores que influye directamente en la producción de AGCC (Salvador *et al.*, 1993; Barry *et al.*, 1995).

Este patrón fue reportado por Jenab y Thompson (1996) en un estudio realizado con linaza en una dosis similar empleada en este trabajo, pero en un estudio a largo plazo.

7.2.4 Actividad de β -glucoronidasa

β -glucoronidasa es una enzima de origen microbiano que está involucrada en la activación y circulación enterohepática de varios procarcinógenos, carcinógenos, mutagenos y toxinas, componentes de la dieta y compuestos endógenos, por tales motivos su actividad ha sido asociada con el incremento en el desarrollo de cáncer de colon (Jenab *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha sugerido que dietas suplementadas con diferentes tipos de fibra contribuyen a disminuir el riesgo de padecer cáncer de colon a través del incremento de la microflora benéfica, producción de AGCC y reducción de la actividad de β -glucoronidasa (Vergara-

Castañeda *et al.*, 2010). Por estas razones, la actividad de β -glucoronidasa fue analizada en el contenido cecal, colónico y heces de ratas inducidas y no inducidas.

En la Figura 7.5 se muestra la actividad total de β -glucoronidasa del contenido cecal de los grupos experimentales. En dicho grafico se observó un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) de los grupos Linaza y Linaza + AOM con respecto al grupo de AOM.

En el contenido colónico, el grupo Linaza presentó el valor más altos de actividad total, el cual fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) con respecto al grupo AOM (Figura 7.6). Por su parte, en los grupos Linaza + AOM y FNDDT + AOM, también se observó un aumento en la actividad de β -glucoronidasa; no obstante, no fue estadísticamente diferente con respecto al grupo AOM.

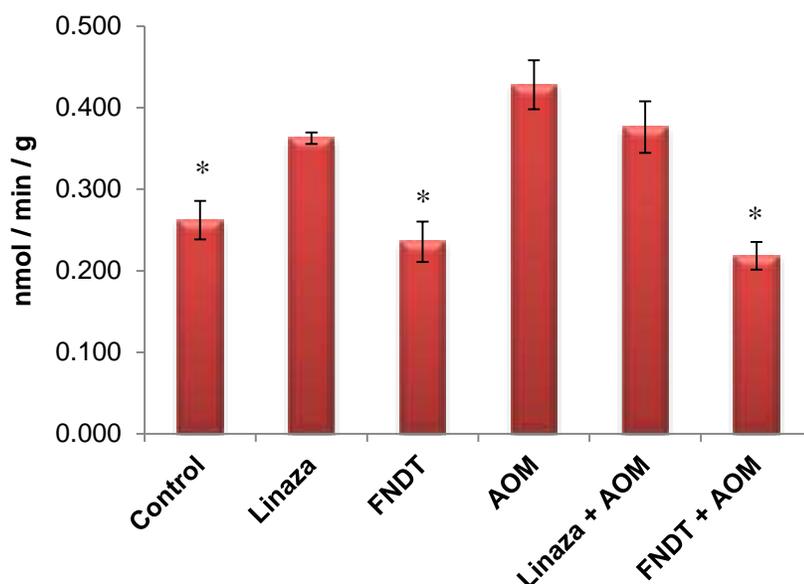


Figura 7.5 Actividad de β -glucoronidasa en el contenido cecal de ratas inducidas y no inducidas. Los resultados representan la media \pm el error estándar de dos experimentos independientes ($n=6$). Los valores son expresados como nmol de fenoltaleína liberados por min por gramo de muestra. (nmol/min/g). (*) Indica diferencia estadística significativa con respecto al grupo tratado con azoximetano (AOM) (Dunnett; $\alpha = 0.05$).

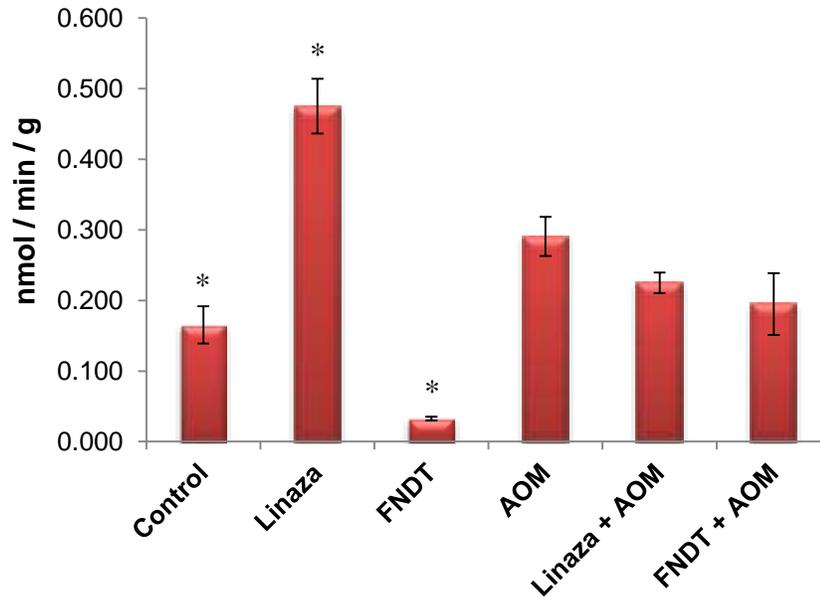


Figura 7.6. Actividad de β -glucuronidasa en el contenido colónico de ratas inducidas y no inducidas. Los resultados representan la media \pm el error estándar de dos experimentos independientes (n=6). Los valores son expresados como nmol de fenoltaleína liberados por min por gramo de muestra. (nmol/min/g). (*) Indica diferencia estadística significativa con respecto al grupo tratado con azoximetano (AOM) (Dunnett; $\alpha=0.05$).

Por último, en heces se observó el efecto contrario. Los grupos AOM + Linaza y AOM + FNDDT disminuyeron significativamente ($p<0.05$) la actividad total de β -glucuronidasa con respecto al grupo AOM. Además, en el grupo Linaza se observó un aumento de la actividad, no obstante, no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo AOM (Figura 7.7).

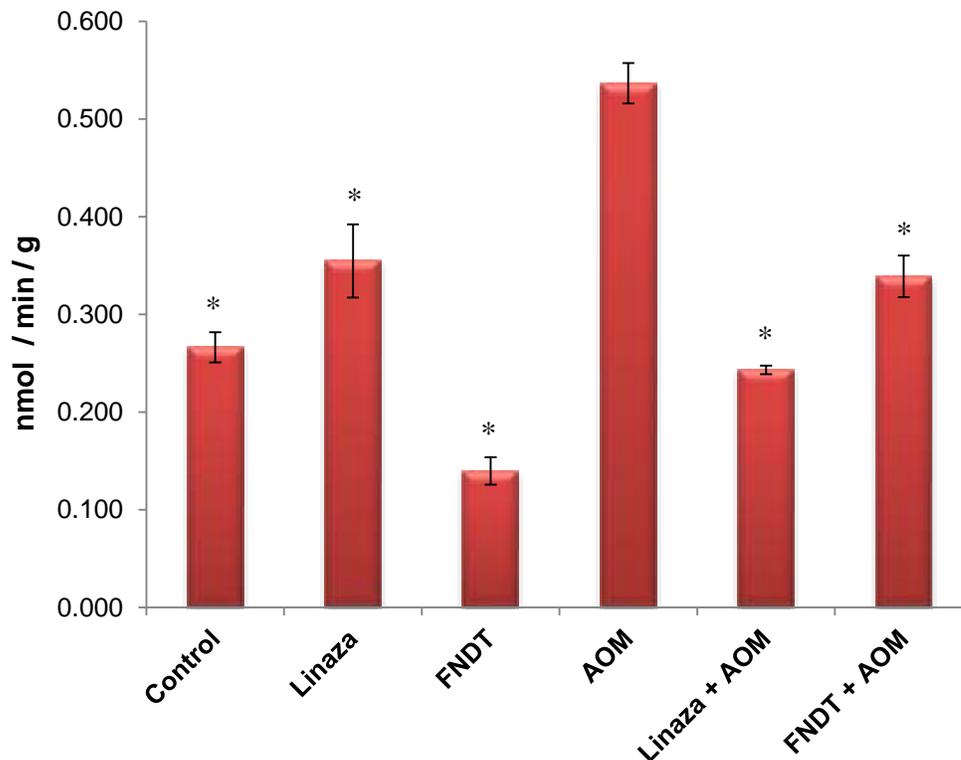


Figura 7.7 Actividad de β -glucuronidasa en heces de ratas inducidas y no inducidas. Los resultados representan la media \pm el error estándar de dos experimentos independientes (n=6). Los valores son expresados como nanomoles de fenoltaleína liberados por minuto por gramo de muestra (nmol/min/g). (*) Indica diferencia estadística significativa con respecto al grupo tratado con azoximetano (AOM) (Dunnnett; $\alpha=0.05$).

