



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Doctorado en Ciencias en Biomedicina

Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*): Caracterización nutracéutica y su efecto quimiopreventivo en el estadio temprano de cáncer de colon *in vivo*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias en Biomedicina

Presenta

Rosa Iris Godínez Santillán

Dirigido por:

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Co-Director:

Dr. Salvador Horacio Guzmán Maldonado

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Presidente

Dr. Salvador Horacio Guzmán Maldonado

Secretario

Dr. Pablo García Solís

Vocal

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Suplente

Dr. Jorge Luis Chávez Servín

Suplente

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Enero 2025

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

DEDICATORIAS

A mi familia

A mis padres María de Lourdes y David Valentín

Por darme la vida misma, ser un ejemplo de esfuerzo y alentarme a dar lo máximo de mí.

A mi esposo José Luis

Por ser mi complemento, mi gran amor, creer en mí, tomar mi mano y apoyarme en todo anhelo y meta, siempre a mi lado con la mira en lo alto y eterno.

A mis amadas hijas Iris Sarahí e Italia

Por ser mi motivo de lucha, perseverancia y felicidad.

A mis hermanos Estrella, Diego y Nérida

Por su ayuda, aliento y apoyo en los momentos más difíciles.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios, de quien todo procede, y de quien me he visto altamente bendecida y favorecida. El mayor científico de todos.

Gracias a mi familia, por el apoyo y entusiasmo. Gracias sobre todo a ti papá, por alentarme a no darme por vencida y creer en mí.

Agradezco a la Dra. Haydé, su paciencia, guía y apoyo en todo sentido, ha sido una grata experiencia contar con su liderazgo y siempre valoraré su ayuda.

Gracias al Dr. Horacio, por su influencia positiva, dedicación y buen ánimo, por dirigir mis actividades en el INIFAP y resolver amablemente mis dudas.

Agradezco al Dr. Pablo, Dr. Jorge, Dra. Carmen por ser mis sinodales y siempre aportar conocimiento, guía y supervisión, lo valoro mucho.

Gracias a cada uno de los compañeros de laboratorio y de programa a lo largo de estos 4 años, quienes con amabilidad me guiaron, corrigieron, y compartieron sus conocimientos conmigo.

Gracias tía Sara Santillán, por ser de gran apoyo, ser una inspiración y alentarme en todo momento.

Agradezco a CONAHCYT por la beca otorgada y al programa de FRONTERAS CF-2019/1560335 por los fondos recibidos.

A todos, mi más sincero agradecimiento por el apoyo y fortaleza que me brindaron.

Tabla de contenido

..... ¡Error! Marcador no definido.

1	REVISIÓN DE LA LITERATURA	13
	Cáncer	13
1.1.1	Definición	13
1.1.2	Estadísticas del cáncer de colon en México y en el mundo	13
1.1.3	Etiología del cáncer de colon; factores genéticos y ambientales	14
	Morfología y función del colon sano	15
	Proceso de carcinogénesis de colon	16
1.1.4	Etapas del cáncer de colon	17
1.1.5	Fosas crípticas aberrantes (FCA)	17
1.1.6	β -glucuronidasa	19
	Modelo genético molecular del cáncer de colon	20
1.1.7	Proliferación celular	21
1.1.8	Ciclo celular	23
1.1.9	Apoptosis	27
1.1.10	Reparación del ADN	29
1.1.11	Estrés oxidativo	31
	Modelos animales de cáncer de colon	34
1.1.12	Azoximetano (AOM)	34
1.1.13	Dextrano Sulfato de Sodio (DSS)	37
	Compuestos bioactivos y su relación con el cáncer de colon	38
1.1.14	Fitoquímicos y su relación con el cáncer de colon	38
1.1.15	Betalaínas y su relación con el cáncer de colon	39
1.1.16	Fibra dietética y fibra antioxidante o residuo	40
1.1.17	Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	42
	Polifenoles y su relación con el cáncer de colon	45
1.1.18	Polifenoles extraíbles (EPP) y polifenoles no extraíbles (NEPP)	46
	Garambullo	50
1.1.19	Características generales del garambullo	50
1.1.20	Compuestos bioactivos del garambullo	51
2	JUSTIFICACIÓN	53
3	HIPÓTESIS	53
4	OBJETIVO GENERAL	54
5	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
6	MATERIAL Y MÉTODOS	55
	Obtención de la muestra y elaboración de los extractos	55

6.1.1	Hidrólisis química ácida	56
Determinación de fibra dietaria		56
Caracterización fenólica.....		58
6.1.2	Determinación de compuestos fenólicos totales	58
6.1.3	Determinación de flavonoides totales	58
6.1.4	Cuantificación de taninos condensados	59
6.1.5	Cuantificación de betalaínas	60
6.1.6	Análisis de fitoquímicos por HPLC-DAD.....	61
6.1.7	Identificación de compuestos por UPLC-QTOF-MSE	61
Capacidad antioxidante		62
6.1.8	DPPH.....	63
6.1.9	FRAP	63
6.1.10	TEAC	64
6.1.11	ORAC	65
Fase experimental <i>in vivo</i>		66
6.1.12	Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	68
6.1.13	Determinación de fosas crípticas aberrantes (FCA) en el colon.	68
6.1.14	Análisis bioquímicos en sangre	69
6.1.15	Longitud y peso de órganos	70
6.1.16	Determinación de β -glucuronidasa.....	70
7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	71
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
Caracterización fenólica.....		71
8.1.1	Compuestos fenólicos totales	72
8.1.2	Flavonoides totales.....	73
8.1.3	Betalaínas	73
8.1.4	Fibra.....	74
Capacidad antioxidante		74
8.1.5	DPPH.....	74
8.1.6	FRAP	75
8.1.7	TEAC	75
8.1.8	ORAC.....	76
Análisis de fenoles por HPLC-DAD y UPLC Q-ToF		77
RESULTADOS DE ESTUDIO <i>IN VIVO</i>.....		80
8.1.9	Evaluación <i>in vivo</i> del efecto del garambullo y su residuo, sobre el desarrollo de FCA inducidas con AOM.....	80
8.1.10	Análisis bioquímicos de sangre	83
8.1.11	Evaluación <i>in vivo</i> del efecto del garambullo y su residuo, sobre la longitud y peso de colon e hígado	86
8.1.12	Identificación de FCA	89
8.1.13	Actividad de β -glucuronidasa.....	95

8.1.14	Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	97
9	CONCLUSIONES.....	100
10	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
11	ANEXOS.....	143
	Anexo 1 Curva de equivalentes de ácido gálico, para determinación de compuestos fenólicos totales.....	143
	Anexo 2. Curva de equivalentes de catequina, para determinación de flavonoides totales ..	143
	Anexo 3. Curva de equivalentes de catequina, para determinación de taninos condensados	144
	Anexo 4. Curva de equivalentes de trólox, para método DPPH.....	144
	Anexo 5. Curva de equivalentes de trólox, para método FRAP	145
	Anexo 6. Curva de equivalentes de trolox, para método TEAC	145
	Anexo 7. Curva de equivalentes de trólox, para método ORAC	146

Índice de tablas

Tabla 1. Compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, taninos condensados y betalaínas	72
Tabla 2. Capacidad antioxidante.....	77
Tabla 3. Análisis de fenoles por HPLC-DAD.....	78
Tabla 4. Análisis de compuestos en extracto metanólico de garambullo e hidrólisis ácidas por UPLC Q-ToF.....	79
Tabla 5. Efecto del garambullo y su residuo en la química sanguínea de ratas Sprague Dawley inducidas con AOM+DSS.....	84
Tabla 6. Efecto del garambullo y su residuo en la formación de FCA en 72 ratas macho Sprague Dawley inducidas con AOM.....	90

Índice de figuras

Figura 1. Proceso de carcinogénesis colorrectal.....	21
Figura 2. Vía de señalización Wnt.	23
Figura 3. Esquema de la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis.	28
Figura 4. Diferentes tipos de daño al ADN y mecanismos reparadores.	31
Figura 5. Fuentes de ROS y moléculas clave en su señalización.	32
Figura 6. Metabolismo del AOM.	37
Figura 7. Diseño experimental	55
Figura 8. Consumo de alimento en grupos alimentados con garambullo, residuo de garambullo y administrados con azoximetano.	81
Figura 9. Consumo de agua en grupos alimentados con garambullo, residuo de garambullo y administrados con azoximetano.	82
Figura 10. Ganancia de peso en grupos experimentales.	82
Figura 11. Longitud de colon de 72 ratas expuestas a los diferentes tratamientos.....	87
Figura 12. Peso de hígado de 72 ratas expuestas a los diferentes tratamientos.	88
Figura 13. Fosas crípticas normales y aberrantes del colon distal con tinción azul de metileno.	89
Figura 14. Críptas normales y aberrantes del colon distal con tinción hematosilina y eosina.....	93
Figura 15. Incidencia de inflamación y daño premaligno en el colon.....	94
Figura 16. Actividad de β -glucoronidasa en los grupos experimentales.	96
Figura 17. Ácidos grasos de cadena corta en heces de los grupos experimentales.	99

Abreviaturas y siglas

ADN	ácido desoxirribonucleico
AGCC	ácidos grasos de cadena corta
AOM	azoximetano
APC	adenomatous polyposis coli
CFT	compuestos fenólicos totales
COX	ciclooxigenasas
DCC	deleted in colon cancer
DPPH	difenil-1-picrilhidracilo
DSS	dextrán sulfato de sodio
ERO's	especies reactivas de oxígeno
EGFR	factor de crecimiento epidérmico humano
EPP	polifenoles extraíbles
FCA	fosas crípticas aberrantes
FRAP	ferric reducing antioxidant power
FT	flavonoides totales
HPLC	high performance liquid chromatography
iNOS	óxido nítrico sintasa
MAM	metilazoximetanol
NEPP	polifenoles no extraíbles
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
TC	taninos condensados
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
TP53	tumoral protein 53
UPLC	ultra high performance liquid chromatography

RESUMEN

El cáncer de colon es una de las neoplasias más prevalentes, representando la cuarta causa de muerte por tumores malignos en México. La etiología del cáncer de colon es compleja; incluye factores genéticos y ambientales, siendo la dieta, a través del consumo de frutas y verduras, un factor de prevención. El garambullo es un fruto poco estudiado y subutilizado, que posee gran cantidad de compuestos bioactivos, al cual no se ha elucidado su posible papel en la prevención de cáncer. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue caracterizar las propiedades nutraceuticas del garambullo y evaluar su efecto quimiopreventivo, así como el de su residuo, sobre el estadio temprano de cáncer de colon inducido químicamente *in vivo*.

Se llevó a cabo la caracterización fenólica y capacidad antioxidante del fruto y de su residuo, obteniendo una concentración de compuestos fenólicos totales de 958.7 ± 26 mg equivalentes de ácido gálico/100g y 397.1 ± 13 mg equivalentes de catequina/100g para flavonoides totales. Se realizó el análisis de capacidad antioxidante por 4 técnicas diferentes, donde el ensayo ORAC obtuvo el mayor valor con 140.5 ± 5.0 $\mu\text{mol Eq/Trolox/g}$. Así mismo, se llevó a cabo el experimento *in vivo*, con una duración de 16 semanas donde se evaluó el efecto del garambullo y su residuo en ratas macho Sprague-Dawley inducidas con azoximetano + dextrán sulfato de sodio (AOM+DSS). El tratamiento con garambullo(G) y su residuo (R) disminuyeron de forma significativa el desarrollo de fosas crípticas aberrantes en el colon distal de las ratas inducidas con AOM+DSS (1.08 ± 0.7 y 2.08 ± 0.8 vs 9.7 ± 1.2) así como su multiplicidad (criptas por foco) reduciendo el daño del epitelio colónico y presentando menor actividad de la enzima β -glucuronidasa, esto, al comparar los grupos tratados con el grupo AOM+DSS. No se observaron diferencias en las concentraciones de AGCC entre los grupos. Los resultados sugieren que el garambullo es un fruto rico en fitoquímicos capaz de inhibir el desarrollo de lesiones preneoplásicas como lo son las FCA en un modelo *in vivo*.

Palabras clave: Garambullo, quimiopreención, polifenoles

ABSTRACT

Colon cancer is one of the most prevalent neoplasms, representing the fourth cause of death from malignant tumors in Mexico. The etiology of colon cancer is complex; it includes genetic and environmental factors. Diet, particularly the consumption of fruits and vegetables, is a prevention factor. Garambullo is a understudied and underutilized fruit, which has a large quantity of bioactive compounds, and its possible role in cancer prevention has not been elucidated. Therefore, the objective of this project was to characterize the nutraceutical properties of garambullo and evaluate its chemopreventive effect, as well as that of its residue, on the early stage of chemically induced colon cancer in vivo. The phenolic characterization and antioxidant capacity of the fruit and its residue were carried out, obtaining a concentration of total phenolic compounds of 958.7 ± 26 mg equivalents of gallic acid/100 g and 397.1 ± 13 mg equivalents of catechin/100 g for total flavonoids. The antioxidant capacity analysis was performed by 4 different techniques, where the ORAC assay obtained the highest value with 140.5 ± 5.0 $\mu\text{mol Eq/Trolox/g}$. Likewise, the in vivo experiment was carried out, with 16 weeks duration where the effect of garambullo and its residue was evaluated in male Sprague-Dawley rats induced with azoxymethane + dextran sodium sulfate (AOM+DSS). Treatment with garambullo (G) and its residue (R) significantly decreased the development of aberrant crypt foci in the distal colon of rats induced with AOM+DSS (1.08 ± 0.7 y 2.08 ± 0.8 vs 9.7 ± 1.2) as well as their multiplicity (crypts per focus) reducing the damage of the colonic epithelium and presenting lower activity of the β -glucuronidase enzyme, this, when comparing the treated groups with the AOM+DSS group. No differences were observed in the concentrations of SCFA between the groups. The results suggest that garambullo is a fruit rich in phytochemicals capable of inhibiting the development of preneoplastic lesions such as FCA in an in vivo model

Key words: Garambullo, chemoprevention, polyphenols

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad crónico-degenerativa que se caracteriza por células anormales que se multiplican sin control y pueden invadir los tejidos cercanos, actualmente, es la segunda causa de muerte en el mundo. Específicamente el cáncer de colon es el tercer tipo de cáncer más frecuente en el mundo, es la segunda causa de muertes relacionadas con esta enfermedad a nivel mundial, representando el 10% de todos los casos de cáncer (Organización Mundial de la Salud, 2023). En el año 2012 se reportaron 1,360,802 nuevos casos en el mundo, siendo el tercer cáncer más frecuente en hombres y mujeres (Stewart et al. 2014).

El proceso de carcinogénesis colorectal implica una serie de alteraciones en genes supresores de tumores y en oncogenes dando lugar a una proliferación descontrolada que resulta en un adenocarcinoma. Se caracteriza por 4 etapas: iniciación, promoción, progresión y metástasis. Las fosas cólicas aberrantes (FCA) son lesiones precursoras de adenomas y carcinomas, que como principales características presentan paredes con un aumento de grosor y así como un aumento en el área pericriptal. Son consideradas como el estándar de oro de los biomarcadores de carcinogénesis del colon y han sido extensamente utilizadas para la identificación de potenciales agentes quimioprotectores (León & Sáenz, 2007).

La prevención del desarrollo de la carcinogénesis colónica ha sido asociada al consumo de fitoquímicos, que son compuestos bioactivos encontrados naturalmente en plantas. Éstos han recibido atención en la mejora de la salud general y específicamente para la prevención del cáncer de colon, ya que han demostrado tener la habilidad de detener el crecimiento de las células cancerosas a través de la modulación de genes y proteínas involucrados en el desarrollo del tumor (Slattery et al. 2004). En este contexto, existe un fruto endémico de México que se ha determinado que cuenta con una amplia variedad de fitoquímicos, de tal forma que podría ser un candidato prometedor en la quimioprevención del cáncer de colon. Este fruto es el garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*): el cual se cultiva

predominantemente en los estados de Querétaro, Guanajuato, San Luis Potosí e Hidalgo, comercializado casi en su totalidad por comunidades indígenas y locales que no han extendido el comercio y sus beneficios del fruto (Hernández-López et al. 2008).

Una de las características más importantes del garambullo es su pigmentación color magenta, la cual se debe principalmente a la presencia de fitoquímicos conocidos como betalaínas (Hernández-López et al. 2008). Otros compuestos encontrados en el fruto del garambullo son la clorofila, carotenoides, diversos compuestos fenólicos, vitaminas y fibra dietética, todos ellos con importantes actividades biológicas. Por ello, el fruto del garambullo es un recurso con gran potencial que no ha sido adecuadamente explotado ni estudiado más allá de unas cuantas moléculas de interés industrial y alimentario.

1 REVISIÓN DE LA LITERATURA

Cáncer

1.1.1 Definición

El cáncer es una enfermedad crónico-degenerativa que se caracteriza por poseer células anormales que se multiplican sin control y pueden invadir los tejidos cercanos. Las células de cáncer también se pueden diseminar hasta otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático como parte del proceso de metástasis (American Cancer Society, 2019).

La palabra cáncer es un término muy amplio que abarca más de 200 tipos de tumores malignos, cada uno de ellos posee características particulares que en algunos casos son completamente diferentes al resto de otros cánceres, pudiendo considerarse enfermedades independientes, con sus causas, evolución y tratamiento específico (OMS, 2018).

1.1.2 Estadísticas del cáncer de colon en México y en el mundo

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. En el 2015 ocasionó 8.8 millones de defunciones, cerca del 70% de estas muertes por cáncer se registraron en países de ingresos medios y bajos. Según las estimaciones, el costo estimado para el año 2020 en el sistema de salud superará los 17 billones de dólares tan sólo en Estados Unidos (OMS, 2020).

El cáncer colorrectal ocupa el tercer sitio en cuanto a mayor número de fallecimientos, después del pulmonar y el hepático (OMS datos y cifras 2020). En el año 2012 se reportaron 1,360,802 nuevos casos en el mundo, siendo el tercer

cáncer más frecuente en hombres y mujeres (Stewart et al. 2014). La incidencia del cáncer de colon es muy variable entre las diferentes regiones del mundo. La menor incidencia (<10 por 10,000 habitantes) se encuentra en los países en vías de desarrollo de Asia y África. La mayor incidencia se encuentra en América del Norte, Australia y Nueva Zelanda (30-50 por 10,000 habitantes).

En México, es el cuarto cáncer más frecuente, responsable de 70,000 muertes al año (INSP, 2018). La incidencia del cáncer de colon en poblaciones que emigran de un país de baja incidencia a un país con elevada incidencia, alcanza la del país de acogida en una generación, lo que indica la intervención de factores ambientales (Tournigand & Carbonnel, 2004).

1.1.3 Etiología del cáncer de colon; factores genéticos y ambientales

Alrededor del 80% de los casos de cáncer de colon surge espontáneamente en la población, el otro 20% aparece en pacientes que tienen una historia familiar lo cual sugiere la presencia de una causa genética en combinación con la exposición a factores ambientales (Casimiro, 2002).

La mayoría de los cánceres de colon son casos esporádicos resultado de mutaciones somáticas, cuya incidencia aumenta después de los 50 años sin síndromes genéticos preexistentes. Estos cánceres pueden aparecer en un contexto familiar en el 10% de los casos (Pointet & Taieb, 2017).

La poliposis adenomatosa familiar y el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (síndrome de Lynch) representan las formas más caracterizadas de cáncer de colon hereditario (Tournigand & Carbonnel, 2004). La formación de pólipos en la población general puede explicarse por la presencia de genes dominantes comunes que tienen un impacto variable en diferentes situaciones ambientales (Lim, 2018).