Los resultados obtenidos en este trabajo no concuerdan con lo reportado por Vergara-Castañeda *et al.* (2010) y Nakanishi *et al.* (2003), ya que el efecto que se encontró en el contenido cecal y colónico por parte del grupo Linaza fue paradójico, debido a que en este grupo se observó un incremento de la actividad de β -glucuronidasa y una disminución significativa ($p<0.05$) en la multiplicidad de FCA.

Vergara-Castañeda *et al.* (2010) reportaron una disminución en la actividad de β -glucuronidasa en ratas inducidas con AOM pero alimentadas con frijol común (Variedad Bayo Madero), lo cual explicaba la reducción de FCA, sugiriendo a dicha observación como un mecanismo quimioprotector. Asimismo, Nakanishi *et al.* (2003) demostró que en ratas inducidas con AOM y tratadas con almidón de maíz

rico en amilosa y una cepa de *Clostridium butyricum* disminuyó el número de FCA y la actividad de β -glucoronidasa en el contenido colónico.

Se ha demostrado que pectinas, grasa animal, carne y dietas ricas en grasa incrementan la actividad de β -glucoronidasa, igualmente la incidencia de cáncer de colon (Jenab *et al.*, 1999). Por lo tanto, se sugiere que β -glucoronidasa incrementa la circulación enterohepática de carcinógenos y mutagenos, lo cual puede incrementar la exposición de dichos carcinógenos en la mucosa colónica provocando un daño en el ADN de los colonocitos (Jenab *et al.*, 1999).

Sin embargo, Jenab *et al.* (1999), obtuvieron resultados paradójicos y similares a los encontrados en este trabajo. Los autores concluyeron que el consumo de linaza incrementó la actividad de β -glucoronidasa en el contenido cecal; además, observaron una correlación positiva entre la excreción urinaria de lignanos y la actividad de β -glucoronidasa, lo cual sugirió que la actividad de β -glucoronidasa estuvo inducida por lignanos.

Asimismo, Jenab y Thompson (1996) demostraron que el consumo de linaza disminuyó la multiplicidad de FCA; el cual estuvo asociado al incremento dosis-dependiente de la actividad de β -glucoronidasa en el contenido cecal y a la excreción urinaria de lignanos, pero no a la producción de AGCC o disminución del pH.

Los lignanos son compuestos difenólicos de las plantas superiores conformados por el acoplamiento de dos residuos de alcohol coniferílico, los cuales están presentes en la pared celular de las plantas (Touré y Xueming, 2010). Además, se sabe que por acción de las enzimas de origen microbioano del colon son biotransformados a enterodiol (ED) y enterolactona (EL), denominados lignanos de mamíferos (Jenab *et al.*, 1999). Una vez que los lignanos son biotransformados, éstos son absorbidos en colon y transportados al hígado, en dónde son conjugados con el ácido glucoronico para ser excretados nuevamente en el tracto digestivo vía bilis. De vuelta en el colon, son desconjugados por medio de la enzima β -glucoronidasa (Jenab *et al.*, 1999); lo anterior puede explicar el incremento de su actividad observado en este estudio.

Los lignanos de mamíferos (ED y EL) poseen mayor capacidad antioxidante que sus precursores. Prasad (2000) demostró que los lignanos de mamíferos ED y EL presentaron 3.95 y 3.43 veces más capacidad antioxidante que su precursor diglucósido de secoisolariciresinol (SDG). Esto sugiere que la biotransformación de lignanos provocó un aumento del estatus antioxidante en el colon de las ratas, lo cual se vio reflejado en la disminución de la multiplicidad de FCA en estadios tempranos de cáncer de colon. Esta hipótesis puede ser soportada de acuerdo a los resultados obtenidos mediante el proceso de digestión *in vitro*.

Al respecto, algunos autores han señalado que el transporte de antioxidantes dietarios a través de tracto gastrointestinal puede ser una función esencial de la FD, ya que alrededor del 50% de los antioxidantes dietarios, principalmente polifenoles, atraviesan el intestino delgado sin ser absorbidos debido a que se encuentran asociados a la FD (Saura-Calixto, 2011). En el caso de la linaza, los lignanos se encuentran en la pared celular de las células de la semilla, en una proporción que va de 9 a 30 mg/g de harina desgrasada (Touré y Xueming, 2010). En el colon, los antioxidantes dietarios pueden ser liberados de la matriz de la FD por acción de las enzimas de la microbiota, produciendo metabolitos antioxidantes y un ambiente antioxidante. Estudios en animales y humanos han demostrado propiedades prometedoras de FD ricas en compuestos fenólicos en la prevención de factores de riesgo asociados a enfermedades cardiovasculares e intestinales, incluyendo la prevención de cáncer de colon (Saura-Calixto, 2011).

7.3 Análisis de la expresión de genes asociados al desarrollo de cáncer de colon

Para este estudio se analizaron 12 genes involucrados en el cáncer de colon y un gen constitutivo, gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (*gadph*) (Cuadro 6.1, sección Materiales y Métodos). Sin embargo, de los genes propuestos a analizar solamente fue posible detectar 6 y el gen constitutivo. De acuerdo a la metodología empleada (RT-PCR) fue posible observar la expresión de genes involucrados en apoptosis y arresto al ciclo celular, como *bcl-2*, *bax*, *caspasa 3*, *p21*, *p53* y *rb* en el

colon distal de ratas de los grupos Control, AOM, Linaza + AOM y FNNT + AOM (Figuras 7.8 y 7.9).

La expresión de *p53* y *p21* no fue observada en el grupo AOM. *p53* es un gen que puede ser expresado por daño al ADN, por lo tanto, su expresión induce arresto al ciclo celular en las fases G1 y G2, pero si el daño es muy severo la expresión de *p53* puede inducir apoptosis. Feregrino-Pérez *et al.* (2008) utilizando la misma cepa de ratas reportaron la sobre expresión de *p53* en ratas tratadas con AOM; observaron que la aplicación de un extracto de polisacáridos de frijol común negro disminuyó la expresión de *p53*. Esta diferencia puede ser explicada por la falta de una mutación en el gen *p53* en las ratas tratadas con AOM. Algunos autores han reportado una reactividad positiva por inmunohistoquímica para *p53* en FCA únicamente en el 42% de los animales (27/65) (Stopera y Bird, 1993).

El gen *p21* también está implicado en arresto al ciclo celular a través de la inhibición del complejo ciclina dependiente de quinasa. Además, la expresión de este gen es regularmente inducida por *p53*, como se observó en el grupo Linaza + AOM, lo cual sugiere que la linaza induce la expresión de ambos genes. Este hecho puede explicar la reducción de la multiplicidad de las criptas. Sin embargo, en el grupo FNNT + AOM, la expresión de *p21* fue independiente de *p53*, induciendo arresto al ciclo celular. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura (Mahyar-Roemer y Roemer, 2001; Feregrino-Pérez *et al.*, 2008). El grupo FNNT + AOM mostró incremento en la expresión *caspasa 3*, disminución de la expresión de *bcl-2* y aumento de la expresión de *bax*; tales hechos sugieren que la FNNT indujo apoptosis mitocondrial.

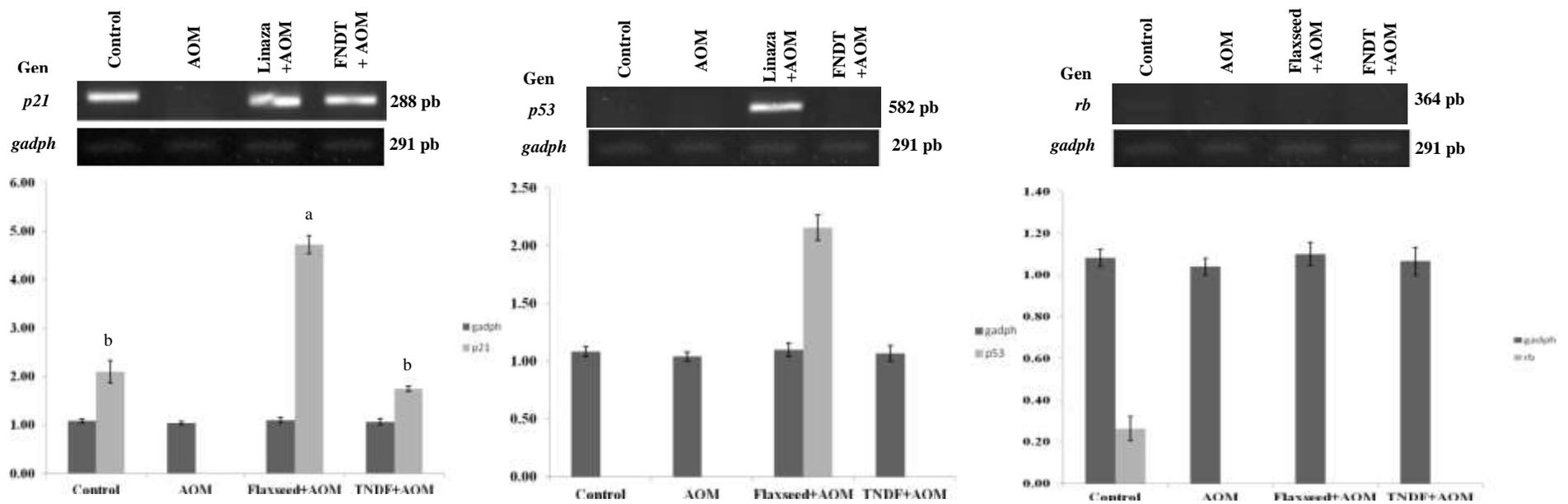


Figura 7.8 Expresión y normalización de genes involucrados en arresto al ciclo celular.

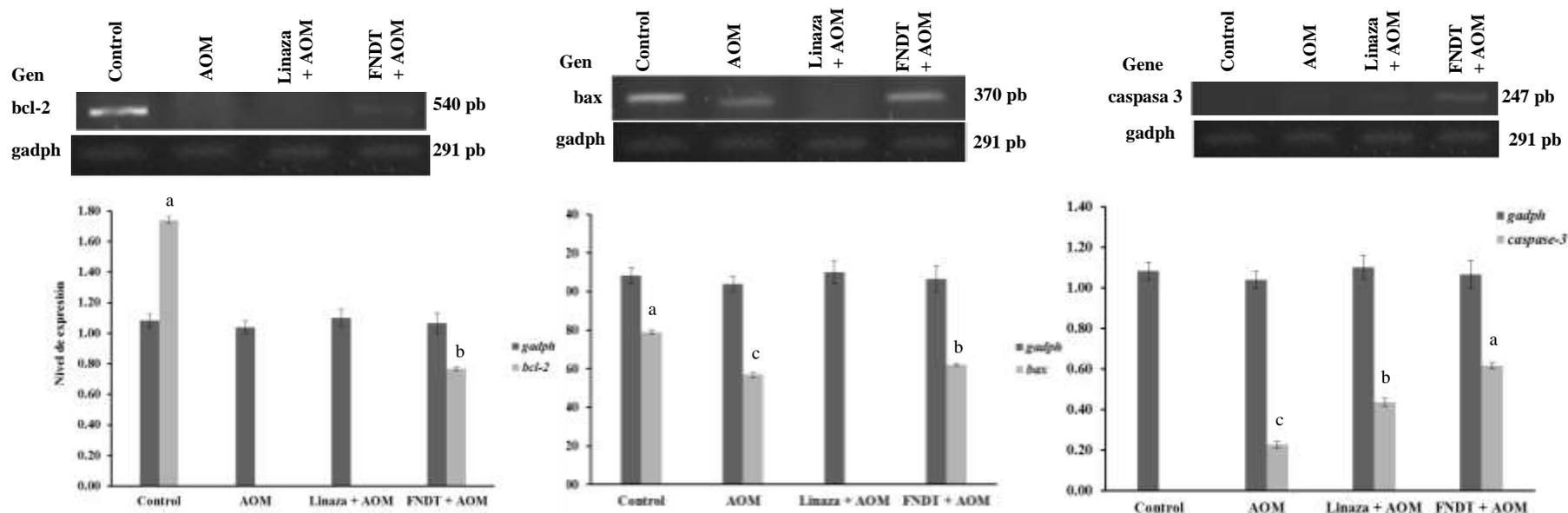


Figura 7.9 Expresión y normalización de genes involucrados en apoptosis.

La expresión de *rb* fue reprimida en el grupo AOM, mientras que, los tratamientos linaza y su FNDT no influyeron en su expresión. El gen *rb* es un gen constitutivo expresado en células que están en ciclo celular o no, y la pérdida de su función está implicada en el desarrollo de otros tipos de cáncer, como el de ojo, pulmón, vejiga, próstata y cerebro (Zhang *et al.*, 2000).

Aunque la linaza fue el único tratamiento que significativamente disminuyó la multiplicidad de las criptas, el análisis de la expresión de genes mostró que la dosis sugerida de linaza (2 cucharadas/día) y su FNDT modularon la expresión de genes involucrados en arresto al ciclo celular, proliferación y apoptosis mitocondrial. Este efecto no puede ser atribuido a la fermentación de la fibra dietética (FD); no obstante, se ha indicado que la FD puede tener otra función fisiológica esencial. Es decir, la FD puede funcionar como un vehículo de antioxidantes dietarios, ya que aproximadamente 50% de los antioxidantes dietarios, principalmente compuestos fenólicos, pueden alcanzar el colon al igual que la FD (Saura-Calixto, 2011). Asimismo, se ha informado que los antioxidantes dietarios asociados a FD pueden inducir un efecto quimiopreventivo contra el desarrollo de cáncer de colon mediante diferentes mecanismos: generando un ambiente antioxidante en el colon, inhibiendo el daño oxidativo al ADN e inflamación, induciendo apoptosis y previniendo la formación de lípidos (Saura-Calixto, 2011).