Los factores ambientales implicados en la carcinogénesis colorrectal pueden dividirse en 2: aquellos que se asocian a un aumento del riesgo y los que promueven una disminución del mismo. El exceso calórico, consumo excesivo de alcohol, ser fumador de tabaco, la obesidad, comidas frecuentes, picoteo, el exceso de carnes grasas rojas, el consumo de cereales refinados, exceso de hierro y sacarosa, uso de laxantes y de estrógenos posmenopáusicos son factores asociados a un aumento del riesgo; mientras que los que pudieran disminuirlo son el consumo de legumbres, sobre todo de crucíferas, fibra, calcio y productos lácteos fermentados, folatos, y vitaminas antioxidantes (Tournigand & Carbonnel, 2004; Hano-García et al. 2011).

Morfología y función del colon sano

El intestino grueso tiene una longitud de metro y medio con 6 cm aproximadamente de diámetro, el cual se extiende desde el ciego hasta el ano. El esfínter ileocecal separa al íleon (porción terminal del intestino delgado) del ciego, que es la primera porción del colon. En el extremo del ciego se encuentra el apéndice vermiforme, esto en el plexo derecho del abdomen. Después del ciego sigue el colon ascendente (que asciende hasta zonas próximas al diafragma) que al girar 90 grados se convierte en el colon transversal que corre paralelo al eje del diafragma y gira 90 grados hacia abajo para constituir el colon descendente y la altura de la cresta iliaca comienza a denominarse colon sigmoide para terminar con el recto en el cual los últimos tres centímetros constituyen el ano (García-Compeán & Maldonado-Garza, 2017).

El colon está constituido por 4 túnicas superpuestas que son: serosa, muscular, submucosa y mucosa (Calderón-Lozano & García-Compeán, 1990). El epitelio intestinal está compuesto por una monocapa de células epiteliales especializadas y polarizadas que se renueva continuamente cada 3 a 5 días. Las células epiteliales

intestinales pluripotentes residen en la base de las criptas (criptas de Lieberkuhn) y generan células que migran hacia la punta de la vellosidad donde tiene lugar la diferenciación final. La mayoría de las células de la monocapa son enterocitos (80%) pero también están presentes otro tipo de células como las células de Goblet; especializadas en la secreción de moco, células de Paneth (defensinas), células enterocromafines de hormonas y neuropéptidos y las células M especializadas en la captación de antígenos de la luz intestinal (Salvo-Romero et al. 2015).

La mayor parte de la absorción intestinal ocurre en el intestino delgado, y cuando el quimo alcanza el íleon, el proceso prácticamente se ha completado, por lo que se puede decir que el material que pasará al intestino grueso está formado por agua, sustancias no digeribles como la celulosa y bacterias (Mahadevan, 2020). Las funciones del colon incluyen almacenamiento, fermentación, absorción, secreción y motilidad. La respuesta motora gastrointestinal a la comida es dual, es decir, con afectación gástrica y cerebral, donde los mecanismos neuro-hormonales del sistema nervioso central y endócrino son los responsables de estas respuestas (Erdogan & Yeh-Lee, 2020).

Proceso de carcinogénesis de colon

Los ensayos epidemiológicos y clínicos han demostrado que el 80% de los cánceres de colon se desarrolla según la secuencia pólipo-adenoma-cáncer y el 20% se desarrolla *de novo* (Pointet & Taieb, 2017). Los datos que sugieren que la mayoría de los cánceres de colon se desarrollan a partir de pólipos benignos infieren que hay una progresión ordenada desde mucosa normal a mucosa hiperproliferativa, a pólipos pequeños con pequeño potencial maligno, a pólipos más grandes con displasia, a células transformadas, pero no invasivas que constituyen el carcinoma *in situ*, a tumores invasivos pero no metastásicos, y finalmente a tumores metastásicos, de tal forma que los pólipos que presentan una mayor predisposición a la transformación maligna son los adenomas vellosos (Casimiro, 2002). Por otra

parte, las fosas crípticas aberrantes han surgido como las lesiones precursoras de adenomas colorrectales, es decir, un paso anterior a la formación del pólipo. Si la fosa críptica aberrante mide $>9 \text{ mm}^2$ y está elevada $>2 \text{ mm}$ sobre la mucosa las lesiones ya se consideran pólipos. Los pólipos tienen el potencial de convertirse en adenocarcinomas y tumores con diferentes características según la etapa del cáncer (Schoen et al. 2008; León et al. 2007).

1.1.4 Etapas del cáncer de colon

La etapa I se define como el tumor que invade la musculatura propia del colon. En estos tumores no se recomienda la quimioterapia adyuvante, ya que la supervivencia general (SG) a los 5 años solo con cirugía es de 85-95% (Lecomte et al. 2018; Cutsem et al. 2016).

La etapa II se define como el tumor que invade los órganos adyacentes, pero sin afectación nodal. El cáncer de colon en este estadio cubre a un grupo muy heterogéneo de pacientes, donde la supervivencia a 5 años varía entre el 58.4% para la enfermedad en estadio IIc (invasión de órganos adyacentes) y el 87.5% para la enfermedad en estadio IIa (Gunderson et al., 2010).

El cáncer de colon en estadio III, se caracteriza por la propagación hasta órganos y tejidos distantes. Con más frecuencia, el cáncer de colon se propaga al hígado, aunque también se puede propagar a otras partes del cuerpo, como pulmones, cerebro, peritoneo o ganglios linfáticos distantes (American Cancer Society, 2018).

1.1.5 Fosas crípticas aberrantes (FCA)

Los focos de criptas aberrantes fueron identificados inicialmente en colon de ratones tratados con azoximetano, un carcinógeno específico de colon (Bird, 1987).

Después de 4 años de su primera descripción en ratones, Pretlow et al. (1994) los describirían en colon y recto de seres humanos (Zamorano et al., 2008).

Se sabe que en sujetos normales menores de 40 años la prevalencia de FCA es muy baja, sin embargo, los mayores que 50 años muestran una prevalencia de 53.6%. Los pacientes menores de 40 años con adenomas muestran una prevalencia de 75% y los mayores de 60 un 90.2%, presentándose en un 100% en aquellos pacientes con cáncer de colon (Takayama et al., 1998).

Estas FCA pueden ser identificadas al teñir la mucosa con azul de metileno al 0.2% donde pueden ser visualizadas al microscopio; sin embargo, existen otras tinciones para su visualización como lo es la hematoxilina y eosina, que permite la visualización en el lumen de la cripta y que contrasta con la tinción de los núcleos epiteliales de la cripta, es decir, muestra una apariencia de rosquillas azules apretadas con agujeros blancos centrales. Por lo general las FCA tienen diámetros de cripta dilatados, con luces serradas o con forma de hendidura (en vez de redondas) (Redson, 2001). Estudios histopatológicos confirman que hay dos tipos de FCA: hiperplásicas o displásicas, éstas últimas análogas a microadenomas característicos en pacientes con poliposis adenomatosa familiar. Las FCA displásicas están universalmente acompañadas por mutaciones en el gen *APC* (*adenomatous polyposis coli*) (Sanabria et al. 2012). Otras alteraciones genéticas descritas en estas lesiones son la mutación de *K-RAS* en un 73% de los casos, en el gen *BRAF*, la expresión citoplásmica y nuclear de β -catenina (54% de los casos), expresión aumentada del antígeno carcino-embriionario (en 93% de los casos) el cual aumenta en función del tamaño de la FCA, expresión de P-cadherina la cual en epitelio colónico normal no se expresa pero en las FCA se encuentra en un 65% independientemente del grado de displasia. También se ha reportado la expresión aumentada de la proteína telomerasa hTERT (en el 30% de las FCA) la cual tiene una relación directa con los mecanismos que contribuyen a la inmortalidad de células tumorales mediante la actividad de la telomerasa, resaltando que en pólipos

y todos los carcinomas muestran sobreexpresión de hTERT (en un 65%) sugiriendo que la actividad aumentada de telomerasa tiene un rol en la progresión de FCA a cáncer. También se ha reportado que en el 54% de las FCA hay metilación de genes reparadores de ADN como lo son *p16*, *mgmt*, *hmmh1*, *mint 31*, *mint 2* y *mint 1*. No han sido detectadas las mutaciones de *TP53* (*Tumor protein p53*) en lesiones de FCA ya que se cree que es un evento tardío en el proceso de carcinogénesis (Verguese et al. 2005; Rasheed et al. 2007; Zamorano et al. 2008; Schoen et al. 2008; Gupta et al. 2016; Almet et al. 2019).

La expresión de iNOS (óxido nítrico sintetasa) en FCA está disminuida en un 50%, al igual que en carcinomas de colon, excepto en mucosa colónica normal donde hay una importante expresión de ella (Bounaama et al., 2012).

Existe evidencia de que las FCA especialmente las que presentan displasia, representan un cambio morfológico temprano en la mucosa colorrectal dentro del proceso de carcinogénesis y ha sido ampliamente aceptado como lesión precursora de cáncer de colon desde el punto de vista morfológico, histológico, biológico y genético. La aplicación clínica más importante de las FCA es como lesión blanco para quimioprevención, ya que hasta ahora la lesión susceptible de quimioprevención ha sido el pólipo. Sin embargo, éstos son lesiones grandes para ser erradicadas, además de que la evaluación de los efectos quimiopreventivos en ellos requiere un periodo largo de tiempo (León & Sáenz 2007).

Por todo lo anterior se puede decir que las FCA constituyen las lesiones más apropiadas para actuar en forma profiláctica debido a que son las lesiones detectables más pequeñas en forma precoz con una alteración genética simple (mutación de *K-RAS*) (Agnier et al. 2005).

1.1.6 β -glucoronidasa

La glucoronidación es una de las formas más útiles de conjugación observadas en los mecanismos de desintoxicación. En el intestino, los conjugados glucorónidos pueden ser hidrolizados por β -glucuronidasas bacterianas, enzimas glicosil hidrolasas que catalizan la escisión del ácido glucorónico terminal, hidrolizando así conjugados y generando sustancias tóxicas, por lo que ha sido considerada como una enzima clave para la activación de promotores carcinógenos como lo es el AOM en el lumen colónico. La liberación de productos OH-N podría conducir potencialmente a mutagenicidad a través de la interacción con las células epiteliales del colon, es por esto, que la actividad de esta enzima se ha visto incrementada en contenido colónico de animales expuestos a carcinógenos como el DMH y AOM (Nalini et al., 1996; Zhang et al., 2019)

Modelo genético molecular del cáncer de colon

El cáncer de colon se desarrolla a través de etapas definidas que van desde lesiones en las criptas del colon a adenomas que producen cáncer. Esta secuencia adenoma-carcinoma se caracteriza por la acumulación de mutaciones múltiples en genes supresores de tumores y oncogenes que afectan el equilibrio entre la proliferación celular y apoptosis (Cruz-Bustillo, 2004; Martin de Civetta & Civetta, 2011). La mutación más frecuente es la del gen *APC* asociado a inestabilidad cromosómica, el cual actúa como controlador de proliferación manteniendo un equilibrio entre la división y apoptosis celular. También se ha descrito que entre el 10-15% de los cánceres de colon se producen debido a inestabilidad de microsatélites. En etapas tempranas del cáncer de colon la sobreexpresión de las ciclo-oxigenasas COX1 y COX2 se ha relacionado con una disminución de E-cadherina, lo que produce un aumento de la proliferación celular (D'Ottavio et al. 2014). Siguiendo a la mutación de *APC*, se encuentra la mutación en *k-ras*, un oncogen con actividad GTPasa que al mutar se mantiene activo induciendo la proliferación celular (Juárez-Vázquez & Rosales-Reynoso, 2014). El receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) ha sido asociado a cáncer de

colon, donde se observan mutaciones en un 30 a 85% de los casos lo cual se relaciona a una disminución en la supervivencia ya que favorece la proliferación, angiogénesis y metástasis. Otro de los genes asociados a cáncer de colon es el *DCC* (*Deleted in colon cancer*), el cual es un receptor transmembranal. Las mutaciones en el gen supresor de tumores *TP53* se observa en un 70% en etapas tardías del carcinoma, siendo poco frecuente en adenomas (Passalacqua et al. 2010).

En la Figura 1 se puede observar la secuencia pólipo-adenoma-carcinoma y las alteraciones moleculares involucradas en el cáncer de colon que van a dar lugar a una proliferación descontrolada de células malignas.

CARCINOGENÉISIS COLORRECTAL

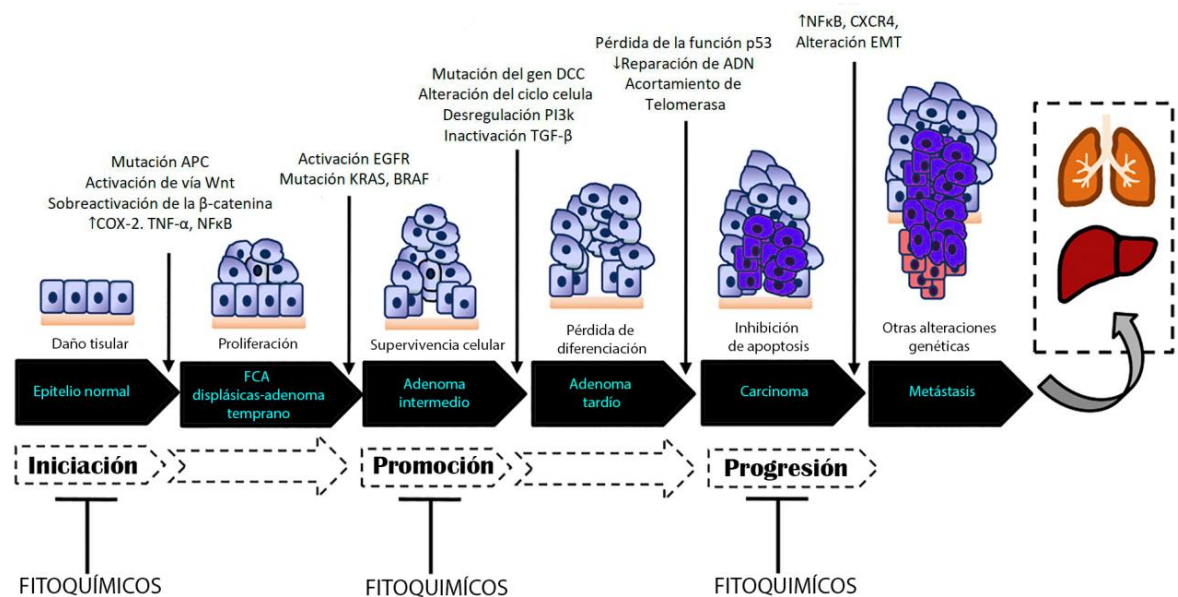


Figura 1. Proceso de carcinogénesis colorrectal.

Adaptado de Afrin et al. (2020).

1.1.7 Proliferación celular

La proliferación celular implica la división mitótica de una célula, luego de la duplicación de su material genético, para dar origen a dos células que, normalmente son idénticas a la progenitora, de tal forma que el aumento en el número de células de un determinado tejido es inherente a la proliferación (Canepa, 2007). Algunos de los genes y proteínas que participan en la proliferación de los colonocitos y su alteración para dar pie al cáncer de colon son los siguientes.

Como ya se mencionó el gen *APC* que codifica a la proteína *apc* es uno de los genes alterados en cáncer de colon y es componente de la vía de señalización de Wnt (Aghabozorgi et al. 2019). Se ha demostrado que la vía Wnt es esencial para mantener el comportamiento de las células madre en las criptas intestinales las cuales cuando se exponen a determinados factores de crecimiento y citosinas generan progenitores que proliferan transitoriamente y después se retiran del ciclo celular para finalmente diferenciarse (Cruz-Bustillo, 2004). La proteína *Apc* juega un rol sustancial en la regulación de la vía de señalización Wnt. En condiciones normales *Apc* formará un complejo con β -catenina, axina, GSK 3 β (glucógeno sintasa cinasa) y otras proteínas, la axina contiene sitios de unión para los componentes esenciales de la degradación de β -catenina y la GSK 3 β lleva a cabo la fosforilación de β -catenina en sus residuos serina y treonina, siendo un marcaje para su degradación proteolítica por ubiquitinación (Caliceti et al. 2014). Cuando Wnt se une a los receptores Frizzled y LRP conduce a la inhibición del complejo destructor, permitiendo la señalización de β -catenina. Wnt permite la acumulación de β -catenina y su traslocación al núcleo donde se une a varios factores de transcripción por ejemplo al factor celular T (TCF) y LEF-1 siendo así clave en la proliferación celular (Figura 2). En condiciones fisiológicas la actividad de β -catenina está estrictamente controlada, sin embargo, si se presenta alguna alteración en esta vía como lo es la mutación de *apc*, se vuelve constitutiva la señal de proliferación (Yang et al. 2014)

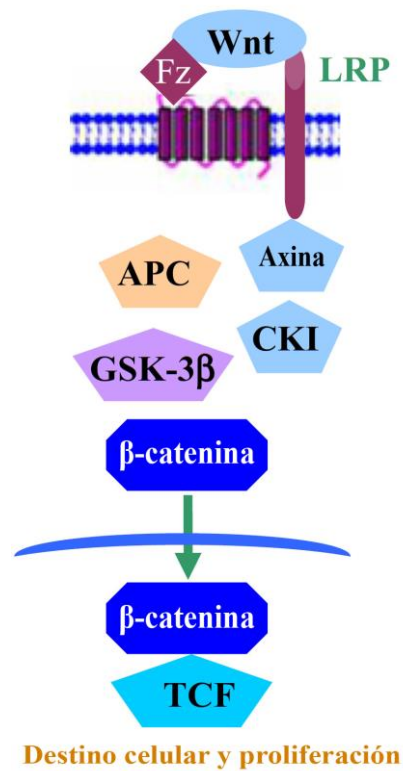


Figura 2. Vía de señalización Wnt.

Adaptado de Yang et al. (2014).

1.1.8 Ciclo celular

El ciclo celular es la base para la reproducción de los organismos, su función principal es originar nuevas células asegurándose que el proceso se realice en forma debida y con la regulación adecuada. Consta de 2 grandes fases: mitosis o fase M y la interfase que consta de G1, S y G2 (Novák et al. 2018)

El ciclo celular está controlado principalmente por las cinasas dependientes de ciclina (CDK) cuyas actividades oscilantes se determinan al unirse a los coactivadores de la ciclina. Las ciclinas exhiben cambios dinámicos a medida que las células pasan a través del ciclo celular. La acumulación secuencial y

cronometrada, así como la degradación de las ciclinas y de otras proteínas imponen el orden en el ciclo celular y contribuyen al mantenimiento del genoma (Kernan *et al.*, 2018). La precisión de estos procesos es mantenida por 3 puntos de control que identifican errores y detienen el progreso hasta que se resuelvan dichos errores (Branzei *et al.* 2008).

La fase G1 sigue a la citocinesis y precede a la fase S. Cabe resaltar que en esta fase la carga genética es diploide (2n) (Sidorova & Breeden, 2003). En esta fase del ciclo, ante estímulos de mitógenos existe un aumento de la masa celular, síntesis de proteínas y de ARN con una duración aproximada de 5-6 horas (Massagué, 2004). Las proteínas que se sintetizan en esta fase son la ciclina D, que promueve la activación de CDK 4 y 6. Los complejos ciclina D-CDK 4/6 catalizan la fosforilación de Rb, proteína que en su estado hipofosforilado se une e inhibe a E2F, una familia de factores de transcripción que se compone de 8 miembros (E2F 1-8) (Lagunas-Cruz *et al.* 2014). La producción consecuente de ciclina E promueve la formación del complejo ciclina E-CDK2 que fosforila a Rb (en 14 sitios) y como consecuencia E2F se disocia de Rb, lo que lleva a la transcripción de genes necesarios para la progresión a la fase S incluido el gen de la ciclina E (*CCNE*), ciclina A y c-Myc (Bonelli *et al.* 2019).

Una amenaza importante para la integridad del genoma es el daño al ADN, si se produce dicho daño en la fase G1, debe detectarse y deben iniciarse reparaciones y mientras tanto debe bloquearse la progresión a la fase S. El mecanismo de vigilancia del daño del ADN consiste en proteínas que responden ante roturas de cadena sencilla y doble en el ADN, las cuales inducen un aumento en la actividad del factor de transcripción p53 que regula la expresión de enzimas reparadoras, y de la proteína p21 que inhibe a las cinasas dependientes de ciclina E y D evitando el paso a través del punto de restricción (Yang *et al.* 2017). El punto de restricción es un interruptor que activa los factores de transcripción E2F que como ya se mencionó, regulan positivamente la expresión de proteínas necesarias para la replicación del ADN (Yao, 2014). En la fase G1 se encuentra el primer punto de

control: G1/S cuya función es mantener la degradación de ciclina A, manteniendo el complejo ciclina A/Cdk 2 bajo y que no pueda iniciar la replicación del ADN, esto hasta que el interruptor del punto de restricción ayude a elevar el punto de control /G1/S) al inducir la síntesis de ciclina A y de Emi1 (inhibidor de Cdh1:APC/C factor promotor de anafase/ ciclosoma que ubiquitina a Ciclina A para su degradación en el proteosoma) (Miller et al. 2006). El hecho de tener dos interruptores (punto de restricción y punto de control G1/S) crea una ventana de tiempo para evaluar el ambiente favorable y nutricional para posteriormente activar la replicación del ADN (Cappell et al. 2016).

Las células entran de la fase G1 a S en respuesta a la expresión de ciclinas tipo D inducidas por las vías de señalización de factores de crecimiento, como ya se explicó. En la fase S se produce la replicación del ADN. Esta fase transcurre a lo largo de 10-12 horas y es controlada por los complejos ciclina E-CDK2 seguido por ciclina A/CDK2 (Cruz-Bustillo et al. 2004). Además, durante la fase S las ciclinas mitóticas se transcriben y traducen por lo que la actividad de CDK sigue aumentando y las células transitan hacia G2. Aunque no hay un punto definido para la finalización de la fase S, se considera que la finalización de la síntesis de ADN marca el comienzo de G2, aunque recientemente se ha reportado que las regiones de replicación tardía aún se están replicando durante G2 (Irony-Tur & Kerem, 2017).

En la fase G2 va a continuar la síntesis de proteínas y de ARN, también se le conoce como la segunda fase de crecimiento y tiene una duración de 3-4 horas y se tiene ya una carga genética haploide (Gao et al. 2017). La decisión de cuándo ingresar a la mitosis depende del aumento continuo de ciclina A, la disminución de la actividad de las cinasas similares a WEE1 (por parte de CDK) y el aumento de la actividad de la fosfatasa CdDC25 (cuya función es contrarrestar la fosforilación de CDK dependiente de WEE1). Una vez que las CDK interactúan con otras cinasas mitóticas y se satisfacen las demandas del tercer punto de control, la mitosis puede comenzar (Hustedt & Durocher, 2016).

Es importante mencionar que en el tercer punto de control se evalúa si se ha replicado adecuadamente el ADN, el tamaño de la célula, además, si el ADN ha sufrido algún daño previo el estrés genotóxico activa los sistemas ATM/ATR conduciendo a la fosforilación y activación de las cinasas CHK1 y CHK2 seguido de la fosforilación de Cdc25C, la cual detiene la entrada a la mitosis cuando se retiene en el citoplasma por la proteína 14-3-3 que inhibe su acción sobre el complejo de Ciclina B/CDK1 (Wakida et al. 2017). Entonces, si hay daño y se activa el sistema ATM/ATR éste activa a p53 que va a contribuir a mantener a las células en G2. También se puede observar el efecto de p21 que va a reducir la fosforilación de Rb y evita que E2F se libere para mediar la expresión de ciclina B/CDK1 o incluso p21 puede unirse directamente a este complejo para bloquear la entrada a la mitosis (Barr et al. 2011; Imoto & Okada 2019).

La fase M (mitosis) se subdivide en profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis con una duración aproximada de 30 minutos. En la profase los cromosomas ya replicados se condensan y son liberados en el citoplasma, ya desintegrada la membrada nuclear y posterior a esto se forma el huso mitótico (Mochida et al. 2016). Durante la metafase los pares de cromátidas hermanas se separan y son conducidas a los polos opuestos del huso. En este punto se encuentra otro punto de control (Dick & Gerlich, 2013). Si los cinetócoros no están orientados se crea un complejo mitótico de control (MCC) que es un potente inhibidor de APC/C en asociación con Cdc20 (los cuales tienen la función de poliubiquitinar securina y ciclina B promoviendo su proteólisis). El punto de control de la metafase se impone cuando se produce MCC y se inhibe Cdc20: APC/C, una vez que se repara el error y los cromosomas están bio-orientados la producción de MCC se interrumpe, sin embargo, la célula tarda un tiempo en deshacerse de MCC y activar el Cdc20:APC/C, suceso que abre la puerta a la anafase (Novák et al. 2018). En la anafase, los cinetócoros se separan y permiten que cada cromátida sea arrastrada hacia un polo del huso. En la telofase los cromosomas hijos separados llegan a los polos y los microtúbulos del cinetocoro desaparecen,

posterior a esto los microtúbulos se alargan y forman la envoltura nuclear. Por último, en la citocinesis el citoplasma se divide por medio de la segmentación, donde ocurre una reorganización de los microtúbulos del citoesqueleto, ya que la partición en 2 células se va a dar por movimientos contráctiles provocados por la actina y miosina (Terasawa et al. 2014).

1.1.9 Apoptosis

Las células de un organismo no viven indefinidamente, se calcula que el cuerpo humano produce y erradica cada día millones de células, el recambio celular es necesario para la homeostasis entre la proliferación y la muerte (Lizarbe-Iracheta, 2007). La apoptosis es una forma muy frecuente de muerte celular programada que va a eliminar las células no deseadas o dañadas para regular la homeostasis de los tejidos. Por consecuencia cuando este proceso sufre alteraciones, puede causar enfermedades como el cáncer, enfermedades autoinmunes o enfermedades neurodegenerativas. La apoptosis se puede iniciar o activar por dos vías de señalización: la vía extrínseca y la intrínseca (Singh et al. 2019)

La vía extrínseca es iniciada por estímulos externos a las células, donde un ligando de muerte, por ejemplo, FasL o $TNF\alpha$ (Factor de necrosis tumoral α) se unen a sus receptores en la membrana celular y atraen a la procaspasa-8, la cual se activa por autoproteólisis y a su vez activa a Bid (proteína pro-apoptótica de la familia de Bcl-2, del tipo solo BH-3) la cual tiene la capacidad de generar el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial y converger con la vía intrínseca (Ichm & Tait, 2016).

La vía intrínseca es activada por estímulos internos como el estrés metabólico, hipóxico o del retículo endoplasmático. Estos estímulos internos promueven la activación de caspasas (endoproteasas dependientes de cisteína que catalizan los enlaces peptídicos) y miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 que conducen a la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (PTPM) a través de los canales (Grilo & Mantalaris, 2019). Se cree que Bax y Bak (proteínas

pro-apoptóticas de la familia Bcl-2) forman oligómeros que cruzan por el PTPM el cual permeabiliza la membrana externa de la mitocondria (Abate et al. 2019)

La liberación del citocromo C de la mitocondria hacia el citosol, es uno de los eventos clave en la apoptosis. Durante la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria, la membrana interna se vuelve permeable formando el PTPM, que permite la salida a moléculas como el citocromo C, y moléculas como Smac/Diablo, endonucleasa G o el factor inductor de apoptosis (AIF), además de generar un flujo de calcio y liberación especies reactivas de oxígeno (ERO's) (Lin et al. 2020). Bax activa a Smac/DIABLO quien inhibe la actividad antiapoptótica de XIAP (proteína inhibidora de apoptosis ligada a X). La salida del citocromo C al citoplasma induce la formación del apoptosoma, un complejo proteico formado por el mismo citocromo C, Apaf-1 y por último siete unidades de caspasa 9 (proceso dependiente de ATP) (Burke, 2017). Posterior a esto la procaspasa-9 activada (caspasa-9) rompe el prodominio de las caspasas efectoras: -3, -6 y -7 activándolas, las cuales efectuarán los últimos pasos de la muerte celular.

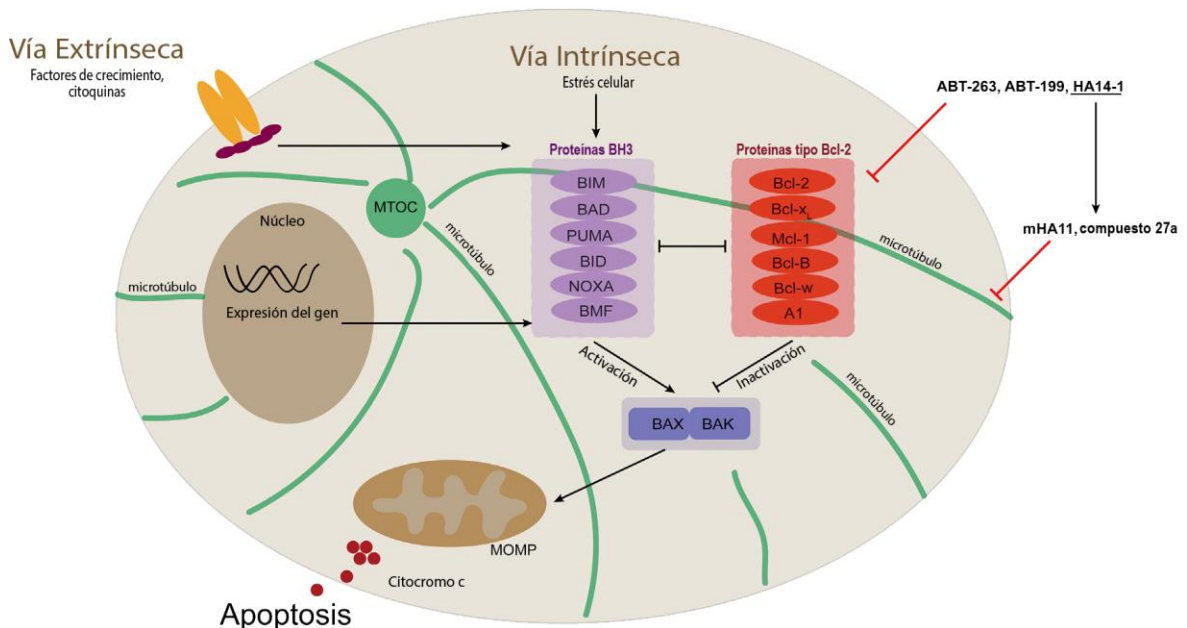


Figura 3. Esquema de la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis.

Adaptado de Lin et al. 2020.

1.1.10 Reparación del ADN

A lo largo de la vida, el material genético va a ser constantemente expuesto y atacado por muchos agentes tanto endógenos y exógenos que pueden dañar el ADN como lo son la ERO's, radiación y químicos (Lee et al. 2019). Este daño puede ser simple, como la sustitución de una base nitrogenada, hasta cambios complejos como lo son el rompimiento de la cadena sencilla (SSBs) o doble (DSBs) del ADN (Mahadevan et al. 2019). Los mecanismos de reparación van a ser una serie de eventos en los que participarán múltiples proteínas y van a depender del tipo de daño (Ahmad et al. 2023). Para reparar el daño en una sola cadena de ADN, existen la reparación por escisión de bases (BER), reparación por escisión de nucleótidos (NER) y reparación por mal apareamiento de bases (MMR) (Lagunas-Rangel, 2018). La falla en la reparación correcta puede conducir a mutaciones y reordenamientos cromosómicos o incluso la pérdida total de cromosomas, fenómenos que están asociados con muchas enfermedades como el cáncer (Koliadenko & Wilanowski, 2019).

Cuando se requiere reparar el rompimiento de una cadena sencilla, la poli-ADP ribosa polimerasa 1 (PARP1, un sensor molecular de daño al ADN) se acumula en los sitios de daño del ADN, activándose y sintetizando cadenas de poli-ADP ribosa (PAR) las cuales van a reclutar otras proteínas reparadoras como: XRCC1, PNKP, aprataxina y ADN polimerasa B (Caldecott, 2014).

Cuando existe daño en ambas cadenas de ADN, y no queda alguna que pueda servir de molde para la reparación puede haber la posibilidad de daños importantes a la célula. Para este tipo de situaciones existe la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la reparación por recombinación homóloga (HR) (Mani et al. 2019).

La NHEJ consiste en ligar los extremos del ADN directamente (esto requiere de factores como Ku70/80, ADN-PKcs y ADN ligasa IV). Este mecanismo puede actuar en cualquier momento del ciclo celular (Lee et al. 2019).

En la HR se utiliza la copia del ADN en el cromosoma hermano (ya que poseemos dos copias de cada cromosoma) como molde para reparar los daños. Primeramente, un complejo enzimático se une al ADN y recorta los extremos de una de las cadenas, la cadena que queda más larga sirve para que se una la enzima recombinasa y se una al ADN del cromosoma hermano en un punto homólogo a su secuencia utilizándolo como molde para reparar el daño. Este proceso ocurre por lo general en la fase S (en la parte tardía) y G2 del ciclo celular (cuando se tiene una cromátida hermana disponible) (Karanam, 2012 & Feltes, 2019).

Existen diversos químicos que actúan como carcinógenos creando aductos en el ADN. Las consecuencias de estos aductos en la replicación del ADN es que bloquean a la ADN polimerasa e introducen deleciones que conducen a mutaciones (si no se reparan, ya que los anillos exocíclicos pueden interferir con el emparejamiento de bases) (Nielsen & Krokan 2003; Hang & Singer 2003). Los aductos exocíclicos pueden ser responsables de mutaciones específicas en genes como *ras* y *Tp53* (Hu et al. 2002). Existen reportes que señalan que la reparación de aductos de ADN exocíclico se centraron en el mecanismo BER, el cual es el principal para la eliminación de bases alquiladas oxidadas y desaminadas, además se cree que BER es el principal sistema de defensa contra la mutagénesis (Khodyreva & Lavrik, 2020).

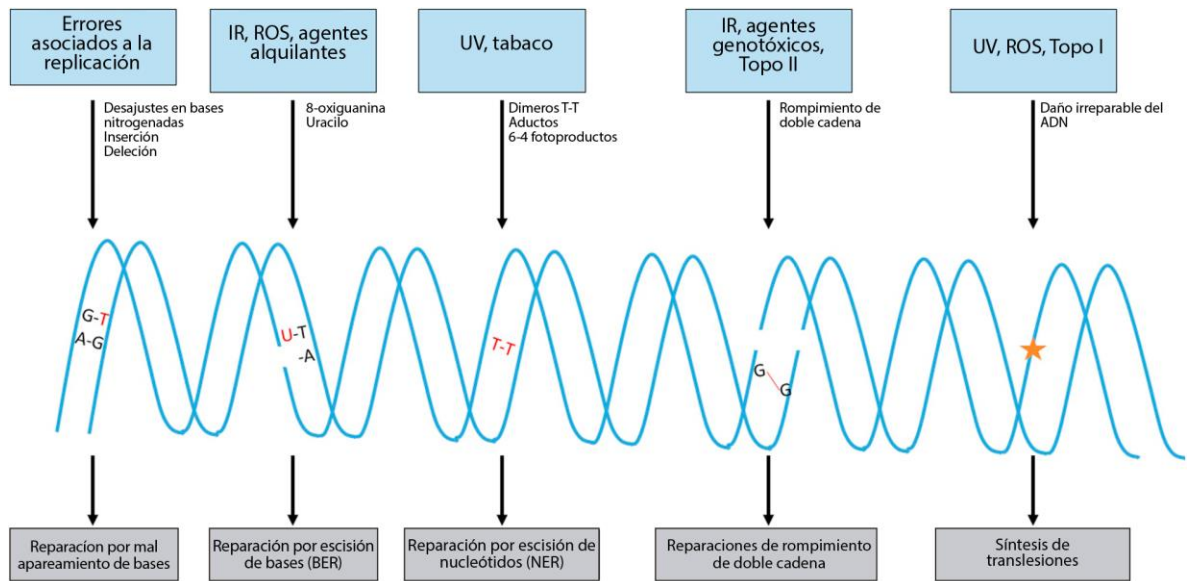


Figura 4. Diferentes tipos de daño al ADN y mecanismos reparadores.

Adaptado de Mani et al., (2019)

1.1.11 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad de la célula en dar una respuesta antioxidante efectiva (Morry et al. 2017). Las ERO's son moléculas pequeñas derivadas del oxígeno, incluidos los radicales oxígeno: superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^\cdot), peroxilo (RO_2^\cdot) y alcoxilo (RO_2) así como otras especies no radicales, pero que tienen el potencial de convertirse en ellos o de ser agentes oxidantes: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ozono (O_3), y oxígeno singlete (1O_2) (Saed et al. 2017). También existen las especies reactivas de nitrógeno (RNS) que se forman del óxido nítrico (Pupo et al. 2016.). La generación celular de ERO's y RNS se debe a muchos factores exógenos y endógenos tales como la exposición de carcinógenos, inflamación, tóxicos ambientales, nutrientes y la respiración mitocondrial (Morry et al. 2017) Figura 5. Es por esto, que existen diversos sistemas enzimáticos que neutralizan ERO's y RNS para mantener el balance redox como lo

son: super óxido dismutasa (SOD) que cataliza la conversión de superóxido a peróxido de hidrógeno, el cual, a través de la catalasa (CAT) o de la glutatión peroxidasa (GPX) en conjunto con la glutatión reductasa, se convierte a agua (Lei et al. 2016).

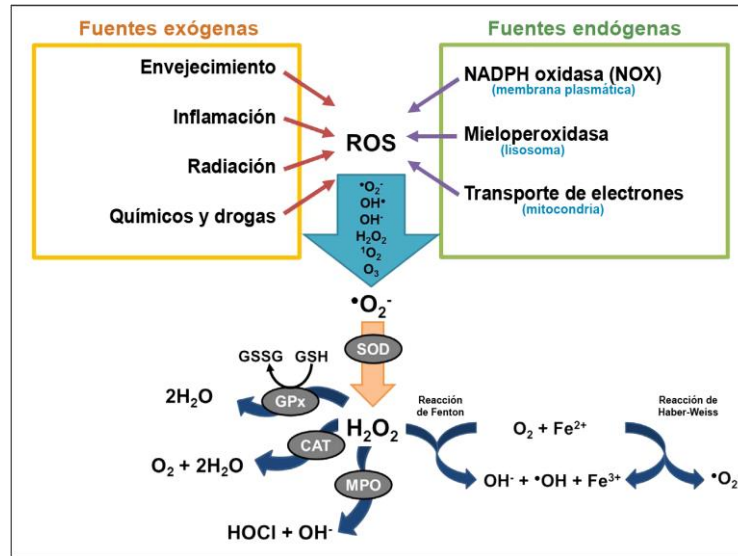


Figura 5. Fuentes de ROS y moléculas clave en su señalización.