De acuerdo a los resultados de bioaccesibilidad, es posible sugerir que los compuestos fenólicos pueden ser los responsables de la expresión de los genes analizados. Los lignanos son compuestos difenólicos encontrados en las plantas superiores, formados por el acoplamiento de dos residuos de alcohol coniferilico, los cuales se encuentran en la pared celular de las plantas (Touré y Xueming, 2010). Se ha sugerido que los lignanos son el principal compuesto responsable de la actividad antioxidante y del efecto anticancer en la linaza, y que además este alimento vegetal es una fuente importante de dichos compuestos fenólicos, particularmente de un lignano denominado diglucosido de secoisolariciresinol (SDG) (Touré y Xueming, 2010). El SDG es convertido por las bacterias del colon humano (y en el colon de otros animales) en lignanos de mamífero llamados enterodiol (ED) y enterolactona (EL) (Touré y Xueming, 2010). Se ha informado que una dosis de 10 mg/Kg y tres

veces por semana de EL reduce la expresión de células colo 201 (células de cáncer de colon humano) en ratones atímicos desnudos, ratón de laboratorio que es calvo, carece de una glándula del timo normal y tiene un sistema inmunitario defectuoso debido a una mutación genética; estos ratones se usan a menudo en la investigación del cáncer porque no rechazan las células tumorales de los ratones u otras especies (Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, 2014). En base a esos resultados, los cuales fueron obtenidos mediante análisis de Western blot, los autores sugirieron que la supresión de tumores fue inducida por apoptosis mitocondrial y disminución de la proliferación celular (Danbara *et al.*, 2005).

7.3.1 Mecanismo de acción propuesto de los tratamientos, linaza y su FNDT (fracción no digerible total), sobre ratas inducidas con AOM

En las Figuras 7.10 y 7.11 se ilustra el posible mecanismo de acción de los tratamientos (Linaza y FNDT) sobre las ratas inducidas con azoximetano. De acuerdo a los resultados se propone que el efecto quimioprotector de los tratamientos (linaza y su FNDT) no puede ser atribuido a la fermentación de carbohidratos indigeribles, como fibra dietética, debido a que no se encontraron cambios estadísticamente significativos en los valores de pH en las diferentes secciones del colon analizadas (cecal y colónico) y en heces de las ratas; además, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de ácidos grasos de cadena corta, principalmente, en ácido propiónico y butírico.

En relación a los resultados obtenidos por el ensayo de bioaccesibilidad, se encontró que los tratamientos (Linaza y su FNDT) contienen compuestos fenólicos con baja bioaccesibilidad, y que éstos además presentan capacidad antioxidante elevada posterior al proceso de digestión *in vitro*; por lo tanto, se propone que los compuestos fenólicos de linaza y FNDT, expresados como fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados, podrían ser los responsables del efecto quimioprotector; no obstante, no se descarta a los lignanos, ya que se ha informado de su alto poder antioxidante y su efecto preventivo contra el cáncer de colon (Touré and Xueming, 2010).

Los resultados de bioaccesibilidad sugieren que los compuestos fenólicos, ya mencionado, serían conducidos por la fibra dietética de los tratamientos (Linaza y FNNDT) al colon, en donde serían biotransformados por la microbiota, produciéndose otros compuestos con igual o mayor capacidad antioxidante, éstos compuestos incrementarían el estatus antioxidante en el colon, el cual está relacionado por la prevención de algunas enfermedades, incluyendo el cáncer de colon, o bien podrían influir o participar en la expresión de algunos genes relacionados con el desarrollo del cáncer de colon.

En base a los resultados obtenidos por la metodología de RT-PCR, se sugiere que la linaza a la dosis de consumo (dos cucharadas) presenta un efecto preventivo contra el cáncer de colon, debido a que incrementó la expresión de *p53* y *p21*. El gen supresor de tumor *p53* generalmente es expresado por algún daño al ADN; no obstante, existen reportes que indican que su expresión también puede ser inducida por agentes quimiopreventivos naturales. La expresión de *p21* es transcripcionalmente regulada por el gen supresor de tumor *p53*, debido a un daño al ADN y/o por varios mecanismos independientes de *p53*. El inhibidor de los complejos ciclina dependiente de quinasa *P21*^{cip1/waf1} (como también se le conoce), inhibe los complejos Cdk/Ciclin, lo cual impide río abajo la fosforilación de *rb* generándose arresto al ciclo celular en las fases G1-S y G2-M (Figura 7.10) (Poole *et al.*, 2004).

La fracción no digerible total (FNNDT) únicamente incrementó la expresión de *p21*, sugiriendo también arresto al ciclo celular en las fases G1-S y G2-M, como se mencionó anteriormente. Además, se encontró que la FNNDT disminuyó la expresión de *bcl-2* (gen antiapoptótico) e incrementó la expresión de *bax* (gen proapoptótico), lo cual indujo la salida del citocromo C de la mitocondria hacía el citosol, una vez en el citosol, el citocromo C interactuó con el complejo apoptosómico, el cual está conformado por Apaf-1 y pro-caspasa-9, propiciando la activación de la *caspasa-9* (caspasa inductora), finalmente *caspasa-9* activó a *caspasa-3* (caspasa efectora) induciendo apoptosis vía mitocondria (Figura 7.11). En resumen, se propone que los mecanismos de acción fueron arresto al ciclo celular por parte de la linaza y su

FNDT; sin embargo, también se encontró que la FNDT indujo apoptosis vía mitocondria.

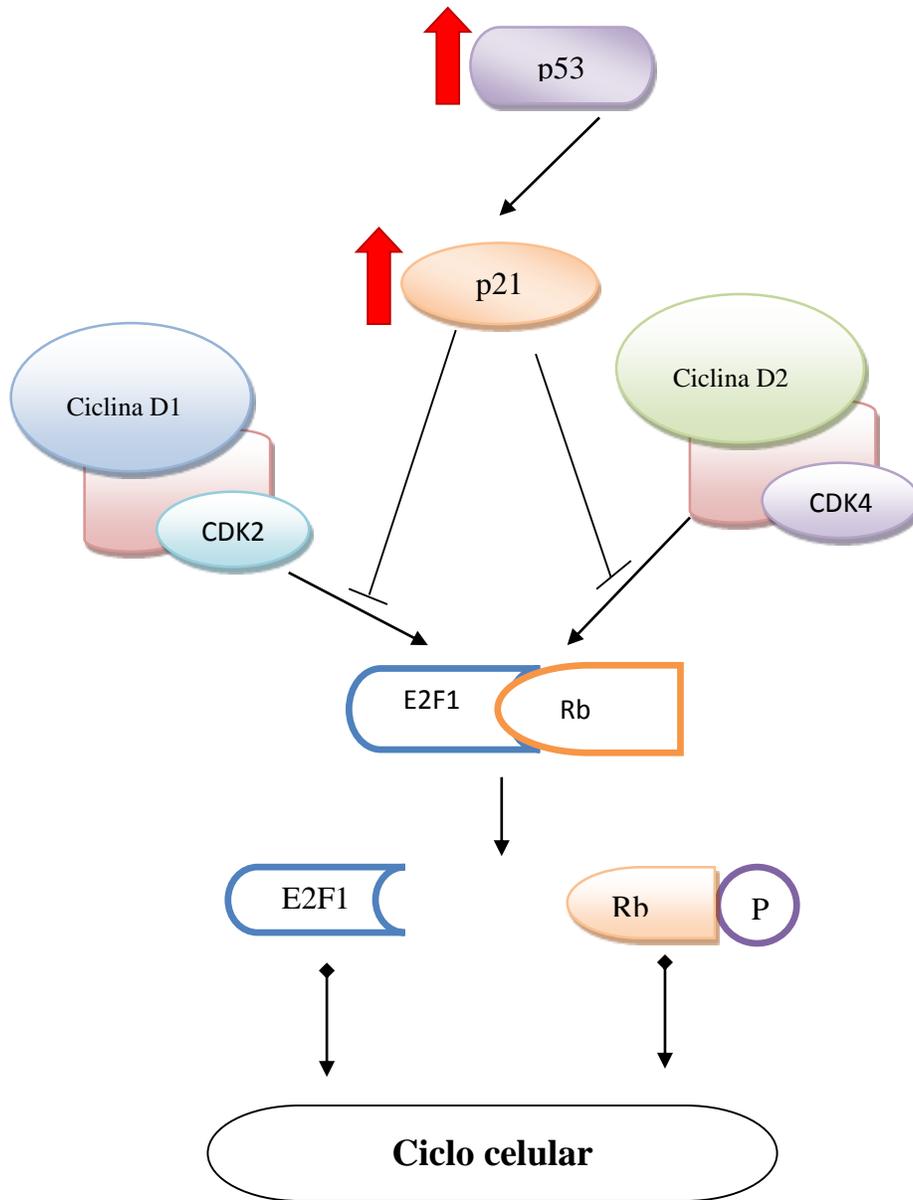


Figura 7.10 Esquema del mecanismo de acción propuesto de linaza y su fracción no digerible total (FNDT) sobre el estadio temprano de cáncer de colon.