Adaptado de Morry et al. (2017)

Sin embargo, el proceso de eliminación puede saturarse, y la acumulación de ERO's puede conducir a daño al ADN, lípidos y proteínas con efectos perjudiciales como muerte celular, mutagénesis y carcinogénesis (Morry et al. 2017). Las ERO's juegan un papel crítico en varias cascadas de señalización relacionadas con la proliferación, resistencia a la apoptosis, invasión y metástasis. Son capaces de alterar los sitios de unión al ADN de los factores de transcripción sensibles a redox, por ejemplo, el factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF1 α), NF κ B, la proteína activadora-1 (AP-1) y p53. A nivel postraducciona, las ERO's pueden oxidar directamente varios aminoácidos lo que conduce a un cambio estructural de la proteína que podría causar su degradación por proteasoma o su activación o inhibición de la misma (Grimsrud et al. 2008)

Para poder contrarrestar el efecto del exceso de ERO's existen diferentes antioxidantes enzimáticos (descritos en párrafos anteriores) y no enzimáticos, endógenos y exógenos. El concepto de antioxidante se refiere a cualquier compuesto, en una concentración más baja a la del sustrato oxidable, es capaz de retrasar o prevenir la oxidación de dicho sustrato (Pisoschi & Pop, 2015). Es por esto que las funciones antioxidantes implican disminuir el estrés oxidativo, mutaciones de ADN, transformaciones malignas, etc. (Gems et al. 2009). Existen diferentes sistemas de defensa antioxidante, aquellos que evitan la aparición de ROS y los que bloquean y capturan los radicales libres que se forman. Otro sistema es el de reparación, donde se eliminan biomoléculas dañadas, por ejemplo, reparar ácidos nucleicos dañados oxidativamente, eliminar proteínas oxidadas, reparar lípidos oxidados por fosfolipasas, peroxidasas o acil—transferasas (Zelenka et al. 2018). Estos mecanismos pueden ser generados también por antioxidantes exógenos que están presentes en frutas y verduras, siendo los principales las vitaminas C, E, carotenoides y fenoles (Cheng et al. 2016).

Los antioxidantes pueden actuar en diferentes etapas del proceso oxidativo radical; iniciación, propagación y terminación de la cadena (Yin et al. 2011). Los antioxidantes pueden reaccionar agotando el oxígeno molecular o disminuyendo su concentración local, eliminando iones metálicos prooxidativos, atrapando especies reactivas de oxígeno agresivas como el anión superóxido o el peróxido de hidrógeno, eliminando radicales iniciadores de la cadena como el hidroxilo, alcohoxilo y peroxilo, rompiendo así la cadena de una secuencia radical o neutralizando el oxígeno singlete (Martysiak-Zurowska & Wenta, 2012). Los antioxidantes preventivos son aquellos que disminuyen la concentración de O_2 (inhibiendo la peroxidación lipídica), eliminando iones de metales de transición prooxidativos, mientras que los antioxidantes secundarios son los que extinguen el oxígeno singlete, quelantes metálicos, inhibidores de enzimas oxidativas (lipooxigenasa) o absorbentes de radiación UV. Se ha reportado que estos

antioxidantes pueden exhibir efectos sinérgicos en combinación con los primarios (Pisoschi & Pop, 2015).

Modelos animales de cáncer de colon

Se ha reportado que los roedores son de los mejores modelos para la inducción química de tumores y que los resultados obtenidos pueden ser transferibles a la situación clínica (Zamorano et al. 2008). Dentro de las ventajas de utilizar roedores es que las neoplasias de intestino de origen natural en estos animales son extremadamente raras, no se han reportado cepas de ratas que tengan susceptibilidad para carcinoma intestinal espontáneo (Nambiar et al. 2003). Estos modelos reproducibles dan la oportunidad de estudiar la enfermedad y de manipular ciertas variables como la dieta, que es de suma importancia en la etiología del cáncer de colon. Los tumores intestinales han sido inducidos por distintos carcinógenos, uno de los más utilizados por su especificidad para generar adenomas y adenocarcinomas en colon, en un tiempo relativamente corto, es el azoximetano (Lu et al. 2014).

1.1.12 Azoximetano (AOM)

El AOM es carcinógeno alquilante muy potente que induce cánceres colorrectales con alta incidencia en ratas, de manera dependiente de la dosis (Takahashi & Wakabayashi 2004; Bird, 1987). Varias cepas de ratas y ratones difieren en la susceptibilidad a este carcinógeno, utilizándose con más frecuencia ratas macho F344, Wistar y Sprague-Dawley de 6 semanas de edad, a las que con 2 aplicaciones de 15 mg/kg de AOM administradas con una semana de diferencia se les coloca como biomarcadores intermedios de carcinogénesis, es decir, la aparición de FCA tras 8-12 semanas de la aplicación (Femia & Caderni, 2008). En la semana 8 posterior a la segunda dosis de AOM las FCA con 1, 2 o 3 criptas por foco aparecen, y para este momento la incidencia total de FCA (independientemente de su

multiplicidad de criptas) se convierte en un biomarcador válido (Raju, 2008). El tratamiento quimiopreventivo puede comenzar antes de la exposición al carcinógeno y durante la fase de inicio, promoción o progresión, siendo un modelo reproducible y ampliamente utilizado ya que comparte muchas similitudes con el cáncer de colon esporádico humano, incluyendo similitudes en la respuesta a algunos agentes quimiopreventivos y útil en la evaluación de agentes ambientales y dietéticos en el proceso del cáncer de colon (Perse & Cerar, 2011).

El inicio del proceso por el cual el AOM induce FCA comienza en el hígado, donde se hidroxila su grupo metilo distal generando el metilazoximetanol (MAM), lo cual es posible gracias a enzimas metabólicas clave (glutatión S-transferasas y alcohol deshidrogenasas), incluidas las isoformas del citocromo P450: CYP1A1 y CYP2E1. El MAM tiene una vida media de 8-12 horas aproximadamente, bajo condiciones fisiológicas (Sohn et al. 1991; Thaker et al. 2012). El MAM producido en el hígado es conjugado con ácido glucorónico para su transporte y eliminación por medio de la bilis hacia el intestino. Esta glucoridación provee estabilidad al compuesto, sin embargo, al llegar al colon, la enzima bacteriana β -glucoronidasa hidroliza este conjugado y libera al MAM produciéndose así una alta concentración de este compuesto en la mucosa colónica. Al absorberse, el MAM se rompe y genera nitrógeno, formaldehído y metanol formando posteriormente a un intermediario altamente reactivo que es el ion metildiazonio, el cual es responsable de metilar macromoléculas celulares como lo es el ADN (Fiala et al. 1977). Metilaciones como la O6-metilguanina (O6meG) se han detectado en el ADN de ratas tratadas con AOM. Los aductos (forma que adopta el ADN tras unirse covalentemente a un compuesto químico) de O6meG (también N7meG) pueden emparejarse mal con la timina durante la replicación del ADN y resultar en un desajuste que conduce a mutaciones de transición G:C \rightarrow T:A (la guanina alquilada se aparea con timina en vez de citosina) (Nyskohus et al. 2013; Venkatachalam et al. 2020).

Las mutaciones generadas por el AOM en el gen *k-ras* son detectadas en el exón 1, siendo la transición más frecuente CTGGT a CTGAT en la segunda base del codón 12. Las mutaciones en *k-ras* resultan en la activación constitutiva de Ras y su vía de señalización río abajo como lo son las vías Raf/MEK/MAPK y PI3K/Akt/PBK, regulando positivamente la ciclina D1 y COX-2, y así mismo estimulando la expresión de iNOS en presencia de estímulos inflamatorios. Todo lo anterior pudiera contribuir a los cambios hiperplásicos en las FCA (Takahashi et al. 2000b, Takahashi et al. 2004).

Las mutaciones en β -catenina causadas por el AOM se ubican en los codones 33 y 41 que codifican residuos de serina y treonina importantes para la fosforilación de GSK-3 β , así como en los codones 32 y 34 que codifican residuos adyacentes al residuo de serina, afectando también su fosforilación (mutaciones frecuentes CTGGA a CTGAA). Se ha reportado que estas mutaciones en el gen β -catenina son frecuentes en el proceso de displasia de las FCA (MacLeod, 2013; Takahashi et al. 2000a).

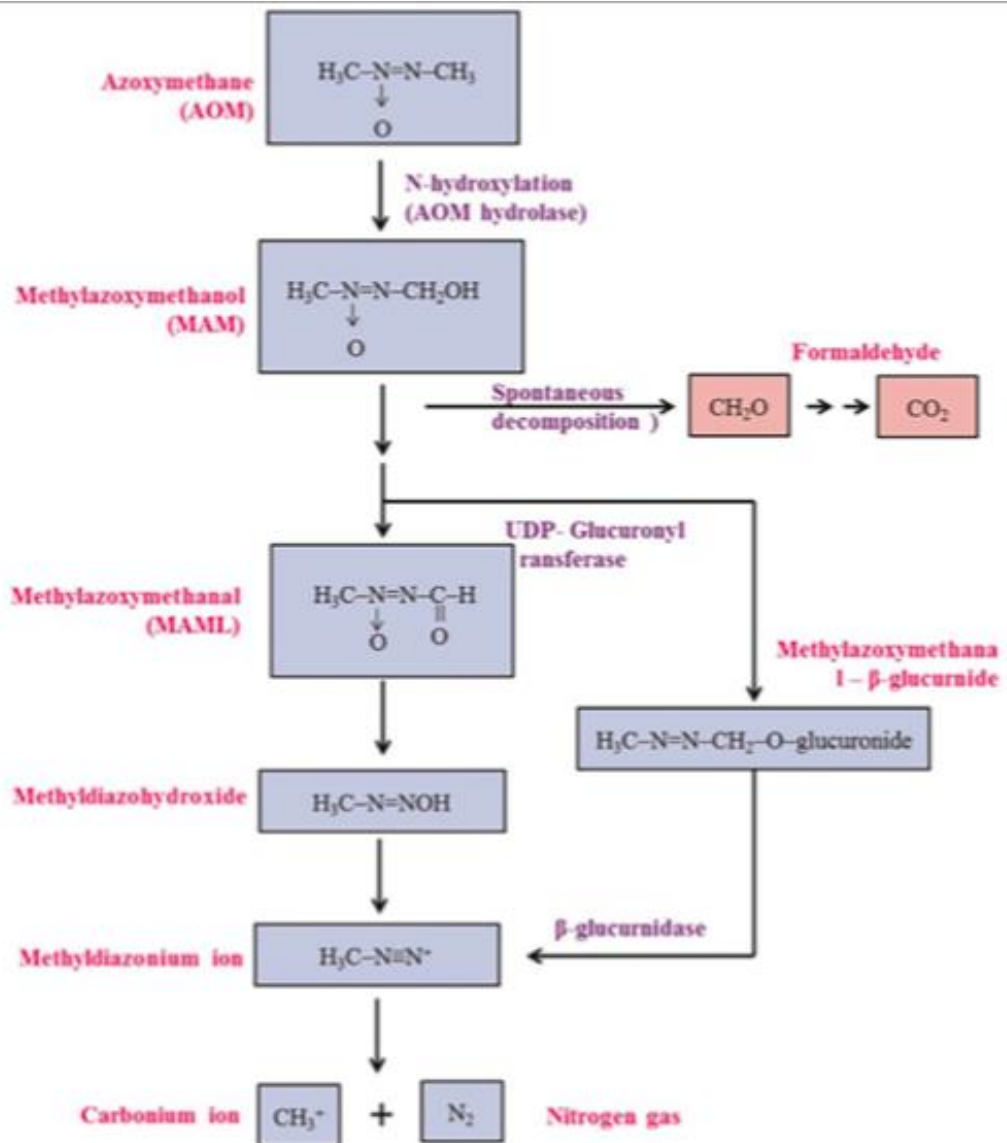


Figura 6. Metabolismo del AOM.

Modificado de Venkatachalam et al. (2020).

1.1.13 Dextrano Sulfato de Sodio (DSS)

El DSS es un polímero sulfatado con capacidad citotóxica sobre las células epiteliales intestinales y los macrófagos, que favorece el aumento de bacterias anaeróbicas *gram*-negativas, lo que, junto con el potencial erosivo sobre la barrera

intestinal y la inapropiada respuesta de los macrófagos, propicia la aparición de lesiones intestinales. La administración de concentraciones variables de DSS en el agua de beber, provoca en ratas y ratones lesiones colónicas similares a la colitis ulcerosa (Mañé-Almero, 2007). Existen modelos inducidos que combinan el DSS/carcinógeno que representan una aproximación al estudio de la secuencia inflamación-cáncer de colon. Dependiendo el número de ciclos de DSS, así como el porcentaje utilizado en el agua de beber, al ser combinado con AOM, ejerce un estímulo proinflamatorio capaz de acelerar el crecimiento de tumores en un periodo corto de latencia; 2-3 meses. Sin embargo, se ha observado que, en periodos más cortos, roedores inducidos con AOM a 10mg/kg seguido por 0.25 a 2.0% de DSS en el agua de beber, presentan sólo criptas displásicas y no se han reportado tumores (De Robertis et al. 2011)

Compuestos bioactivos y su relación con el cáncer de colon

1.1.14 Fitoquímicos y su relación con el cáncer de colon

Los fitoquímicos son nutraceuticos o compuestos bioactivos que se encuentran naturalmente en plantas y han recibido atención en la mejora de la salud general y específicamente para la prevención del cáncer de colon. Se ha demostrado que tienen la habilidad de detener el crecimiento de las células cancerosas a través de la modulación de genes y proteínas involucrados en el desarrollo del tumor (Slattery et al. 2004). Varios fitoquímicos han sido asociados a un efecto preventivo o anticancerígeno específicamente en cáncer de colon, como lo reportado por Demidenko & Blagosklonny (2004), donde se demuestra que flavonoides como la luteolina induce arresto del ciclo celular en células de cáncer de colon humano HT-29, previniendo la proliferación en las fases G1/S y G2/M. Así mismo Majumdar et al. (2009) reporta que el resveratrol redujo los niveles de IGF-1R en un 74% donde se ha demostrado que el eje IGF tiene un papel en la promoción de la proliferación celular y en la inhibición de apoptosis en células de cáncer de colon HCT-116, donde

el efecto benéfico fue evidente para la promoción de la apoptosis. También Singh et al. (2011) confirma que el flavonol EGCG inhibe MAPK (proteína cinasa activadora de mitógenos) en células de cáncer de colon SW-837. El kaempferol, otro flavonoide, inhibe el crecimiento de células HT-29 provocando apoptosis celular. La inhibición de IGF-1R se basa en la actividad de las vías de señalización de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K), Akt y ERK-1/2 (Lee et al. 2014).

En este contexto, existe un fruto endémico de México que se ha determinado que cuenta con una amplia variedad de compuestos bioactivos o fitoquímicos, con actividad biológica tal que podría ser un candidato prometedor en la prevención y/o tratamiento coadyuvante en el cáncer. El fruto es el garambullo, cuyo consumo se reduce a pequeñas poblaciones del país, por lo que este trabajo serviría para darle un valor agregado.

1.1.15 Betalaínas y su relación con el cáncer de colon

Las betalaínas con pigmentos que contienen nitrógeno encontradas exclusivamente en plantas y frutos pertenecientes a la familia del orden *Caryophyllale* reemplazando a las antocianinas. Generalmente son utilizadas como colorantes aditivos en alimentos y consisten en betaninas (color magenta) y betaxantinas (color amarillo) (Rahimi et al. 2018) Además, las betalaínas son reconocidas como moléculas nutraceuticas por poseer alta actividad antioxidante (Prakash et al. 2024) Se ha demostrado que son capaces de proteger el cuerpo humano contra los daños provocados por radicales libres y especies reactivas de oxígeno que atacan a macromoléculas tales como lípidos de membrana, proteínas y al ADN, asociadas a trastornos de salud como el cáncer, diabetes mellitus, envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas (Gandía-Herrero & García-Carmona, 2013). Existen reportes que asocian a las betalaínas (obtenidas de *Beta vulgaris*) con la inhibición de COX-1 y COX-2 y con actividad antiproliferativa en células de cáncer de colon HCT-116 (Reddy et al. 2005). Así mismo, betacianinas purificadas de tuna

(*Opuntia ficus-indica*) en una dosis de 40 mM mostraron una disminución en la proliferación de células K562 (leucemia mieloide crónica humana) y apoptosis en una manera dosis y tiempo dependiente a través de la vía intrínseca, induciendo la liberación de citocromo C, escisión de PARP y regulación descendente de Bcl-2 (Sreekanth et al. 2007). También Chavez-Santoscoy et al. (2009) demostró que el jugo de algunas variedades de tuna con alto contenido de betalaínas (*Opuntia robusta* Gavia, *Opuntia streptacantha* Cardon, *Opuntia ficus indica*) disminuyeron la viabilidad y crecimiento celular en células de adenocarcinoma de colon Caco2 sin afectar la viabilidad de fibroblastos. En cuanto a ensayos *in vivo*, Lechner et al. (2010) reportó que el consumo de jugo de betabel (concentración 78 µg/ml durante 35 semanas) por ratas inducidas a cáncer de esófago con N-nitrosomethylbenzylamina (NMBA) indujo apoptosis y disminuyó la proliferación celular, angiogénesis e inflamación.

Cabe resaltar que se ha reportado que las betaninas son metabolizadas en un 60% por el colon según lo reportado por Krantz et al. (1980). Muchos estudios han mostrado que las betalaínas son fitoquímicos que pueden actuar a través de varios mecanismos de defensa antioxidante y mejorar el equilibrio redox para reparar los daños por estrés oxidativo (Rahimi et al. 2018)

1.1.16 Fibra dietética y fibra antioxidante o residuo

Se define como fibra alimentaria o dietética a los polímeros de carbohidratos comestibles que no se hidrolizan por las enzimas endógenas en el tracto gastrointestinal de los humanos (Zielinski et al. 2013). Esto debido a que ciertos enlaces α -glucosídicos de las fibras (por ejemplo, enlaces α -1, 2, α -1, 3, α -1, 4, α -1, 6) pueden ser parcialmente hidrolizados por la amilasa pancreática y/o las enzimas glucosídicas del borde en cepillo, mientras que los enlaces β -glucosídicos no se pueden digerir, ya que el genoma de mamífero no codifica las enzimas necesarias.

La fibra dietética está compuesta de almidón resistente y polisacáridos/oligosacáridos que no contienen almidón y se pueden clasificar como solubles o insolubles según el grado en el que se puedan extraer o puedan ser disueltos en agua (Gill & Dudeja et al. 2011). Las fibras dietéticas solubles (β -glucanos, arabinosilanos, pectinas, galactomananos, inulina, fructo-oligosacáridos y galacto-oligosacáridos) se fermentan en el colon y se degradan a metabolitos fisiológicamente activos y gases. La fibra dietética insoluble puede ser metabólicamente inerte y proporcionar volumen (la celulosa altamente cristalina) o ser parcialmente fermentada en el intestino grueso (como lo son las paredes celulares de plantas, lignina y quitina) (Wang et al, 2019).