↑ Representa un incremento en la expresión del gen

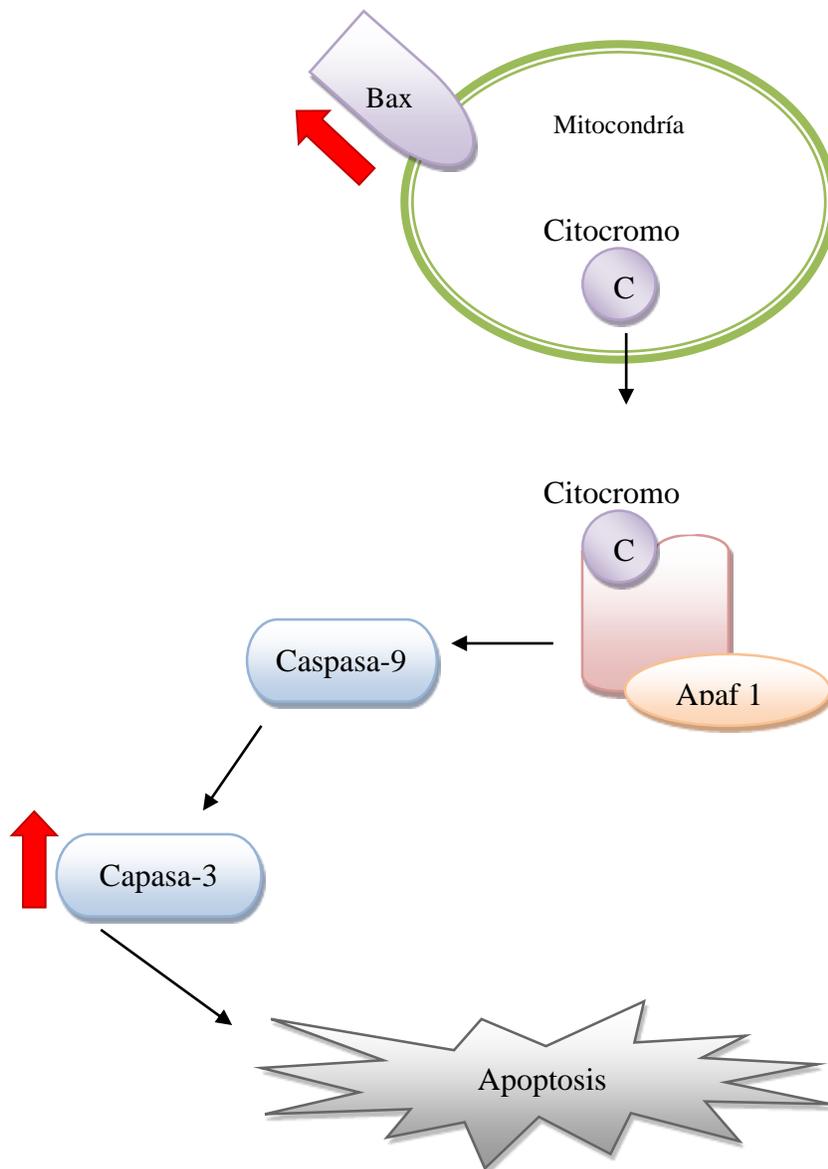


Figura 7.11 Esquema del mecanismo de acción propuesto de la fracción no digerible total (FNDT) sobre el estadio temprano de cáncer de colon.

↑ Representa un incremento en la expresión del gen

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que la linaza presenta cantidades significativas de compuestos fenólicos, debido a que los extractos metanólicos presentaron buena habilidad reductora y secuestradora de radicales libres. Además, después del proceso de digestión *in vitro*, los valores de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante incrementaron hasta 4.6 veces; sin embargo, el índice de bioaccesibilidad (IB%) y el remanente de capacidad antioxidante contenida en la fase acuosa (RFA%) indicaron que los compuestos fenólicos en la linaza y su capacidad antioxidante presentan baja biodisponibilidad, sugiriendo que la mayoría de los compuestos fenólicos en la linaza llegarían al colon donde tendrían algún efecto benéfico.

El ensayo *in vivo* mostró que la linaza entera y a la dosis de consumo analizada (16 g/kg), disminuyó la multiplicidad de criptas; no obstante, el ensayo de RT-PCR mostró que ambos tratamientos, linaza y su fracción no digerible total (FNDT), influyeron la expresión de genes implicados en el desarrollo de cáncer de colon, como *p53*, *p21*, *caspasa-3*, *bax* y *bcl-2*. Es decir, la linaza incrementó la expresión de *p53* y *p21*, generando arresto al ciclo celular en las fases G1-S y G2-M; la FNDT incrementó la expresión de *p21*, pero independiente de *p53*, ocasionando, también, arresto al ciclo celular; asimismo, la FNDT disminuyó la expresión de *bcl-2* e incrementó la expresión de *bax* y *caspasa 3*, induciendo apoptosis vía mitocondria.

El efecto benéfico contra el desarrollo de cáncer de colon presentado por la linaza y su FNDT es atribuido a los compuestos fenólicos, como lignanos, ácido p-hidroxibenzoico, ácido ferúlico, entre otros, ya que los datos de bioaccesibilidad mostraron la baja biodisponibilidad de los compuestos fenólicos y de la capacidad antioxidante.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Alabaster, O., Z. Tang, and N. Shivapurkar. 1996. Dietary fiber and the chemopreventive modelation of colon carcinogenesis. *Mutat Res.* 350:185-197.
- Albert, B., D. Bray, J. Lewis, M. Rark, K. Robert, and J. Watson. 2000. *Biología molecular de la célula*. 3ª Ed. Omega, México. p 1345-1347, 1365, 1378-1382.
- American Association of Cereal Chemists (AACC). 2001. The definition of dietary fiber. Report of the dietary fiber definition committee to the board of directors of the American Association of Cereal Chemists. *Cereal Foods World*. 46:112-126.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC) 2002. *Official Methods of Analysis* (17th ed). Washington, DC. EEUU. Method: 920.105, 925.23, 945.46, 991.43.
- Baderschneider, B., and P. Winterhalter. 2001. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *J. Agri. Food Chem.* 49:2788–2798.
- Barrera, H., S. Martínez, and R. Ortíz. 2003. Diagnóstico molecular del cáncer. *Rev Invest Clin.* 55:128-137.
- Barry, J-L., C. Hoebler, G. T. Macfarlane, S. Macfarlane, J. C. Mathers, K. A. Reed, P. B. Mortesen, I. Nordgaard, I. R. Rowland, and C. J. Rummey. 1995. Estimation of the fermentability of dietary fibre *in vitro*: a European interlaboratory study. *Br. J. Nutr.* 74:303-322.
- Beal, M. F. 2003. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 991:120-131.
- Bergman, E. N. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70:567-590.
- Bird R. P. 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* 30:147-151.
- Bird R. P., and C. K. Good. 2000. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Tox. Lett.* 112-113:395-402.