El colon humano alberga más de 100 billones de microorganismos con más de 1000 especies microbianas distintas (Ley et al. 2006). La ecología microbiana del intestino contribuye a importantes funciones metabólicas e inmunitarias y puede tener un impacto significativo en el estado de salud del huésped. Las bacterias comensales residentes producen enzimas catabólicas y sistemas metabólicos para degradar las fibras dietéticas. Estudios recientes han demostrado que la fibra dietética regula el perfil de microbiota intestinal. La capacidad de los microorganismos para utilizar tipos específicos de fibras depende de la producción de las enzimas de escisión necesarias (alfa glucosidasa, beta glucosidasa, beta glucuronidasa) y las proteínas y transportadores que se unen a los carbohidratos. Algunas especies de *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium* (poblaciones bacterianas dominantes en el intestino) codifican una gran cantidad de enzimas activas en carbohidratos y pueden controlar la expresión de los genes enzimáticos correspondientes según las diferentes fuentes de fibra dietética (Thomas et al. 2011).

El estudio de la fibra dietética ha sido un tema de interés en la comunidad científica debido a que su asociación con la correcta salud intestinal. Un estudio reciente mostró que los africanos que consumen más fibra en los alimentos sufren menos

enfermedades no infecciosas (por ejemplo, cáncer de colon, diabetes y enfermedades cardiovasculares) que aquellos que consumen alimentos más refinados que son altos en energía y bajos en fibra (Topping & Lockett, 2016).

La fermentación es una función importante del colon y se reconoce como el proceso donde las bacterias anaeróbicas descomponen los carbohidratos generando ácidos grasos de cadena corta, gases como hidrógeno, metano y dióxido de carbono y otros metabolitos (Wang et al. 2019). El primer paso es convertir las fibras dietéticas en monosacáridos (pentosas o hexosas) mediante glucósido-hidrolasas y luego generar AGCC como principales productos finales a través de la glucólisis o de la vía de las pentosas-fosfato.

1.1.17 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Los AGCC son un grupo de ácidos carboxílicos que incluyen en su mayoría (90-95%) acetato, propionato y butirato; sin embargo, existen proporciones más pequeñas de valerato, hexanoato, caproato y ácidos grasos de cadena ramificada (isovalerato) (David et al. 2014; Topping & Lockett, 2016). El acetato se produce principalmente a partir del piruvato a través de catálisis enzimática (piruvato liasa y acetato-CoaA- ligasa) con el intermedio metabólico acetil-CoA, mientras que la síntesis del propionato es por la vía del succinato que genera oxaloacetato a partir de piruvato, lo convierte en succinato, succinil-CoA, propionil-CoA y finalmente propionato, además, es importante recalcar que las bacterias pueden utilizar otros sustratos para la síntesis de AGCC como aminoácidos de proteínas dietéticas o endógenas o ácidos orgánicos como el lactato (Wang et al. 2019)

El acetato, propionato y butirato se generan en una concentración aproximada de 100 mM en el lumen colónico en una proporción de 60:20:20 (Ganapathy et al. 2013). Después de producirse en la luz del colon, los AGCC se transportan a través del epitelio por difusión, mediante un mecanismo de baja afinidad como el

intercambio de bicarbonato/AGCC, de afinidad media como el que involucra el transportador de monocarboxilato 1 o mediado por el transportador 1 de monocarboxilato acoplado a sodio (SMCT1 o SLC5A8) (Thangaraju et al. 2008). Ya en el tejido colónico los AGCC se metabolizan en lípidos o cuerpos cetónicos como el beta-hidroxibutirato, acetoacetato, siendo muy pocos los AGCC que realmente llegan a la circulación portal, por lo que cantidades insignificantes de butirato, propionato y acetato están presentes en la sangre periférica (solo el 5-10% se excreta en las heces) (Sivaprakasam et al. 2016). Esto sugiere que los AGCC actúan localmente sobre el epitelio y las células inmunes presentes en el colon para inducir efectos promotores de la salud ya que efectos adversos en el organismo se han reportado cuando hay concentraciones bajas o excesivas de éstos; sin embargo, no se ha establecido una concentración óptima en el ser humano (Xu et al. 2020). Estos ácidos grasos tienen funciones importantes en diferentes órganos como el hígado, músculo esquelético, tejido adiposo y los islotes pancreáticos ya que pueden afectar el metabolismo de los carbohidratos y el uso de lípidos, siendo cruciales para la homeostasis energética, modulando indirectamente, síntomas de obesidad y diabetes (Perry et al. 2016; Zhao et al. 2018). Los AGCC también pueden limitar la inflamación e inhibir el crecimiento de células tumorales (Xu et al. 2017)

De los AGCC, el butirato es el que ha sido mayormente investigado por su rol en la supresión de inflamación y carcinogénesis colónica (Hamer et al. 2008). Las bacterias anaerobias del género *Clostridium* son las que en su mayoría producen este ácido graso en el colon, siendo las bifidobacterias los principales participantes de su producción (Belenguer et al. 2006). El butirato es la principal fuente de energía en los colonocitos y previene la carcinogénesis del colon (Wu et al. 2018). Además de proveer energía, los AGCC acidifican el ambiente colónico, lo cual promueve la captación de amonio NH_4 por parte de las bacterias y la eliminación a través de las heces, lo que estimula el crecimiento de bacterias benéficas al mismo tiempo que inhibe las patógenas.

Se han reportado numerosos beneficios del butirato en el intestino, dentro de los cuales se incluyen: aumento en la absorción de cloruro de sodio (NaCl) mediante la activación de bombas Na/H y Cl/HCO₃, influye en la proliferación y diferenciación celular, desempeña un papel antiinflamatorio mediante la modulación de la liberación de la prostaglandina E2, citocinas y quimiocinas de las células inmunes, altera la función de la barrera intestinal al inducir la síntesis de mucina y la producción de péptidos antimicrobianos, afecta la movilidad del colon al modular la acetilación en el plexo mientérico y mediante la liberación de 5 HT (Canani et al. 2004; Comalada et al. 2006; Greer et al. 2011; Cox et al. 2009; Canani et al. 2011; Soret et al. 2010)

El efecto quimiopreventivo del butirato está mediado por la regulación positiva de enzimas desintoxicantes para xenobióticos y oxidantes, un efecto que se deriva de acciones bastante complejas del butirato sobre la proliferación y diferenciación celular. Estas acciones se denominan como la “paradoja del butirato”, término que se deriva de su capacidad para inhibir la proliferación celular e inducir apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon mientras que en condiciones normales induce la proliferación celular en las criptas del colon (Alrawi et al. 2006). Uno de los blancos más estudiados del butirato y propionato son las desacetilasas de histonas (HDAC) una familia de proteínas que se subdividen en 2 grupos: El grupo 1 contiene las HDAC -1, -2,-3 y -8, mientras que el grupo 2 contiene HDAC4, -5,-6,-7,-9 Y -10. El butirato y propionato inhiben específicamente la actividad de HDAC-1 y -3 lo que conduce a un aumento de la acetilación en residuos de lisina en las histonas, disminuyendo la carga positiva de las mismas, esto evita que la histona se una al ADN cargado negativamente resultando en una cromatina abierta de cromatina que se convierte en accesible a la transcripción de genes proapoptóticos (Thangaraju et al. 2009)

La respuesta transcripcional inducida por el butirato se lleva a cabo mediante el factor de transcripción Sp3 acoplado a HDAC1 y HDAC2. La proteína pro-apoptótica

Bak está regulada positivamente en presencia de butirato, lo cual es esencial para la cascada apoptótica en las células de cáncer de colon. La proteína p21 también está regulada al alza, bloqueando la progresión del ciclo celular en éstas células malignas. La regulación positiva de Bak y p21 es causada por la unión menos efectiva de Sp1 a las regiones promotoras, lo que permite la unión por Sp3. Posterior a esto, Sp3 activa la transcripción de genes involucrados en el bloqueo del ciclo celular en la interfase G2/M y en la inducción de apoptosis. En las células de cáncer de colon la activación de Apaf-1 y de IE24 está regulada negativamente, sin embargo, los AGCC en especial el butirato regulan positivamente ambos factores. También cabe mencionar que Bcl-2 al interactuar con Bak bloquea la cascada de caspasas siendo factores antiapoptóticos que son inhibidos por los AGCC (Campos-Vega et al. 2010).

Algunos estudios reportan alto contenido de butirato en el ciego de ratas inducidas a cáncer de colon con AOM al ser alimentadas con extractos de polisacáridos y un incremento en la expresión de Bax y caspasa-3 y por consecuencia, incremento de apoptosis (Feregrino-Pérez et al. 2008). Así mismo, se han reportado otros efectos anticancerígenos del butirato sobre la vía canónica de señalización Wnt activada constitutivamente en gran porcentaje en el cáncer de colon como inducción de autofagia en células epiteliales del colon y aumento en la expresión del gen *P21* lo que induce a la detención del ciclo celular mediante la inhibición de HDAC. Los efectos adicionales del butirato sobre la apoptosis celular implican efectos sobre las proteínas de la familia Bcl2, por ejemplo, la regulación positiva de Bak (proapoptótico) y la regulación negativa de BclxL (antiapoptótico) (Gill & Dudeja, 2011).

Polifenoles y su relación con el cáncer de colon

Los polifenoles son metabolitos secundarios derivados de plantas que contienen químicamente anillos de benceno con restos OH (Nabavi et al. 2018; Cao et al.

2019). Se extienden desde los flavonoides simples y los ácidos fenólicos hasta los estructuralmente complejos, incluidas las antocianinas (Xiao, 2017). Tales compuestos desempeñan un papel importante en los mecanismos la defensa y protección de las plantas (Alasalvar et al. 2001; Edreva et al. 2008), y de manera similar, poseen propiedades benéficas para la salud (Kardum & Glibetic, 2018).

Los polifenoles han mostrado una actividad anticancerígena a través de numerosas vías de señalización, incluida la apoptosis tanto extrínseca como intrínseca (Curti et al. 2017). La ruta de señalización de *TP53* ha mostrado ser de suma importancia, siendo éste un gen supresor de tumor que se le considerado el guardián del genoma humano (Tanikawa et al. 2017). Se ha reportado que los polifenoles producen su actividad protectora en una variedad de cánceres dependiente o independientemente de p53 (Gupta et al. 2012; Lee, S. et al. 2014; Periasamy & Alshatwi, 2013). Los mecanismos moleculares de protección por parte de los polifenoles incluyen: la disminución de la proliferación celular, la inactivación de carcinógenos, la inhibición de la angiogénesis, la inducción de la detención del ciclo celular, la apoptosis y la modulación de la inmunidad (Pan, 2018; Rady et al. 2018; Reboredo-Rodríguez, 2018). Estos efectos pueden ser modulados tanto por los compuestos provenientes del alimento como los productos de la metabolización de los mismos por la microbiota intestinal.

Se ha demostrado que los compuestos fenólicos y otros fitoquímicos pueden alcanzar el colon a través de la fibra antioxidante, por medio de uniones no covalentes a la matriz de la fibra dietaria. En colon son liberados y metabolizados, generando efectos benéficos en ese órgano (Quirós-Sauceda et al. 2012).

1.1.18 Polifenoles extraíbles (EPP) y polifenoles no extraíbles (NEPP)

Como se mencionó anteriormente, diversos estudios han reportado la presencia de compuestos naturales asociados a la fibra dietaria, lo que constituye la llamada fibra

antioxidante o residuo (Saura-Calixto, 2012). Los compuestos fenólicos ligados a la fibra dietaria han sido clasificados de acuerdo a su solubilidad (y a los procesos por los cuales pueden ser separados de la matriz alimentaria) en dos categorías: polifenoles extraíbles (EPP por sus siglas en inglés) y polifenoles no extraíbles (NEPP por sus siglas en inglés) (Pérez-Jiménez et al. 2013).

Los EPP son regularmente extraídos por solventes orgánicos acuosos, mientras que los NEPP no se liberan significativamente de la matriz alimentaria a la que se encuentran ligada por procesos de digestión, por lo que llegan al colon casi intactos, en donde sufren modificaciones químicas y estructurales durante el proceso de fermentación de carbohidratos, y se producen metabolitos potencialmente absorbibles. Con el fin de analizarlos, se requiere separarlos de dicha matriz a través de métodos de extracción más poderosos empleando ácidos y altas temperaturas (Saura-Calixto & Pérez Jiménez, 2018).

Los NEPP han sido totalmente ignorados hasta hace poco tiempo, ya que se asumía que el total de los polifenoles de una muestra alimentaria estaban presentes en el extracto resultante al utilizar solventes orgánicos acuosos, descuidando la posible presencia de los mismos en los residuos de la extracción, sin embargo, diariamente ingerimos grandes cantidades tanto de EPP como de NEPP. Actualmente, existen muchos fitoquímicos contenidos en los alimentos que han sido caracterizados y comercializados como extractos o compuestos aislados/purificados, de hecho, en los últimos 20 años se han registrado alrededor de 5000 patentes relacionadas con EPP, ignorando completamente las aplicaciones potenciales de los NEPP (Pérez-Jiménez & Torres, 2011; Saura-Calixto & Pérez Jiménez 2018).

Los NEPP incluyen: polifenoles poliméricos de alto peso molecular como lo son las proantocianidinas no extraíbles (NEPA por sus siglas en inglés) que están libres en la matriz alimentaria o en la pared celular de los polisacáridos, y compuestos fenólicos simples unidos a carbohidratos (en su mayoría polisacáridos de la fibra

dietaria) y a proteínas, denominados polifenoles hidrolizables (HPP por sus siglas en inglés). Éstos últimos incluyen muchos compuestos bioactivos tales como los taninos hidrolizables, ácidos hidroxicinámicos y sus derivados (los más comunes son ácido ferúlico, caféico, sinápico, elágico, etc.) (John & Shahidi, 2010). La forma en que los NEPP interactúan con la matriz alimentaria es a través de enlaces hidrógeno, interacciones hidrofóbicas (incluyendo posibles encapsulaciones en bolsas hidrofóbicas) y enlaces covalentes (para formar ésteres y enlaces éter) (Burr & Fry, 2009; Bunzel, 2010).

Existen pocos estudios que reportan la estimación de NEPP en diferentes alimentos. Algunos reportes han mostrado el análisis de los mismos en la dieta mediterránea, en la cual, al determinar el contenido total de polifenoles consumidos, se encontró que en todos los grupos de alimentos a base de plantas el contenido de NEPP fue mucho mayor que el de EPP. Así de la ingesta total estimada de polifenoles de 1800-3000 mg por persona por día, siendo el 50% correspondiente a los NEPP. Las frutas fueron las que más contribuyeron a la ingesta de NEPP (47%) seguida por los cereales (31%), verduras (13%), legumbres (6%) y nueces (4%) (Arranz et al. 2010; Saura-Calixto et al. 2007). Así mismo, Esparza et al. (2016) reportaron 38% más NEPP que EPP en residuos de lima (*Citrus aurantiifolia*). También Kristl et al. (2011) mostraron que en la ciruela (*Prunus domestica L*) existe mayor cantidad de NEPP que EPP, reportando tan sólo un 18% de la actividad antioxidante total a los antioxidantes de la fracción extraíble, y el resto a la no extraíble, sugiriendo que la actividad antioxidante de este fruto pudiera estar subestimada en la literatura.

Dado que los NEPP llegan al colon de forma casi intacta y ahí sufren su transformación metabólica, es evidente que uno de sus principales objetivos de acción es el colon. Varios estudios han mostrado resultados prometedores después de la suplementación con productos ricos en NEPP en modelos animales (Goñi & Serrano, 2005; Lizarraga et al. 2011; López-Olivía et al. 2013). Por ejemplo, estudios donde suplementan a ratas Wistar con residuo de uva, pulpa de manzana, y

alcachofa (5-13%), durante 4 semanas, muestran que los NEPP tienen un efecto benéfico sobre la salud colónica a través de diferentes mecanismos: 1) aumento en el peso de las heces, reduciendo el tiempo de tránsito y de contacto de los compuestos tóxicos con el epitelio del colon, 2) incremento de la capacidad antioxidante del contenido cecal y por lo tanto en la expresión de sistemas antioxidantes endógenos contrarrestando así las ERO's promotoras de tumores en el colon, 3) efecto prebiótico por la estimulación de *Lactobacillus* (efecto observado en ratas suplementadas con productos ricos en NEPP pero no en las que tenían dietas control) 4) disminución de FCA 5) reducción significativa en el número (276%) y tamaño (265%) de pólipos y 6) modificaciones en la expresión de genes relacionados con la proliferación celular pertenecientes a la familia *RAS* y la regulación positiva de genes supresores de tumores. Resaltando que en ninguno de estos estudios existieron efectos adversos o tóxicos en los animales (Bravo et al. 1993; Martin et al. 2000; Aprikian et al. 2003; Goñi & Serrato 2005; López-Olivía et al. 2006; López-Olivía et al. 2010; Pozuelo et al. 2012; López-Olivía et al. 2013; Sánchez et al. 2013)

1.1.18.1 Hidrólisis ácida como método para extraer los NEPP

Para cualquier extracción, existen diferentes factores que van a influir en la misma, como lo son el tipo de solvente utilizado, el tiempo de extracción, la temperatura, el pH, etc. Para liberar los NEPP, se requiere llevar a cabo varios tratamientos hidrolíticos. Éstos se deben ajustar dependiendo de las fracciones específicas de los NEPP (HPP y NEPA) y el tipo de muestra alimentaria a analizar (Durazzo et al. 2013).

La hidrólisis alcalina es el procedimiento que generalmente se utiliza en los extractos acuosos orgánicos y muestras secas para la escisión del enlace éster, sin embargo, una cantidad apreciable de polifenoles unidos a la pared celular o atrapados en núcleos dentro de la matriz alimentaria pueden permanecer insolubles

después de la extracción acuosa-orgánica y/o el tratamiento con el álcali (Adom & Liu, 2002; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2005). Es por esto que el empleo de ácidos fuertes para hidrólisis, implica una alteración de la estructura de la pared celular y permite la liberación de los polifenoles ya mencionados. Varios estudios, finalmente, han reportado que el contenido de polifenoles hidrolizables es de 2 hasta 9 veces mayor que lo contenido en extractos metanol/acetona/agua para diferentes alimentos como la manzana, plátano, pera, mandarina, zanahoria, acelga, achicoria, lechuga, betabel y trigo (Arranz & Saura-Calixto, 2010; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2015; Ye et al. 2011). Así mismo, Arranz et al. (2010) demuestran que la hidrólisis ácida (utilizando H_2SO_4 o HCl) es más efectiva para la liberación de polifenoles en residuos posteriores a la extracción de EPP en comparación con la hidrólisis alcalina (utilizando $NaOH$).

El procedimiento general consiste en la extracción común para EPP, lo que incluye el uso de solventes como el metanol en combinación con agua, agitación a temperatura ambiente, centrifugación y filtrado. Una vez obtenido el residuo (que comúnmente se desecha) se le agrega ácidos concentrados como el H_2SO_4 , o HCl y una vez que se mezclan suavemente, se coloca en agitación constante en un baño de $85\text{ }^{\circ}C$ por 20 horas (Hartzfeld et al. 2002; Arranz & Saura-Calixto, 2010.), este procedimiento es el reportado para el análisis de HPP, mientras que para NEPA se utiliza una combinación de butanol/ HCl y $FeCl_3$ a $100\text{ }^{\circ}C$ por 60 minutos (Domínguez-Rodríguez et al. 2017).

Garambullo

1.1.19 Características generales del garambullo

El garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) es una cactácea del reino *Plantae*, la cual presenta un periodo de vida de más de 50 años, puede de ser fácilmente propagado y su fruto es fuente de gran cantidad de compuestos bioactivos que han

sido explotados casi en su totalidad por comunidades indígenas y locales que no han extendido sus beneficios (Hernández-López et al. 2008)

El garambullo forma parte de la división *Magnoliophyta*, de la clase *Magnolopsida*. Posee flores blancas-verdosas, pequeñas de 2.5 a 3.5 cm de ancho en la parte superior de las areolas; así mismo, produce un fruto globoso, de 1 a 2 cm de diámetro, color púrpura, sin espinas y es comestible. El garambullo crece en condiciones de clima seco y se desarrolla bien sobre las laderas de los cerros y partes bajas donde hay suelos de mejor calidad. Las semillas de garambullo germinan muy fácilmente en casi cualquier tipo de suelo por más rocoso y árido que éste sea (Guzmán-Maldonado et al. 2010).

El garambullo se encuentra distribuido en Hidalgo, San Luis Potosí, Querétaro y Guanajuato, siendo estos sus productores principales. La floración sucede en primavera, es susceptible al frío, siendo la temperatura más adecuada para esta especie durante el invierno de 10°C como mínimo. En cada punto de fructificación se forman de 6 a 7 frutos y una planta puede llegar a producir entre 25,000 a 30,000 frutos por temporada; y hasta 70 plantas por hectárea. Su desventaja es la corta vida post-cosecha de su fruto, ya que se recolecta en la madurez para su consumo. Sin embargo, si el fruto se refrigera a 4°C o congela a -2°C se mantiene en buen estado hasta por 50 días en el primer caso y en el segundo se puede observar, al descongelarse después de 50 días aparecen ciertos daños físicos y una disminución de aroma y sabor, sin afectar la composición de sus pigmentos (Hernández-López et al. 2008).

1.1.20 Compuestos bioactivos del garambullo

Una de las características más importantes del fruto garambullo es su pigmentación, la cual se debe principalmente a la presencia de fitoquímicos conocidos como betalaínas (Hernández-López et al. 2008). Otros compuestos encontrados en el

fruto del garambullo son la clorofila, carotenoides, diversos compuestos fenólicos, vitaminas, fibra dietética y ácidos grasos, todos ellos con importantes actividades biológicas. Por ello, el fruto del garambullo es un recurso con gran potencial que no ha sido adecuadamente explotado ni estudiado más allá de unas cuantas moléculas de interés industrial y alimentario. Hasta el momento, los compuestos fenólicos reportados (mg/kg materia fresca) en la fracción soluble del garambullo incluyen: ácido caféico (8.67 ± 0.22), ácido gálico (22.6 ± 0.8), vanillina (6.58 ± 0.22), ácido elágico (4.7 ± 0.5), ácido protocatecánico (52.2 ± 0.5), quercetina (224 ± 4.8), EGCG (13.4 ± 0.2) y epicatequina (9.6 ± 2.0) (Guzmán-Maldonado et al. 2010; Herrera-Hernández et al. 2011).

Esto nos lleva a la imperiosa necesidad de enfatizar en que el garambullo puede ser fuente de fitomoléculas de interés, además de las betalaínas, esto para promover su producción y aprovechamiento no solo para obtener beneficio de sus propiedades, sino también desarrollo de las comunidades productoras (Herrera-Hernández et al. 2011). Para fines de este proyecto, nos enfocaremos a estudiar los compuestos mayoritarios del garambullo tales como betalaínas, compuestos fenólicos y fibra dietética.

1.1.20.1 Betalaínas

Como ya se mencionó el fruto del garambullo es una fuente importante de betalaínas, sin embargo, no se han realizado suficientes estudios para profundizar en su completa caracterización fitomolecular. La concentración reportada de betalaínas es de 97.7 mg/kg de fruto fresco (Herrera-Hernández et al. 2011).

1.1.20.2 Fibra dietética

El contenido de fibra dietética en el garambullo se ha reportado de 36.9 ± 0.32 g/kg de fruto fresco (Guzmán-Maldonado et al. 2010).

En el caso del garambullo, los reportes indican que presenta un alto contenido de fibra y compuestos fenólicos extraíbles, pero los no extraíbles aún no han sido analizados.

2 JUSTIFICACIÓN

El cáncer de colon es una enfermedad degenerativa considerada como un gran problema de salud pública debido al alza en su incidencia en México y en el mundo, y que se ha reportado que pudiera ser prevenido por alimentos con contenido de fitoquímicos por diferentes vías moleculares. Los fitoquímicos son compuestos presentes en fuentes vegetales cuyas propiedades se han aprovechado durante milenios y, actualmente, se estudian en diferentes áreas de la salud con la finalidad de darles un sustento científico en la prevención y/o tratamiento de enfermedades no transmisibles. Un fruto que ha sido reconocido como rico en fitoquímicos es el garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*), pero no ha sido evaluado su efecto sobre la salud intestinal. Por lo que es necesario realizar una completa caracterización nutracéutica que nos permita aumentar el conocimiento de los fitoquímicos que se encuentran en este fruto, y a su vez, analizar su efecto sobre la prevención del desarrollo de cáncer de colon, así como elucidar los posibles mecanismos de acción molecular en un modelo *in vivo*.

3 HIPÓTESIS

El garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) y su residuo presentan propiedades nutracéuticas y un efecto quimiopreventivo sobre el estadio temprano de cáncer de colon en un modelo *in vivo*.

4 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las propiedades nutraceuticas del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) y evaluar su efecto quimiopreventivo, así como el de su fibra residuo, sobre el estadio temprano de cáncer de colon inducido químicamente *in vivo*.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar nutraceuticamente el garambullo completo y su residuo.
- Evaluar el efecto del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) y su residuo sobre el desarrollo de fosas crípticas aberrantes (FCA) inducidas con azoximetano en ratas Sprague-dawley.
- Determinar la producción de ácidos grasos de cadena corta en el contenido colónico y fecal.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

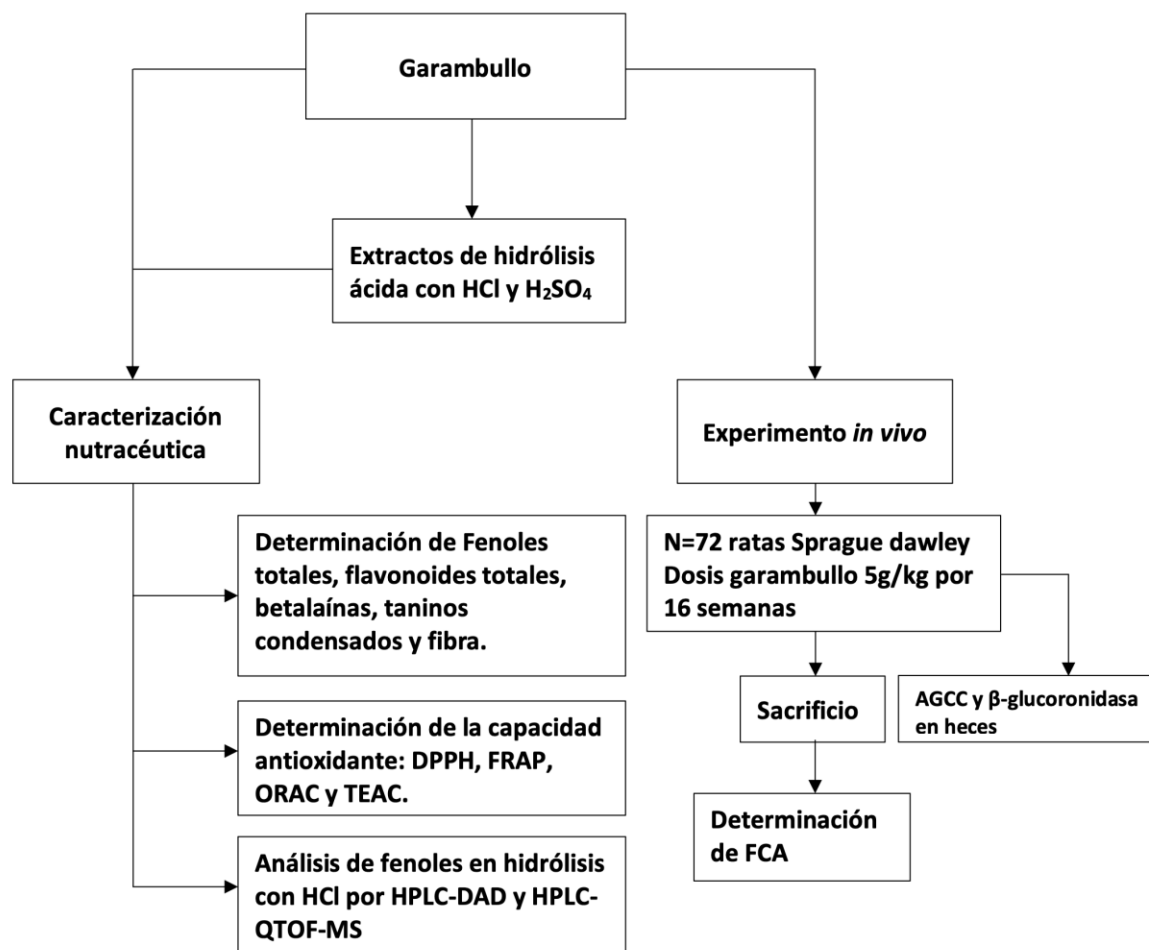


Figura 7. Diseño experimental

Obtención de la muestra y elaboración de los extractos

La muestra se obtuvo de la comunidad Garabatillo ubicada en el estado de Guanajuato, México. La recolección se llevó a cabo en los meses de junio, julio y agosto ya que es la temporada del fruto. Una vez cosechados los garambullos, fueron seleccionados conforme a su madurez la cual incluía color púrpura intenso, turgentes al tacto, sin maceraciones; fueron lavados al chorro de agua y liofilizados.

Posteriormente se almacenaron en contenedores al vacío (debido a su gran hidroscopticidad) en ultra refrigeración hasta su análisis.

6.1.1 Hidrólisis química ácida

Los extractos de hidrólisis química ácida se llevaron a cabo de acuerdo a lo reportado por Arranz & Saura-Calixto (2010). Se pesaron 100 mg de muestra liofilizada, posteriormente se realizó la extracción con 20 ml de metanol-agua (30-70). Se agitó en vórtex a 8000 rpm, se centrifugó a temperatura ambiente a 10,000 rpm por 10 minutos y se filtró con papel Whatman (0.20 μm). El sobrenadante se desechó y el residuo se utilizó para someterlo a hidrólisis. Al pellet se le agregaron 20 ml de metanol 30%-ácido clorhídrico en una relación 90:10, se agitó en vórtex por 5 minutos y se sometió a baño maría a 95°C por 20 h. Posterior a esto se atemperó y se centrifugó durante 5 minutos. Se almacenó hasta su análisis a -20°C, el almacenamiento no debió ser mayor a 1 mes. Se reportan 2 tipos de hidrólisis química. Una se realiza con ácido sulfúrico y otra con ácido clorhídrico. Ambas hidrólisis se realizaron ambas a dos concentraciones diferentes: 4M y 1M.

Determinación de fibra dietaria

Se utilizó el método gravimétrico enzimático descrito por Prosky et al. (1988) con ligeras modificaciones

Fibra dietaria total. Se pesó 1g de muestra, previamente desgrasada en 2 vasos de precipitados de 250 ml (1g en cada vaso), se le adicionó 50 ml de una solución amortiguadora de fosfatos (1.4g de NaHPO_4 y 8.4g de NaH_2PO_4) + 0.1 ml de la enzima α -amilasa, los vasos fueron agitados cubiertos con papel aluminio y colocados en baño maría. Los vasos fueron agitados a intervalos de 5 min. Se incubaron por 15 min después de que la temperatura interna de los vasos alcanzó 95°C. Se dejó enfriar los vasos a temperatura ambiente y posteriormente se les

ajustó el pH a 7.5 ± 0.05 adicionando 10 ml de NaOH 0.275 N (verter 275ml de NaOH 1N en un matraz y aforar a 1 L con agua destilada) medir el pH (si es necesario ajustar con NaOH o HCl 5%). Posteriormente se adicionó 0.1 ml de una solución de proteasa (50g/ml) preparada al instante con la solución de fosfatos (cada vaso contenía 5 mg de proteasa). Los vasos fueron cubiertos de nuevo con papel aluminio y colocados en baño maría a 60°C. Nuevamente se dejaron enfriar los vasos y se ajustó el pH entre 4.0 y 4.6 adicionando 10 ml de HCl 0.325 M (verter 325 ml de HCl 1N en un matraz y aforar a 1L con agua destilada) medir pH (si es necesario ajustar con NaOH o HCl 5%).

Se adicionó 0.1 ml de amiloglucosidasa a cada vaso, se incubó con papel aluminio nuevo y se colocó nuevamente en el baño maría a 60°C y agitación continua. Se incubó por 30 min después de que la temperatura interna alcanzó 60 °C. Después de este proceso se adicionaron 4 volúmenes de etanol al 95% a cada vaso, aproximadamente 280 ml (en un matraz volumétrico de 1L se colocaron 10.4 ml de agua destilada y se afora con etanol al 96%) se cubrieron con aluminio y se dejó reposar a temperatura ambiente hasta el día siguiente para completar la precipitación. Al día siguiente, en tubos previamente tarados (tubos falcon, pesar antes y anotar) fue centrifugado (10 min a 5000 rpm) el contenido de los vasos (con cuidado de no perder residuos en los vasos). El sobrenadante fue desechado y los residuos fueron congelados en los tubos para posteriormente liofilizarlo. Los residuos secos fueron pesados y registrados (R1= residuo uno y R2= residuo dos). El residuo uno fue utilizado para determinar el contenido de proteína y el residuo dos para determinar el contenido de ceniza.

El % de fibra dietaria total fue calculado de la siguiente manera:

$\% \text{ fibra dietaria total} = (\text{promedio R1 y R2 (mg)} - \text{proteína (mg)} - \text{ceniza (mg)}) * 100$

Caracterización fenólica

6.1.2 Determinación de compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos totales (CFT) fueron cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu, el cual está basado en la reducción de ácido gálico por compuestos fenólicos en presencia de un álcali (carbonato de sodio) (Singleton et al. 1999). Brevemente, se pesaron 100 mg de muestra homogenizada en un tubo falcon y se adicionaron 10 ml de metanol al 30%, se agitará en un vórtex a 8000 rpm durante 10 min, se centrifugó y filtró con papel Whatman (0.20 μm) hasta obtener todo el líquido. Se tomó una alícuota de 125 μl de extracto y se colocó en un tubo de ensayo. Se adicionó 500 μl de agua desionizada y se agitó brevemente a 3000 rpm. Después se le agregaron 125 μl de reactivo de Folin-Ciocalteu y se agitó brevemente a 3000 rpm. Se dejó reposar 6 min en la oscuridad. Posteriormente se adicionó al tubo 1.25 ml de Na_2CO_3 al 7% y 1 ml de agua desionizada, se agitó brevemente a 3000 rpm. Se dejó reposar 1.5 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. Después del reposo se leyó a una absorbancia de 750 nm en el espectrofotómetro (64 UV/Vis, JENWAY). En otro tubo se preparó el factor de corrección con 125 μl del extracto de la muestra y todos los reactivos bajo las mismas condiciones a excepción del reactivo de Folin-Ciocalteu. Por otro lado, se prepararon dos blancos de calibración. Para el blanco de calibración de las muestras se usó metanol al 30% y con todos los reactivos bajo las mismas condiciones. Para el blanco de calibración del factor de corrección se usó metanol al 30% y todos los reactivos bajo las mismas condiciones a excepción del folin. La concentración final se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico por 100 g de fruto liofilizado (mg EAG/kg GL). Se realizó una curva estándar de calibración con el estándar correspondiente para cada una de las determinaciones.

6.1.3 Determinación de flavonoides totales

La determinación de los flavonoides totales (FT) se realizó de acuerdo al principio de la formación de un complejo color rojo claro por la reacción de los iones aluminio con los flavonoides en un medio alcalino (Dewanto et al. 2002). Para la extracción de la muestra se pesaron 200 mg de muestra en un tubo falcon se adicionaron 5 ml de metanol acuoso (60:40), se agitó en un vórtex durante 10 min. Se sonicó a temperatura ambiente por 30 min; después se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se filtró el sobrenadante con papel Whatman. Se procedió a realizar un lavado siguiendo los pasos antes mencionados. Posteriormente se tomó una alícuota de 250 µl del extracto y se colocó en un tubo de ensayo. Se le adicionaron 75 µl de NaNO₂ al 5% y se agitaron brevemente. Después se le agregaron 150 µl de AlCl₃ al 10 % (recién preparado) y 500 µl de NaOH 1M agitando nuevamente y finalmente se adicionaron 1525 µl de agua desionizada para ajustar a un volumen final de 2.5 ml. Se agitó y se reposó en la obscuridad por 5 min. Se prepararon dos blancos de calibración, para el blanco de calibración se usó metanol acuoso (60:40) y todos los reactivos bajo las mismas condiciones. Para el blanco de calibración del factor de corrección se usó metanol acuoso y todos los reactivos bajo las mismas condiciones a excepción del AlCl₃ al 10%. La concentración final se expresó como mg equivalentes de catequina por 100 mg de garambullo liofilizado (mg EC/Kg GL). Se leyó cada muestra a una absorbancia de 510 nm en el espectrofotómetro.

6.1.4 Cuantificación de taninos condensados

Se cuantificaron los taninos condensados expresados como equivalentes de catequina, de acuerdo al ensayo de vainillina de Deshpande & Cheryan, (1985). El método se basa en la condensación de la vainillina con proantocianinas en soluciones acidas. La vainillina protonada es un radical electrofílico débil que reacciona con el anillo del flavonoide en la posición 6 u 8. El producto intermediario de esta reacción se deshidrata rápidamente para dar un producto coloreado de rosa o rojo cereza. La reacción se verifica entre la vainillina y los flavonoides como catequina.

Para la extracción se pesaron 200 mg de muestra seca y molida y se colocaron en un tubo falcón. Se adicionaron 10 ml de metanol y se agitaron en un vórtex a 8000 rpm durante 20 min; después se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min. Posteriormente se tomaron 1 ml del sobrenadante y se colocaron en un tubo de ensayo, se le adicionaron 5 ml de reactivo de vainillina (vainillina 1% en metanol y HCl 8% en metanol en proporción 1:1) recién preparado. En otro tubo se preparó el factor de corrección con 1 ml del extracto de la muestra y 5 ml de HCl 4%. Por otro lado, se prepararon dos blancos de calibración uno con 1 ml de metanol y 5 ml de reactivo de vainillina y otro tubo con 1 ml de metanol y 5 ml de HCl al 4%. Después, la reacción se llevó a cabo por 20 min a 30°C, se leyó cada muestra a una absorbancia de 500 nm en un espectrofotómetro (6405 UV/Vis, JENWAY).

6.1.5 Cuantificación de betalaínas

La extracción y purificación se realizó de acuerdo al método descrito por Butera et al. (2002) con ligeras modificaciones. Se pesaron 0.1 g de muestra liofilizada y se adicionaron 10 ml de metanol al 50%, se agitaron 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron por 10 minutos, se filtró y el residuo fue lavado con metanol puro varias veces hasta obtener extractos incoloros, los extractos fueron combinados y se midió la absorbancia a 476, 538 y 600 nm.