- Bhatty, R. S., and P. Cherdklatgumchal. 1990. Compositional analysis of laboratory-prepared and commercial samples of linseed meal and of hull isolated from flax. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67:79-84.
- Bravo, L. 1998. Polyphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56:317-333.
- Burda, S., and W. Oleszek. (2001). Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *J. Agr. Food Chem.* 49:2774-2779.
- Cardador-Martínez, A., E. Castaño-Tostado, G. Loarca-Piña. 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds in the common bean (*Phaseolus Vulgaris*) against aflatoxin B1. *Food Addit. Contam.* 19:62-69.
- Casimiro, C. 2002. Factores etiopatogénicos en el cáncer de colorrectal. *Nutr. Hosp.* 3:128-138.
- Champ, M. M. J. 2002. Non-nutrient bioactive substances of pulses. *Br. J. Nutr.* 88:307-319.
- Chaturvedi, R. K., and M. F. Beal. 2008. PPAR: a therapeutic target in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 106:506-518.
- Chau, B. N., and J. Y. Wang. 2003. Coordinated regulation of life and death by RB. *Nature Rev. Cancer.* 3:130-138.
- Clayson, D. B. 2000. Toxicological carcinogenesis. Lewis Publisher (Ed). p 2-5.
- Colak, E. 2008. New markers of oxidative damage to macromolecules. *J. Med. Biochem.* 27:1-16.
- Cummings, J. H. 1993. The effect of dietary fiber on fecal weight and composition. In: G. Spiller, and Arbor, A. *Handbook of dietary fiber in human nutrition.* p. 23. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Cummings, J. H., and G. T. MacFarlane. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.* 70:443-459.
- Cummings, J. H. and G. T. MacFarlane. 1997. Colonic microflora: nutrition and health. *Nutrition.* 13:476-478.
- Cummings, J. H., S. A. Bingham, K. W. Heaton, and M. A. Eastwood. 1992. Fecal weight, colon cancer risk, and dietary intake of nonstarch polysaccharides (dietary fiber). *Gastroenterology* 103:1783-1789.
- Danbara, N., T. Yuri, M. Tsujita-Kyutoku, R. Tsukamoto, N. Uehara, and A. Tsubura. 2005. Enterolactone induces apoptosis and inhibits growth of colon

- 201 human colon cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Anticancer Res.* 25:2269-2276.
- Das, P., D. Jain, K. Vaiphei, and J. D. Wig. 2007. Aberrant crypt foci – Importance in colorectal carcinogenesis and expression of p53 and mdm2: a changing concept. *Dig Dis Sci.* 53:2183-2188.
- Daun, J. K., J. V. Barthelet, T. L. Chornick, and S. Duguid. 2003. Structure, composition, and variety development of flaxseed. In: S.C. Cunnane, and L.U. Thompson (Ed) *Flaxseed in Human Nutrition*. pp. 1-40. AOC S Press, Champaign, Illinois.
- Delzenne, N. M. 2003. Oligosaccharides: state of the art. *Proc. Nutr. Soc.* 62:177-182.
- Díaz, T., M. Faxas, and M. Arango. 1998. Factores etiopatogénicos y moleculares en la génesis del cancer. *Rev. Cubana Oncol.* 14:42-50.
- Dinnella, C., P. Minichino, A. M. D'Andrea, and E. Monteleone. 2007. Bioaccessibility and Antioxidant Activity Stability of Phenolic Compounds from Extra-Virgin Olive Oils during *in Vitro* Digestion. *J. Agr. Food Chem.* 55:8423-8429.
- Donalson, S. M. 2004. Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr J.* 3:19.
- Duval, A., and R. Hamelin. 2002. Genetic instability in human mismatch repair deficient cancers. *Ann. Genet.* 45:71-75.
- Englyst, H. N., and J. H. Cummings. 1988. Improved method for the measurement of dietary fiber as nonstarch polysaccharide in plant foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71:808-814.
- Feregrino-Pérez, A. A. 2008. Caracterización y efecto de polisacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad negro 8025 sobre el estadio temprano de cáncer de colon. Querétaro, México. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis de para obtener el título de doctor en ciencias..
- Feregrino-Pérez, A. A., L. C. Berumen, G. García-Alcocer, R. G. Guevara-González, M. Ramos-Gómez, R. Reynoso-Camacho, J. A. Acosta-Gallegos, and G. Loarca-Piña. 2008. Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on azoximethane-induced coloncancer. *J. Agric. Food Chem.* 56:8737-8744.
- Ferguson, L. R., R. R. Chavan, and P. J. Harris. 2001. Changing Concepts of Dietary Fiber: Implications for Carcinogenesis. *Nutr. Cancer.* 39:155-169.

- Figuerola, F., M. L. Hurtado, A. M. Estévez, I. Chiffelle, F. Asenjo, 2005. Fibre concentrates from Apple pomace and citrus peel as potencial fibre source for food enrichment. *Food Chem.* 91:395-401.
- Figuerola, F., O. Munoz, and A. M. Estévez. 2008. Flaxseed as a source of bioactive compounds for food processing. *Agro Sur* 36:1-10.
- Firuzi, O., A. Lacanna, R. Petrucci, G. Marrosu, and L. Saso. 2005. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *BBA-Gen. subjects* 1721:174-184.
- Folkman, J. 2002. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 29:15-18.
- Gariglio, P., y E. Orozco. 2000. Genética y biomedicina molecular. Orozco (1ª Ed). p 181-198. Limusa. México, D. F.
- Goñi, I., y E. López-Oliva, 2006. Carbohidratos y salud gastrointestinal. In: M. F. Lajalo y E. W. Menezes. *Carbohidratos en Alimentos Regionales.* p 289-308. Editora da Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo.
- Goñi. I., y N. Martín-Carrón. 2001. Fermentación colónica de fibra dietética y almidón resistente. In: F. M. Lajolo, F. Saura-Calixto, E. Witting de Penna, E. W. Menezes (Ed.). *Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos.* p 311-338. CYTED/CNPq/Varela, Sao Paulo.
- Grife, R., C., Swallow, and B. Bapat, 1998. Molecular biology of colorectal cancer. *Current Prob. Cancer.* 2:1-68.
- Hall, C. 2001. Sources of natural antioxidants: oilseeds, nut, cereal, legumes, animal products and microbial source. In: J. Porkorny, N. Yanishlieva, and M. Gordon (Ed). *Antioxidants in foods practical applications.* pp 159-209. CRC Press. Boca Raton.
- Hall, C., M. C. Tulbek, and Y. Xu, 2006. Flaxseed. *Ad. Food Nutr. Res.* 51:1-97.
- Haminiuk, C. W. I., G. M. Maciel, M. S. V. Plata-Oviedo, and R. M. Peralta. 2012. Phenolic compounds in fruits – an overview. *Int. J. Food Sci. Tech.* 47:2023-2044.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2000. The hallmark of cancer. *Cell.* 100:57-70.
- Heinecke, J. W. 1997. Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 8:268–274.
- Hernández-Salazar, M., P., Osorio-Diaz, G., Loarca-Piña, R., Reynoso-Camacho, J. Tovar, and L. A. Bello-Pérez. 2010. *In vitro* fermentability and antioxidant

capacity of the indigestible fraction of cooked black beans (*Phaseolus vulgaris* L.), lentils (*Lens culinaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). J. Sci. Food Agric. 90:1417-1422.

Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. 2014. <http://www.cancer.gov/diccionario?cdrid=44579>.

INEGI. 2012. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. www.inegi.gob.mx.

Institute of medicine (IOM). 2001. Dietary reference intake: proposed definition of dietary fiber. National Academies Press. Washington, DC.

Jain, S. K. Superoxide dismutase overexpression and cellular oxidative damage in diabetes. 2006. A commentary overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes. Free Radical Biol. Med. 41:1187-1190.

Jan, G. A. S. Belzacq, D. Haouzi, A. Rouault, D. Métivier, G. Kroemer, and C. Brener. 2002. Propionibacteria induces apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. Cell Death Differ. 9:179-188.

Jenab, M., and L. U. Thompson. 1996. The influence of flaxseed and lignans on colon carcinogenesis and β -glucuronidase activity. Carcinogenesis. 17:1343-1348.