La concentración de betalaínas y betaxantinas fue obtenida mediante las ecuaciones desarrolladas por Nilsson, (1970).

$$A = 1.905 (A_{538} - A_{600})$$

$$Y = A_{476} - Z - (a/3.1)$$

$$Z = A_{538} - a$$

Betacianinas

$$\% \text{ Betanina} = (a/1120) * (FD) * 100$$

$$\% \text{ Vulgaxantina} = (Y/750) * FD * 100$$

FD* Factor de dilución

A= Absorbancia

6.1.6 Análisis de fitoquímicos por HPLC-DAD

El método que se empleó es el descrito por Ramamurthy et al. (1992). Se pesaron 100 mg de muestra, los cuales fueron colocados en un tubo Falcon al que se le adicionaron 10 ml de metanol al 30 % la muestra se agitó por 10 min en un vórtex, se sonicó 10 min y se agitó nuevamente 10 min en vórtex. Posteriormente se centrifugó 5 min a 5000 rpm. El sobrenadante fue recuperado y se tomó una alícuota la cual fue filtrada a través de una membrana de 0.45 μm , el filtrado fue colocado en un vial e inyectado inmediatamente al HPLC.

El análisis de HPLC de los compuestos fenólicos se efectuó con una separación en fase reversa utilizando la columna Zorbax (ODS)- C18 (5 μm tamaño de partícula, 15 cm x 4.6 mm i.d.). Se usó también una precolumna Zorbax ODS – C18. La fase móvil corrió a 1.5 ml/min y consistió en solvente A (ácido fórmico al 1 % en agua desionizada) y solvente B (ácido fórmico al 1 % en metanol), durante el análisis, el gradiente del solvente fue programado de 10 a 100% en B en A en 30 min el detector UV fue programado a 280 nm y el volumen de inyección fue de 20 μl . todos los solventes utilizados fueron filtrados a través de membranas de 0.45 μm .

La identificación de ácidos fenólicos fue realizada mediante comparación con el tiempo de retención y el espectro de absorción de estándares de ácidos fenólicos comerciales y su cuantificación se realizó con curvas de calibración de los mismos.

6.1.7 Identificación de compuestos por UPLC-QTOF-MSE

La preparación de la muestra para el análisis cromatográfico fue la siguiente: 1,5 ml de los sobrenadantes de las EP y las NEP se recolectaron y se colocaron en tubos

de microcentrífuga. El disolvente se evaporó utilizando el dispositivo SpeedVac (Thermo Scientific Mod. SAVANT SC2010A) durante 3 días, resuspendido en metanol (200 µl) y filtrado con una membrana de 0,22 µm (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2015).

El perfil fitoquímico se evaluó en un cromatógrafo líquido de ultra rendimiento (UPLC) junto con un detector de matriz de diodos (DAD), tiempo de vuelo cuadrupolo (Q-ToF), espectrómetro (MS) con ionización por electrospray (ESI) (Vion IMS, Waters Co). Las muestras fueron filtradas (0,45 mm) e inyectado directamente en una columna BEH Acquity C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 mm) a 35°C. Para la separación cromatográfica se utilizó agua con ácido fórmico (A) al 0,1% y acetonitrilo (B) como fase móvil a un caudal de 0,5 mL/min. Las condiciones de gradiente fueron 0% B/0 min, 15% B/2.5 mín., 21% B/10 min, 90% B/12 min, 95% B/13 min, 0% B/15 m y 0% B/17 min. Las absorbancias se midieron a 214, 280, 320 y 360, 484 y 535 nm. Para la cuantificación se utilizaron estándares: eriocitrina (flavanona), genisteína (isoflavona), quercetina (flavonol), ácido p-hidroxibenzoico (ácido hidroxibenzoico), ácido ferúlico (ácido hidroxicinámico), betanina (betalaína), beta-sitosterol (fitoesteroles) y alfa-tocoferol (tocoferoles). Los resultados se expresaron en ug/g de fruta liofilizada. Se utilizaron las siguientes condiciones para MS: voltaje capilar 2,0 kV; voltaje del cono, 40 eV; energía baja de colisión, 6 V; energía alta de colisión, 15-45 V; temperatura de la fuente, 120°C; caudal de gas cónico, 50 L/h; gas de desolvatación, N2 a 450°C y 800 L/h. Datos de adquisición; se realizó en modo de ionización negativa (ESI-) en un rango de masa de 100-1200 Da. Se utilizó una solución de leucina-encefalina (50 pg/mL) para la corrección de la masa de bloqueo a 10 mL/min. La identificación se realizó mediante el análisis de la masa exacta del ion pseudomolecular (error de masa <110 ppm), distribución isotópica y patrón de fragmentación.

Capacidad antioxidante

6.1.8 DPPH

El análisis DPPH se realizó conforme a lo reportado anteriormente, con algunas modificaciones para lector de microplaca (Bondet et al. 1997). Este método evalúa la habilidad de un potencial antioxidante para neutralizar el radical 1,1-diphenil-2-picrylhydrazyl (DPPH) el cual es un radical estable que tiene una coloración violeta intenso con máxima absorbancia a 517 nm y que se puede correlacionar con la disminución del color. Se pesaron 100 mg de fruto liofilizado y se diluyó en 10 ml de metanol al 80%, se agitó en vórtex a 8000 rpm por 20 minutos, y se sonicó por otros 20 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos y finalmente se filtraron. Se realizó un lavado con todos los pasos anteriores. En la placa de 96 pozos, se colocó el factor de corrección que fue de 20 µl de DPPH 200 µM más 180 µl de metanol en la primera fila, y en las siguientes 180 µl de cada extracto con el proceso ya descrito más 20 µl de DPPH 200 µM. La reacción se llevó a cabo durante 30 minutos en la oscuridad y se leyó la absorbancia a 515 nm. Los resultados se expresaron en umol equivalentes de trólox por gramo de muestra.

6.1.9 FRAP

El método FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) se basa en medir la potencia plasmática de reducir iones férricos de Fe^{+3} a ferroso Fe^{+2} utilizando como agente cromógeno un complejo colorimétrico de 2,4,6-tripiridil-s-triazina-ferroso (TPTZ), el cual da una coloración azul verdosa y se lee por espectrofotometría a 595 nm. Se pesaron 100 mg de muestra liofilizada en un tubo falcon, se agregaron 5 ml de agua destilada, se colocaron en baño maría a 60°C a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 20 ml de agua destilada y se agitaron en vórtex por 15 minutos, se centrifugaron a 8000 rpm por 5 minutos y finalmente se filtró. Se utilizó una placa de 96 pozos de fondo plano con un volumen total por pozo de 300 µl. Se colocaron 20 µl de la muestra o estándar (en caso de la curva de calibración) más 200 µl de reactivo FRAP, el cual fue preparado en el momento con la proporción

10:1:1 de Buffer de acetato: TPTZ : FeCl₃. La reacción se llevó a cabo durante 30 min, en la obscuridad, después de lo cual se midió la absorbancia. Los resultados se expresaron en umol equivalentes de trolox por gramo de extracto (Benzie & Strain 1996.)

6.1.10 TEAC

El ensayo TEAC implica la producción directa del cromóforo azul/verde ABTS·+ por la reacción entre ABTS y persulfato de potasio. La adición de antioxidantes al catión preformado en el medio de reacción convierte esta técnica en una estrategia de decoloración. El grado de decoloración se puede medir a diferentes longitudes de onda, como se ha comentado, siendo la habitual la absorbancia a $\lambda = 734$ nm e indica el porcentaje de inhibición del radical ABTS·+ como la capacidad de reducción del antioxidante. Este porcentaje de inhibición determina la actividad antioxidante como función de la concentración y del tiempo en comparación con la reactividad relativa del patrón estándar, trolox, bajo las mismas condiciones (Re 2002).

Para la extracción se pesaron 10 mg de muestra y se extrajo con 10 ml de solución de acetona-agua (50/50 v/v). Se agitó durante 10 min a 8000 rpm, posteriormente se centrifugaron por 5 min a 5000 rpm. Se filtró el sobrenadante con papel Whatman (0.20 μ m).

El radical ABTS se obtuvo disolviendo 0.0038 g de ABTS (7mM) en 1 ml de persulfato de potasio (0.0033 g de K₂S₂O 5 ml de agua destilada 2.45 mM). La solución se almacenó en refrigeración y se protegió de la luz 12 h antes de su uso. La solución concentrada de ABTS se diluyó con solución de 0.7 ± 0.2 a una longitud de onda de 734 nm. En un tubo eppendorf se colocó 0.99 ml de solución de ABTS diluida con la solución amortiguadora de fosfato salino y se adicionaron 0.01 ml de muestra al tubo, se agitó y transcurridos 6 min se midió nuevamente la absorbancia

(abs al t= 0 min). El blanco consistió en solvente de extracción de la muestra y para el caso de la curva de trolox se utilizó etanol.

Para cuantificar la capacidad antioxidante se realizó una curva de trolox (anexos). Se utilizó la absorbancia neta (AN) y se expresó como μmol equivalentes de trolox por gramo de muestra.

La absorbancia neta se calculó de la siguiente manera:

$$AN = (A_{t0} - A_{t6}) - (A_{t0 \text{ blanco}} - A_{t6 \text{ blanco}})$$

La solución ABTS sólo se utilizó entre las 12-16 h de su preparación. La solución amortiguadora de fosfato salino se mantuvo a temperatura ambiente ya que si se refrigeraba afecta considerablemente la estabilidad del radical.

6.1.11 ORAC

El método es capaz de medir la capacidad global que tienen todos los antioxidantes presentes en una muestra para neutralizar los radicales peroxilo (ROO). Éstos son generados a partir del azo-compuesto AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihidro-clorido) y reaccionan con la fluoresceína, oxidándola. La pérdida de la fluorescencia de la fluoresceína es el indicador de la extensión de la oxidación con el radical peroxil (Ou *et al.*, 2001).

Se preparó una solución amortiguadora de fosfatos (71 ml de fosfato de sodio monobásico 0.2 M y 304 ml de fosfato de sodio dibásico 0.2 M, se llevó a 900 ml con agua destilada y se ajustó pH a 7.4 cuidando no rebasar el volumen de 1 litro.), la cual se utilizó para preparar todos los reactivos y las diluciones necesarias. Ésta se almacenó en botella ámbar a 4°C. Se preparó una solución madre de fluoresceína 0.5315 mM (5 mg en 25 ml). De esta solución se preparó la solución de trabajo a 8.185×10^{-5} mM (7.7 μl de solución madre, aforado a 50 ml).

Se tomó 1.5 ml de solución de trabajo de fluoresceína y se colocó en una celda espectrofotométrica. En la misma celda se agregó 0.75 ml de muestra (diluida previamente en solución amortiguadora con el objetivo de que el poder antioxidante decaiga en un lapso de tiempo menor que el estándar de trolox de 40 μM y mayor que la de 10 μM) y se colocó a baño maría a 37°C por 5 minutos. Después de este tiempo se agregó 0.75 ml de solución de APPH (2,2´azobis (2-amidinopropano)-HCl; 0.415 g aforado a 10 ml), agitando con la misma pipeta. Inmediatamente se tomó la primera lectura en el fluorómetro ($\lambda_{\text{excitación}} = 493$ $\lambda_{\text{emisión}} = 515$) y se regresó al baño maría. Se continuó leyendo la celda cada minuto hasta que el valor de la intensidad correspondió un 10% del valor inicial. Para este método se realizó un blanco antes de analizar la muestra, donde ésta fue reemplazada por solución de fosfatos. Los valores se reportaron como $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra, mediante una curva estándar, usando el área neta bajo la curva (ANBC) de cuatro concentraciones de trolox.

Para el cálculo del valor ORAC se utilizaron las siguientes fórmulas

$$\text{ANBC} = (\text{ABC}_{\text{muestra}} - \text{ABC}_{\text{blanco}})$$

$$\text{ABC} = \text{área bajo la curva} = 0.5 + f_1 / f_0 + f_2 / f_0 + \dots + f_n / f_0$$

f_0 = Fluorescencia inicial leída al min 0

f_i = Fluorescencia leída al tiempo 1

Es importante señalar que la solución amortiguadora de fosfatos y la solución madre de fluoresceína sólo pueden almacenarse por dos meses. La solución patrón de fluoresceína debe prepararse al instante protegiéndola de la luz y sólo puede utilizarse el día que se prepara. Con la solución de APPH se deben tener los mismos cuidados que para la fluoresceína. Todas las soluciones deben mantenerse en cama de hielo al momento de hacer la determinación.

Fase experimental *in vivo*

El residuo de garambullo se obtuvo de acuerdo con lo reportado por Rodríguez et al. (2018). Primeramente, el polvo de garambullo liofilizado se mezcló con agua en una proporción 1:5 (agua/solvente) luego se agitó durante 20 min a 21°C. La muestra se filtró y posteriormente se secó en horno de convección a 60°C durante 24 h, finalmente se pulverizó.

Tanto el garambullo como su residuo se utilizaron para llevar a cabo la fase experimental *in vivo* como se describe a continuación:

Se utilizaron ratas macho Sprague-dawley con peso inicial de 69.6 ± 5 g de 4 semanas de edad. Las ratas se mantuvieron en un cuarto con temperatura ambiente de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclos de luz oscuridad 12/12 horas, con agua y alimento *ad libitum*. Una semana después de la aclimatación, las ratas se asignaron al azar a 6 grupos de tratamiento (n=12): (1) control negativo (C -), dieta basal, inyección subcutánea de solución salina; (2) grupo Azoximetano (AOM+DSS), dieta basal más una inyección subcutánea de AOM (10 mg/kg de peso corporal, disuelto en 1 ml de solución fisiológica) una vez a la semana por 2 semanas (semana 3 y 4) seguido de un ciclo de 7 días de dextrán sulfato de sodio (DSS) al 2% disuelto en su agua *ad libitum*; (3) grupo de garambullo (G) (5 g/ kg de peso corporal) diariamente y dieta basal; (4) residuo de garambullo (R) (5 g por Kg de peso corporal) diariamente y dieta basal, (5) G+AOM+DSS, G más AOM más DSS y dieta basal; (6) R+AOM+DSS y dieta basal. El G y el R se administraron por medio de una “galleta” que se elaboró con la dosis anteriormente indicada de garambullo liofilizado y con el pellet que consume la rata normalmente, esta galleta se les proporcionó, una vez por día durante el periodo experimental (16 semanas) y las dosis se seleccionó de acuerdo con la dosis previamente reportada por Reynoso *et al.*, (1999) como dosis inocua.

Desde la primera semana de tratamiento, se registró el consumo de agua y alimento semanalmente, así como la variación en el peso de las ratas. Al final del periodo

experimental se sacrificaron a los animales con CO₂ y se recolectaron las heces de cada uno de los grupos, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C para posteriormente determinar la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Asimismo, se realizaron análisis histológicos para determinar el desarrollo de fosas crípticas aberrantes (FCA) y se guardó el tejido colónico para los siguientes análisis moleculares planteados.

6.1.12 Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

La producción de AGCC en heces se determinó utilizando el método propuesto por García-Villalba et al. (2012). Se mezcló 1 g de heces en 10 mL de una solución de ácido fórmico al 9% y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min. Se recogió el sobrenadante y se añadieron 10 mL de acetato de etilo, se agitó durante 2 min y se centrifugó de nuevo. La fase orgánica se recogió y se transfirió a un vial de inyección. Se inyectó 1 microlitro de la muestra en el cromatógrafo a una temperatura del inyector de 250 °C. La temperatura inicial de la columna fue de 90°C, que aumentó a 150°C a 15°C/min, 170°C a 5°C/min y finalmente a 250°C a 20°C/min y se mantuvo a esta temperatura durante 2 min (tiempo total 14 min). El detector funcionó en modo de ionización por impacto de electrones (energía de electrones de 70 eV) y escaneó el rango de 30 a 250 m/z. La temperatura de la fuente de iones, el cuadrupolo y la interfaz fue de 30°C, 150°C y 280°C, respectivamente. Se utilizaron estándares para identificar los AGCC, teniendo en cuenta la retención de estos y el área bajo la curva.

6.1.13 Determinación de fosas crípticas aberrantes (FCA) en el colon.

El colon de los animales sacrificados se removió y las FCA fueron identificadas y cuantificadas por medio de las siguientes tinciones:

6.1.13.1 Azul de metileno

El colon de los animales se extirpó cortando longitudinalmente desde el ciego hasta el ano, lavando con agua salina. El otro 50% del tejido recolectado se colocó en un corcho elaborado con foami y se fijó en formaldehído al 10% hasta su tinción, manteniéndolos en refrigeración (4°C). Las muestras se tiñeron con azul de metileno al 0.5% durante 10 min, se enjuagaron con solución fisiológica para retirar el exceso de colorante y se observaron las FCA con un microscopio de luz invertida, las cuales se reportaron por cm² de colon distal (Bird, 1987). Así mismo, se realizó el análisis de la multiplicidad, identificado el número de criptas por foco y se clasificó en 1, 2, 3 y ≥ 4 .

6.1.13.2 Hematoxilina y eosina

El colon de los animales se extirpó cortando longitudinalmente desde el ciego hasta el ano, lavando con agua salina. El 50% del tejido recolectado se conservó en solución amortiguadora de fosfatos, se fijó con formaldehído al 4% y se parafinó. Luego del proceso de desparafinado, se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los tejidos se analizaron microscópicamente y la incidencia de FCA fue reportada (Wijnands *et al.*, 2001).

6.1.14 Análisis bioquímicos en sangre

Una vez sacrificados los animales, se extrajo sangre por medio de punción cardiaca, la cual se recuperó en tubos con gel separador para análisis de química sanguínea. Posteriormente, las muestras se centrifugaron (Hettich Zentrifugen eba 20; Andreas Hettich GmbH & Co. KG Germany) por 10 min a 112 RCF, se recuperó el suero y se analizó en el Spin 120 (Spinreact SAUCTRA Inc. Sta Coloma, 7 17176 St. Esteve Bas Girona Spain). Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Humana de la FCN-UAQ.

6.1.15 Longitud y peso de órganos

Al momento de la matanza se disectaron y pesaron distintos órganos; colon distal, hígado y bazo, los cuales se midieron colocándolos en una hoja milimétrica y se pesaron en una balanza granataria.

6.1.16 Determinación de β -glucoronidasa

Se determinó la actividad de la enzima β -glucoronidasa con el kit de ensayo de fluorimetría de actividad de β -Glucoronidasa (ab234625) el cual es sensible para detectar desde 1 μ U (1 pmol/min) de actividad enzimática. Brevemente, 10 mg de contenido colónico se homogenizaron en una cama de hielo, utilizando un politrón, en 100 μ l de solución buffer XLIII/ β -glucoronidasa. Posteriormente el lisado se centrifugó a 10,000 g por 5 min a 4°C, se colectó el sobrenadante y se añadió 2 μ l en una placa de 96 pozos, se ajustó el volumen de cada reacción a 90 μ l con el buffer XLIII/ β -glucoronidasa.

Para el control positivo se tomaron 5 μ l del control positivo reconstituido y se ajustó el volumen a 90 μ l con el buffer XLIII/ β -glucoronidasa. Para la mezcla de sustrato, se diluyó 10 veces la solución de sustrato madre con el buffer XLIII/ β -glucoronidasa, obteniendo así la solución de trabajo. Para iniciar las reacciones se añadió 10 μ l de la solución de trabajo a el control positivo y a las muestras. Posteriormente, se midió la fluorescencia (Ex/Em=330/450 nm, fluorescence microplate reader; Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher) inmediatamente después de la adición del sustrato, por 0-60 minutos a 37°C. La actividad de β -glucoronidasa se cuantificó mediante una curva estándar de 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0 nmol de 4-Metilumbeliferona (4-MU).