Jenab, M., and L. U. Thompson. 2000. Phytic acid in wheat bran effects colon morphology, cell differentiation and apoptosis. Carcinogenesis. 21:1547-1552.

Jenab, M., S. E. Richard, L. J. Orcheson, and L. U. Thompson. 1999. Flaxseed and lignans increase cecal β -glucuronidase activity in rats. Nutr Cancer. 33:154-158.

Kislev, M., Simchoni, O., Melamed, Y. and Maroz, L. 2011. Flax seed production: evidence from the early Iron Age site of Tel Beth-Shean, Israel and from written sources. Veget. Hist. Archaeobot. 20:579-584.

Kurtzman, R.H., and W.U. Halbrook, 1970. Polysaccharide from dry Navy beans, *Phaseolus vulgaris*: Its isolation and stimulation of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. 20:715-719.

Liu, J., and A. Mori. 2006. A. Oxidative damage hypothesis of stress-associated aging acceleration: neuroprotective effects of natural and nutritional antioxidants. Res. Commun. Biol. Psychiat. Neurosci. 30-31:103-119.

- Luo, T., and Y. Tang, Q. Shan, Y. Lu, and Y. Pan. 2003. Research into a new process for extraction of flaxseed gum. *Min. Meta* 1. 12:92-95.
- López-Oliva, M. E., A. Agis-Torres, P. García-Palencia, I. Goñi, and E. Muñoz-Martínez. 2006. Induction of epithelial hypoplasia in rat cecal and distal colonic mucosa by grape antioxidant dietary fiber. *Nutr. Res.* 26:651-658.
- López-Oliva, M. E., A. Agis-Torres, I. Goñi, and E. Muñoz-Martínez. 2010. Grape antioxidant dietary fibre reduced apoptosis and induced a pro-reducing shift in the in the glutathione redox state of the rat proximal colonic mucosa. *Br. J. Nutr.* 103:1110-1117.
- Mahyar-Roemer, M., y K. Roemer. 2001. p21Waf1/Cip1 can protect human colorectal carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. *Oncogene.* 20:3387-3398.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy, and L. Jimenez. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79:727-747.
- Manoj, G., B. S. H. Thampi, S. Leelamma, and P. V. G. Menon. 2001. Effect of dietary fiber on the activity of intestinal and fecal beta-glucuronidase activity during 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Plant Food Human Nutr.* 56:13-21.
- Martínez-Flores, H. E., E. S. Barrera, M. G. Garnica-Romo, C. J. C. Penagos, J. P. Saavedra, and R. Macazaga-alvarez. 2006. Functional characteristics of protein flaxseed concentrate obtained applying a response surface methodology. *Food Chem Toxic.* 71:495-498.
- Mathers, J. C. 2002. Pulses and carcinogenesis: potential for the prevention of colon, breast and other cancers. *Br. J. Nutr.* 88:273-279.
- Michels, K. B. 2005. The role of nutrition in cancer development and prevention. *Int. J. Cancer.* 114:163-165.
- Montoro, P., A. Braca, C. Pizza, and N. De Tommasi. 2005. Structure and antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chem.* 92:349-355.
- Montenegro, M. A., S. Negrete, W. J. Lertora, and M. S. Catouno. 2003. Focos de criptas displásicas inducidas con 1,2-dimetilidrazina en intestino grueso de ratas tratadas con molibdeno y tungsteno. *Rev. Vet.* 1:19-29.
- Moon, J. K. and T. Shibamoto. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *J Agric Food Chem* 57:1655-1666.

- Moreira, P., M. A. Smith, X. Zhu, K. Honda, H.-G. Lee, G. Aliev, and G. Perry. 2005. Since oxidative damage is a key phenomenon in Alzheimer's disease, treatment with antioxidants seems to be a promising approach for slowing disease progression. *Oxidative damage and Alzheimer's disease: are antioxidant therapies useful?* *Drug News Perspect.* 18:13-19.
- Mukherjee, A. B.; Z. Zhang, B. S. Chilton. 2007. Uteroglobin: steroid-inducible immunomodulator protein that founded the Secretoglobin superfamily. *Endocrine Rev.* 28:707-725.
- Naczki, M., and F. Shahidi, 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr A.* 1054:95-111.
- Naczki, M., T. Nichols, D. Pink, and F. Sosulski. 1994. Condensed tannins in canola hulls. *J. Agric. Foods Chem.* 42:2196.
- Naito, Y., K. Uchiyama, and T. Yoshikawa. 2006. Oxidative stress involvement in diabetic nephropathy and its prevention by astaxanthin. *Oxid. Stress Disease.* 21:235-242.
- Nakanishi, S., K. Kataoka, T. Kuwahara, and Y. Ohnishi. 2003. Effects of high amylose maize starch and *Clostridium butyricum* on metabolism in colonic microbiota and formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Microbiol. Immunol.* 47:951-958.
- Nenadis, N., L-F. Wang, M. Tsimidou, and H-Y. Zhang. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay. *J. Agric. Food Chem.* 52:4669-4674.
- Nigg, E. A. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:21-32.
- Nochera, C. L., and O. Alabaster, 2009. Dietary combinations of wheat bran, flax and soy reduce ACF in rat model. *Cereal Foods World.* 54:66-69.
- Nyman, M. 1986. Fermentation of dietary fiber in the intestinal tract: comparison between man and rat. *Br. J. Nutr.* 55:487-496.
- Önning, G. 2007. Carbohydrates and the risk of cardiovascular disease. In: G. C. Biliaderis and S. M. Izydorczyk. *Functional food carbohydrates.* p 291-319. CRC Boca Raton USA.
- Oomah, B. D., and G. Mazza. 1993. Flaxseed proteins –a review. *Food Chem.* 48:109-114.

- Oomah, B. D., and G. Mazza. 1998. Productos de linaza para la prevención de enfermedades. In: G. Mazza (Ed.) Alimentos funcionales, aspectos bioquímicos y procesados. p 93-140. Acribia S.A., España, Zaragoza.
- Oomah, B. D., G. Mazza, and E. O. Kenaschuk. 1996. "Flavonoide content of flaxseed. Influence of cultivar and environment". *Euphytica*. 90:163-167.
- Oomah, B. D.; A. Cardador-Martínez, G. Loarca-Piña. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus Vulgaris* L). *J. Sci. Food Agric*. 85:935-942.
- Palafox-Carlos, H., J. F. Ayala-Zavala, and G. A. González-Aguilar. 2011. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *J. Food Sci*. 76:6-15.
- Paz-Elizur, T., Z. Sevilya, Y. Leitner-Dagan, D. Elinger, L. C. Roisman, Z. Livneh. 2008. DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention. *Cancer Lett*. 266:60-72.
- Pérez-Jiménez, J., S. Arranz, M. Taberero, M. E. Díaz- Rubio, J. Serrano, I. Goñi, and F. Saura-Calixto. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Res. Int*. 41:274-285.
- Perse, M., and A. Cerar. 2011. Morphological and molecular alterations in 1, 2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011:1-14.
- Poole, A. J., D. Heap, R. E. Carroll, and A. L. Tyner. 2004. Tumor suppressor functions for Cdk inhibitor p21 in the mouse colon, *Oncogene*. 23:8128-8134.
- Potter, J. D. 1999. Colorectal cancer: molecules and populations. *J. Natl. Cancer Inst*. 91:916-932.
- Prasad, K. 2000. Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol, and enterolactone. *Int. J. Angiol* 9:220-225.
- Preedy, V. R., M. E. Reilly, D. Mantle, and T. J. Peters. 1998. Oxidative damage in liver disease. *J. Int. Fed. Clin. Chem*. 10:16-20.
- Proskey, L., N.-G. Asp, T. F. Schweizer, J. W. DeVries, and I. Furda. 1988. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem*. 71:1017-1023.

- Quezada, N., and G. Cherian. 2012. Lipid characterization and antioxidant status of the seeds and meals of *Camelina sativa* and flax. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 114:974-982.
- Raju, J. 2008. Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: relevance in study chemoprevention of colon cancer. *World J. Gastroenterol.* 14:6632-6635.
- Rao, C. V., D. Chou, B. Simi, H. Ku, and B. S. Reddy. 1998. Prevention of colonic aberrant crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffee fiber, inulin and pectin. *Carcinogenesis.* 19:1815-1819.
- Ratnayake, W. M. N., W. A. Behrens, P. W. F. Fischer, M. R. L'Abbé, R. Mongeau, and J. L. Beare-Rogers. 1992. Chemical and nutritional studies of flaxseed (variety Liontt) in rats. *J. Nutr. Biochem.* 3:232-240.
- Rendón-Villalobos, R., E. Agama-Acevedo, P. Osorio-Díaz, J. Tovar, and L. A. Bello-Pérez. 2009. Proximal composition and *in vitro* starch digestibility in flaxseed-added corn tortilla. *J. Sci. Food Agric.* 89:537-541.
- Salvador, V., C. Cherbut, J-L. Barry, D. Bertrand, C. Bonnet, and J. Delort-Laval. 1993. Sugar composition of dietary fibre and short chain fatty acids production during *in vitro* fermentation by human bacteria. *Br. J. Nutr.* 70:189-197.
- Sasaki T., J. L. Sasaki, R. G. Jones, A. J. Oliveira-dos-Santos, W. L. Stanford, R. Boton, S. Wakehan, D. Bouchard, I. Koziaradz, N. Joza, T. W. Mark, P. S. Ohashi, A. Susuki, J. M. Penninger. 2000. Colorectal carcinomas in mice-lacking the catalytic subunit of PI(3) γ . *Nature.* 406:897-902.
- Saura-Calixto, F. 2006. Evolución del concepto de fibra. In: F. M. Lajalo, y W. E. Menezes (Ed.). p 235-353. Editora da Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo.
- Saura-Calixto, F. 2011. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *J. Agric. Food Chem.* 59:43-49.
- Saura-Calixto, F., and I. Goñi. 2004. The intake of dietary indigestible fraction in the Spanish diet shows the limitations of dietary fibre data for nutritional studies. 58:1078-1082.
- Saura-Calixto, F. y Jiménez-Escring, A. 2001. Compuestos bioactivos asociados a la fibra dietaria In: M. F. Lajalo, F. Saura-Calixto, W. E. Penna y W. E. Menezes (Ed.). *Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y Salud.* p 103-126. Verela, Sao Paulo.
- Saura-Calixto, F., A. García-Alonso, I. Goñi, L. Bravo. 2000. *In vitro* determination of the indigestible fraction in foods: an alternative of dietary fiber analysis. *J. Agric. Food Chem.* 48:3324-3347.

- Saura-Calixto, F., J. Serrano, and I. Goñi. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem.* 101:492-501.
- Schneeman, O. B. 2007. Carbohydrates and gastrointestinal tract function. In: G. C. Biliaderis, and S. M. Izydorczyk (Ed.) *Functional food carbohydrates*. p 471-477. CRC, Boca Raton.
- Sepulveda, R. T., and R. R. Watson. 2002. Treatment of antioxidant deficiencies in AIDS patients. *Nutr. Res. (N.Y.)*. 22:27-37.
- Serrano, J., I. Goñi, and F. Saura-Calixto. 2007. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Res. Int.* 40:15-21.
- Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidations substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Ezymol.* 299:152-178.
- Slavin, J. 2007. Dietary carbohydrates and risk of cancer. In: G. C. Biliaderis, and S. M. Izydorczyk (Ed.) *Functional food carbohydrates*. p 371-385. CRC, Boca Raton.
- Sreeramulu, D., and M. Raghunath. 2011. Antioxidant and phenolic content of nuts, oil seeds, milk and milk products commomly consumed in India. *Sci. Res.* 2:422-427.
- Stopera, S. A., and R. P. Bird. 1993. Immunohistochemical demonstration of mutan p53 tumor suppressor gene product in aberrant crypt foci. *Cytobios.* 73:73-88.
- Thompson, L. U. 2003. Flaxseed, lignans, and cancer. In: L. U. Thompson and S. C. Cunnane (Ed.) *Flaxseed in Human Nutrition* (2nd). p 194-218. AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Takahashi, M., and K. Wakabayashi. 2004. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodent. *Cancer Sci.* 95:475-480.
- Torroella, M., y S. Villa-Treviño. 1998. Bases genéticas del cáncer. p 9-41. Fondo de Cultura Económica, México, D. F.
- Touré, A., and X. Xueming. 2010. Flaxseed lignans: source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bio-active components, and health benefits. *Compr. Rev. Food Sci. Food F.* 9:261-269.
- Velázquez, O. C., M. H. Lederer, and J. L. Rombeau. 1997. Butyrate and the colonocyte: production, absorption, metabolism and therapeutic implications,

- In: D. Kritchevsky, and C. Bonfield (Ed.) Dietary fiber in health and disease. p 123. Plenum Press, New York.
- Velioglu, Y. S., G. Mazza, L. Gao, and B. D. Oomah. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46:4113-4117.
- Vergara-Castañeda, A. H., G. R. Guevara-González, M. Ramoz-Gómez, R. Reynoso-Camacho, H. Guzmán-Maldonado, A. A. Feregrino-Pérez, D. Oomah, and G. Loarca-Piña. 2010. Non-digestible fraction of cooked vean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar bayo madero suppresses colonic aberrant crypt foci in azoxymethane induced rats. *Food and Function.* 1:294-300.
- Wakjira, A., M. T. Labuschagne, and A. Hugo. 2004. Variability in oil content and fatty acid composition of Ethiopian and introduced cultivars of linseed. *J. Sci. Food Agric.* 84:601-607.
- Wanasundara, P. D., and F. Shahidi. 1994. Alkanol-amonia-water/hexane extraction of flaxseed. *Food Chem* 49:39-44.
- Wargovich, M. J., C. Harris, C.-D. Chen, C., Palmer, V. E. Steele, and G. J. Kelloff. 1992. Growth kinetics and chemoprevention of aberrant crypts in the rat colon. *J. Cell. Biochem.* 16:51-54.
- WCRF/AICR: Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective: *World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research* 1997.
- Wheeler, D. S., J. D. Catravas, K. Odoms, A. Denenberg, V. Malhorta, and H. R. Wong. 2004. Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibits IL-1 b-dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells. *J. Nutr.* 134:1039-1044.
- Wikipedia. Antioxidant. <http://en.wikipedia.org/wiki/Antioxidant> (accessed Sept 28, 2008).
- Williams, M. J., W. H. Sutherland, A. P. Whelan, M. P. McCormick, and S. A. de Jong. 2004. Acute effect of drinking red and white wines on circulating levels of inflammation-sensitive molecules in men with coronary artery disease. *Metabolism.* 53:318-323.
- Williamson, G., and Manach, C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:243-255.
- Won L. K., L. H. Joo, and L. Ch. Yong. 2004. Vitaminas, fitoquímicos, dieta y su implementación en la quimiopreención del cáncer. *Critl. Rev. Food Sci. Nutr.* 44:437-452.

- Yuan, H., A. Gong, and C. Y. Young. 2005. Involvement of transcription factor Sp1 in quercetin-mediated inhibitory effect on the androgen receptor in human prostate cancer cells. *Carcinogenesis*. 26:793-801.
- Zhang, H. S., M. Gavian, A. Dahiya, A. A. Postigo, D. Ma, R. X. Luo, J. W. Harbor, D. C. Dean. 2000. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell*. 101: 79-89.
- Zhao, G., M. Nyman, and J. A. Jonsson. 2006. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 20:674-682.