Para el análisis de datos se promediaron las lecturas de los duplicados de cada estándar, control y muestras, posteriormente, se sustrajo el promedio del blanco de

todas las lecturas de estándares, controles y muestras obteniendo la fluorescencia corregida. Se graficaron los valores de fluorescencia corregida de los estándares en función de la concentración final de 4-MU.

Se calculó la actividad de β -glucoronidasa: $\Delta\text{RFU} = \text{RFU}_2 - \text{RFU}_1$

Se aplicó la ΔRFU a la curva estándar de 4-MU ($y = 425.86x + 3.9953$ $R^2 = 0.9957$) para obtener la cantidad pmol de 4-MU generada durante el tiempo de reacción ($\Delta t = t_2 - t_1$)

Actividad β -glucoronidasa de cada muestra = $B / (\Delta t \times V) \times D = \text{pmol}/\text{min}/\text{ml} = \mu\text{U}/\text{mL}$

Donde:

B= cantidad de 4-MU en la muestra, calculada a partir de la curva estándar, en pmol

Δt = tiempo de reacción (min)

V= volumen de muestra añadido en los pozos (ml) en mi caso fue 2 μl

D= factor de dilución

7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se reportarán como la media \pm DE. Se realizará un análisis de varianza ANOVA ($\alpha = 0.05$), haciendo una comparación entre tratamientos por la prueba de Tukey para los resultados de la caracterización nutracéutica del garambullo y su residuo, y prueba Dunnett para el ensayo *in vivo*, empleando el programa estadístico SPSS V21 para Mac

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fenólica

Se cuantificaron los compuestos fenólicos totales (CFT), así como los flavonoides totales (FT), taninos condensados (TC) y betalaínas (betaninas y betaxantinas) (Tabla 1).

Tabla 1. Compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, taninos condensados y betalainas

	Garambullo liofilizado	Hidrólisis ácida			
		H ₂ SO ₄ 1M	H ₂ SO ₄ 4M	HCl 1M	HCl 4M
CFT ^a	958.7 ± 26 ^a	18048.2 ± 37 ^b	14477.1 ± 37 ^c	20701.8 ± 141 ^d	20081.9 ± 254 ^e
FT ^b	397.1 ± 13 ^a	8028.2 ± 226 ^b	4339.6 ± 85 ^c	14310.2 ± 260 ^d	13516.3 ± 241 ^e
TC ^b	120.9 ± 4 ^a	1632.6 ± 37 ^b	1030.1 ± 37 ^c	1143.0 ± 11 ^d	987.4 ± 30 ^c
Betaninas ^c	25.2 ± .9	ND	ND	ND	ND
Betaxantinas ^c	2.9 ± 0.1	ND	ND	ND	ND

^a mg Equivalentes de Ácido Gálico/100 g garambullo liofilizado

^b mg Equivalentes de Catequina/100 g garambullo liofilizado

^c mg/Kg (MF, Materia Fresca)

Diferentes letras muestran una diferencia significativa entre filas, por la prueba de Tukey (p <0.05).

ND: No determinado

8.1.1 Compuestos fenólicos totales

Los CFT fueron analizados en el garambullo liofilizado y en los extractos de hidrólisis ácida (los cuales fueron 4: H₂SO₄ 1 y 4M y HCl 1 y 4M) con el fin de determinar cuántos fenoles totales están contenidos no sólo en la fracción soluble sino en aquella fracción que por lo general se desecha (Tabla 1). Se obtuvo mayor cantidad de CFT en el extracto elaborado con hidrólisis ácida de HCl 1M con una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los otros extractos y el garambullo liofilizado. La cantidad obtenida en este extracto fue de 20701.8 ± 141 mg Eq AG/100 g de garambullo liofilizado (materia seca), lo cual es equivalente a 31,052.7 ± 176 mg Eq AG/kg de materia fresca tomando en cuenta que el porcentaje de humedad del fruto es del 85%. Este resultado refleja mayor cantidad a lo reportado previamente por Guzmán-Maldonado et al., (2010) y Herrera-Hernández et al., (2011) de 9120 ± 128 y 7403 ± 45 mg Eq AG/kg de materia fresca, respectivamente. Lo anterior puede deberse a que esos autores no analizaron los polifenoles no extraíbles, sólo evaluaron los solubles. La literatura actual reporta

que existen más polifenoles adheridos a la fibra que aquellos que se solubilizan al medio extractante (Saura-Calixto & Pérez-Jiménez, 2018).

8.1.2 Flavonoides totales

En cuanto a los flavonoides totales (FT) se encontró mayor cantidad en el extracto obtenido con hidrólisis ácida de HCl 1M, con una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los otros extractos y el garambullo liofilizado. La cantidad encontrada fue de 14310.2 ± 260 mg Eq Cat/100 g en garambullo liofilizado. No hay reportes previos de análisis de flavonoides totales por medio de esta técnica en garambullo. El resultado del presente estudio es menor a los flavonoides totales extraídos por hidrólisis ácida reportados por Esparza-Martínez et al. (2016b) en cáscara de mandarina (2694 mg Eq Rutina/ 100 g materia seca), esto se debe probablemente a las diferencias naturales entre tipos de fruta y a los estándares utilizados en la técnica (catequina vs rutina).

En el extracto de hidrólisis ácida con H_2SO_4 1M se obtuvo la mayor cantidad de taninos condensados (1632.6 ± 37 mg Eq Cat/100 g garambullo liofilizado). En cuanto al análisis de los taninos solubles se obtuvieron 120.9 ± 4 mg Eq Cat/100g de materia seca, equivalente a 1.8 g Eq Cat/ kg de materia fresca. Este resultado es ligeramente menor al reportado por Guzmán et al., (2010), que reporta 2.52 g Eq Cat/kg lo cual puede deberse a las diferencias en las condiciones climáticas, de cosecha y de manejo de la muestra.

8.1.3 Betalaínas

Las betalaínas son otro fitoquímico de relevancia en la composición del garambullo, en donde las betacianinas son las responsables de la coloración púrpura y las betaxantinas de la coloración amarilla del mismo (Carle & Schweiggert 2016). Los resultados encontrados en el presente estudio muestran un contenido de 25.2 ± 0.9

mg/kg de betaninas y 2.9 ± 0.1 mg/kg de betaxantinas en materia fresca de garambullo, que concuerda con lo reportado por Guzmán et al., (2010) (29.5 ± 1.9 y 2.89 ± 0.1 mg/Kg respectivamente). Cabe señalar que el contenido de betalainas en los extractos obtenidos por los dos tipos de hidrólisis no ha sido analizado aún.

8.1.4 Fibra

La cantidad de fibra dietética en el presente estudio fue de 29.8 ± 1.2 g/100 g de fruto fresco lo cual es menor a lo reportado por Guzmán et al., (2010) de 34.9 ± 1.61 g/100 g de fruto. La cantidad de fibra en el garambullo es mayor a la reportada en la pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) con 15.9 g/ 100 g de fruto y similar a la cantidad reportada en la tuna (*Opuntia ficus-indica*) con 32 – 36 g/100 g de fruto dependiendo la variedad (Moreira et al., 2020; Salehi et al., 2019).

Los resultados encontrados nos muestran que los extractos realizados con hidrólisis ácida tienen mayor cantidad de fitoquímicos que en el garambullo completo. Existen escasos reportes del análisis de polifenoles no extraíbles en frutos, y ninguno en garambullo. El presente estudio demuestra que estos polifenoles no extraíbles son más abundantes que los de la fracción soluble. Lo que nos sugiere que estos fitoquímicos, los cuales en su mayor proporción están adheridos a la fibra dentro de la matriz del fruto, pudieran llegar al colon, en donde producirían una protección y promoverán una favorable salud intestinal.

Capacidad antioxidante

8.1.5 DPPH

Con respecto a la capacidad antioxidante por el método DPPH, se analizó el garambullo liofilizado, y tres extractos con hidrólisis ácida (H_2SO_4 1M, H_2SO_4 4M y HCl 4M). El método se basa en la medición espectrofotométrica del cambio de

concentración de DPPH resultante de la reacción con un antioxidante (Brand & Berset 1995). El ensayo DPPH es uno de los métodos más populares y empleados con frecuencia para evaluar la capacidad de los compuestos para actuar como captadores de radicales libres o donantes de hidrógeno, y con ello la capacidad antioxidante de los alimentos. En el presente estudio, el extracto realizado por hidrólisis ácida con H_2SO_4 4M fue el que obtuvo mayor cantidad de $\mu\text{mol Eq/trolox}$ por gramo, sin mostrar una diferencia significativa con las otras hidrólisis, pero sí con el garambullo liofilizado (Tabla 2). El resultado del valor DPPH en nuestro estudio en el garambullo liofilizado fue de $40 \mu\text{mol Eq}$ de trolox/g lo cual demuestra una mayor capacidad antioxidante por el mecanismo de donador de hidrógeno que otros frutos similares como las moras, la granada y las fresas (30 , 31 y $23 \mu\text{mol Eq}$ de trolox/g respectivamente) (Rodrigues et al. 2019).

8.1.6 FRAP

En cuanto al método FRAP, se sabe que mide la capacidad de una muestra, en este caso del garambullo, para reducir los iones férricos y con ello demostrar su capacidad de quelación de metales. Los resultados del presente estudio muestran que el garambullo tiene capacidad de quelación de hierro, donde el extracto de hidrólisis ácida con HCl 1M obtuvo la mayor cantidad; $1199 \pm 38 \mu\text{mol Eq}$ de trolox/g con una diferencia significativa a los extractos con H_2SO_4 4M, H_2SO_4 1M, garambullo liofilizado, pero no significativa con el de HCl 4M (Tabla 2). El valor FRAP para el garambullo liofilizado fue de $105.7 \pm 3.3 \mu\text{mol Eq}$ de trolox/g (Tabla 2) lo cual muestra mayor capacidad antioxidante que otros frutos como lo es la fresa y la cereza (329 y $458 \mu\text{mol Eq}$ de trolox/g respectivamente) según lo reportado por Guo et al. (2003).

8.1.7 TEAC

El ensayo TEAC, es uno de los ensayos ampliamente utilizados en el estudio de los antioxidantes solubles en agua y lípidos. A pesar del inconveniente existente en el tiempo de medición (6 minutos) el cual no permite llegar al punto finalización de la reacción, es posible conocer la capacidad de transferencia de electrones de la muestra y con esto su capacidad antioxidante (Litescu et al. 2016). En el presente estudio, el extracto de la hidrólisis con HCl 1 M obtuvo la mayor cantidad con $1560 \pm 66 \mu\text{mol Eq de trolox/g}$ (Tabla 2) con una diferencia significativa con el resto de los extractos y el garambullo liofilizado. El valor TEAC para el garambullo liofilizado fue de $100.8 \pm 3.6 \mu\text{mol Eq de trolox/g}$ (Tabla 2), valor que está por encima de los valores reportados para frutos como las moras, granada y fresa (47, 43.5 y 34.9 $\mu\text{mol Eq de trolox/g}$ respectivamente) (Rodrigues et al. 2019).

8.1.8 ORAC

El ensayo ORAC mide la capacidad de reacción en cadena del radical por parte de los antioxidantes a través del monitoreo de la inhibición de la oxidación del radical peroxilo, el cual se caracteriza por ser un radical libre que predomina en la oxidación de lípidos, en sistemas biológicos bajo condiciones fisiológicas, por esto, los valores ORAC son apreciados como biológicamente relevantes (Munteanu et al. 2021). El nivel de ORAC del extracto de garambullo liofilizado fue de $140 \pm 5.5 \mu\text{mol Eq de trolox/g}$ el cual es similar a lo reportado previamente para el garambullo por Herrera et al. (2011) de $113.2 \mu\text{mol Eq de trolox/g}$. Valores similares se muestran para el arándano con $101.7 \mu\text{mol Eq de trolox/g}$ y valores más bajos se reportan para frutos como las uvas rojas, mandarina y melón 26.05 , 37.1 ± 1.2 and $16.4 \pm 0.9 \mu\text{mol Eq de Trolox/g}$ respectivamente (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto 2015; Lin et al. 2020). Similar al resultado de DPPH, FRAP y TEAC, los niveles de ORAC en los fenoles ligados (NEPP) fueron mucho más altos al compararse con los solubles. El valor más alto de los NEPP fue la hidrólisis ácida de 1 M HCl con $1620,8 \pm 63 \mu\text{mol Eq}$

de trolox/g, este resultado es más alto que el reportado para el arándano con un valor de ORAC de NEPP de 1258.53 $\mu\text{mol Eq}$ de trolox/g (Han et al. 2019)

Tabla 2. Capacidad antioxidante

	Garambullo liofilizado	Hidrólisis ácida			
		H ₂ SO ₄ 1M	H ₂ SO ₄ 4M	HCl 1M	HCl 4M
DPPH	40.0 \pm 1.5 ^a	376.6 \pm 9 ^b	394.2 \pm 12.2 ^b	452 \pm 13 ^c	357.2 \pm 10.6 ^b
FRAP	105.7 \pm 3.3 ^a	614.7 \pm 20 ^b	841.4 \pm 30 ^c	1199 \pm 38 ^d	1159 \pm 22 ^d
TEAC	100.8 \pm 3.6 ^a	1445.8 \pm 34 ^b	1037.9 \pm 44 ^c	1560 \pm 66 ^d	525.9 \pm 66 ^e
ORAC	140.5 \pm 5.5 ^a	509.3 \pm 22 ^b	302.7 \pm 11 ^c	1620.8 \pm 63 ^d	1464 \pm 56 ^e

Los resultados son expresados en μmol equivalentes de trolox por g de garambullo liofilizado. Diferentes letras muestran una diferencia significativa (ANOVA, prueba de Tukey *post hoc*, $p < 0.05$) entre extractos y GL en la misma técnica de análisis. ND= No determinado. ND= No determinado

Análisis de fenoles por HPLC-DAD y UPLC Q-ToF

El análisis por HPLC-DAD en el garambullo liofilizado arrojó como resultado la identificación y cuantificación de los siguientes compuestos fenólicos: ácido caféico, ácido clorogénico, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido hidroxifenilacético, ácido hidroxibenzóico, catequina, epigalocatequingalato, epicatequina y quercetina (Tabla 3). El ácido gálico, ácido clorogénico y el epigalocatequingalato fueron los compuestos mayoritarios con 2208, 1138 y 937 $\mu\text{g/g}$ respectivamente (Tabla 3). Estos resultados coinciden con los reportados por Guzmán-Maldonado et al. (2010) y Herrera-Hernández et al. (2011) donde identifican al ácido caféico, ácido elágico, ácido gálico, ácido protocatecólico, epigalocatequingalato, epicatequina, vanillina y quercetina en garambullo liofilizado. Es por esto que, hasta donde se sabe, el presente trabajo identifica por primera vez en este fruto al ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido hidroxifenilacético y al ácido hidroxibenzóico, esto en cuanto al análisis por HPLC-DAD.

Tabla 3. Análisis de fenoles por HPLC-DAD

Compuesto identificado	Concentración ($\mu\text{g/g}$)
Ácido caféico	790.4 ± 78
Catequina	121.3 ± 11
Ácido clorogénico	1132.0 ± 23
Ácido elágico	515.4 ± 56
EGCG	1018.0 ± 82
EC	203.9 ± 34
Ácido ferúlico	12.9 ± 1
Ácido gálico	2278.0 ± 61
Ácido hidroxifenilacético	159.7 ± 5
Ácido hidroxibenzóico	188.8 ± 41
Quercetina	122.2 ± 34

Los resultados son expresados en $\mu\text{g/g}$ de garambullo liofilizado

Los resultados se expresan como el promedio de $n= 3$ determinaciones \pm DE.

Tabla 4. Análisis de compuestos en extracto metanólico de garambullo e hidrólisis ácidas por UPLC Q-ToF

Familia*	Compuesto	EtOH 30%	HCl 1M	HCl 4M
Betaninas	Betanina*	9.58 ± 0.26	ND	ND
	Indicaxantina	7.82 ± 0.43	ND	ND
	Betanidina	0.33 ± 0.03	ND	ND
	Isobetanina	0.35 ± 0.02	ND	ND
Flavanonas	Eriodictiol	ND	0.07 ± 0.01	0.02 ± 0.00
	Quercetina ramnosil-ramnosil-hexosido	22.73 ± 0.67	0.06 ± 0.04	ND
	Kaempferol ramnosil-hexosido-ramnosido	1.07 ± 0.07	ND	ND
	Rutina*	3.87 ± 0.17	0.18 ± 0.00	ND
	Kaempferol hexosido-ramnosido-hexosido	0.62 ± 0.02	ND	ND
	Quercetina*	0.24 ± 0.01	1.48 ± 0.00	0.70 ± 0.06
	Kaempferol*	0.01 ± 0.00	ND	ND
	Iso-ramnetina	ND	1.29 ± 0.00	0.40 ± 0.03
Ácidos hidroxibenzóicos	Ácido Gálico*	ND	0.06 ± 0.05	0.05 ± 0.00
	Ácido hidroxibenzóico hexósido	1.56 ± 0.08	ND	ND
	Ácido hidroxibenzóico*	0.33 ± 0.01	ND	ND
	Ácido vanílico*	0.20 ± 0.29	0.27 ± 0.20	0.59 ± 0.06
Ácidos hidroxicinámicos	Ácido caféico hexósido	0.22 ± 0.01	0.01 ± 0.00	ND
	Ácido caféico*	0.16 ± 0.00	ND	ND
	Ácido ferúlico hexósido	0.66 ± 0.03	ND	ND
	Ácido cumárico*	0.03 ± 0.00	ND	ND
	Ácido ferúlico*	0.05 ± 0.00	ND	ND
	Ácido cinámico*	0.01 ± 0.00	ND	ND

Los resultados muestran el promedio de 2 repeticiones (n=2) por duplicado ± DE

*Identificación por medio de estándares comerciales

ND: No detectado

La tabla 4 muestra los compuestos identificados en el garambullo, ya sea en el extracto metanólico o en las hidrólisis ácidas elaboradas a partir de el mismo. Hasta donde es de nuestro conocimiento, se identifican por primera vez los siguientes compuestos: betanidina, eriodictiol, quercetina ramnosil-ramnosil-hexosido, kaempferol ramnosil-hexosido-ramnosido, kaempferol, ácido hidroxibenzóico, ácido

caféico hexósido, ácido ferúlico hoxósido, ácido cumárico y ácido cinámico. Como se puede observar, los compuestos mayoritarios son las betanidinas y la quercetina. Estos compuestos, han sido reportados en otros frutos, con efectos quimiopreventivos, tal es el caso de Serra et al. (2013) que sugiere a la tuna (*Opuntia ficus-indica*), con betaninas y betacianinas como compuestos mayoritarios, con un efecto antiproliferativo, en células HT-29, así como inducción del ciclo celular en las fases: G1, G2/M y S. Asimismo, Warren et al. (2009) reporta a la quercetina con un efecto antiproliferativo, al disminuir en un 41% las FCA con alta multiplicidad en ratas inducidas con AOM y alimentadas con este compuesto, aumentando también la apoptosis (8 veces más) al comparar el grupo quercetina+ AOM vs quercetina + solución salina.

RESULTADOS DE ESTUDIO *IN VIVO*

8.1.9 Evaluación *in vivo* del efecto del garambullo y su residuo, sobre el desarrollo de FCA inducidas con AOM

8.1.9.1 Efecto del garambullo y su residuo administrados oralmente a través de una galleta, sobre el consumo de alimento, agua, así como en la ganancia de peso.

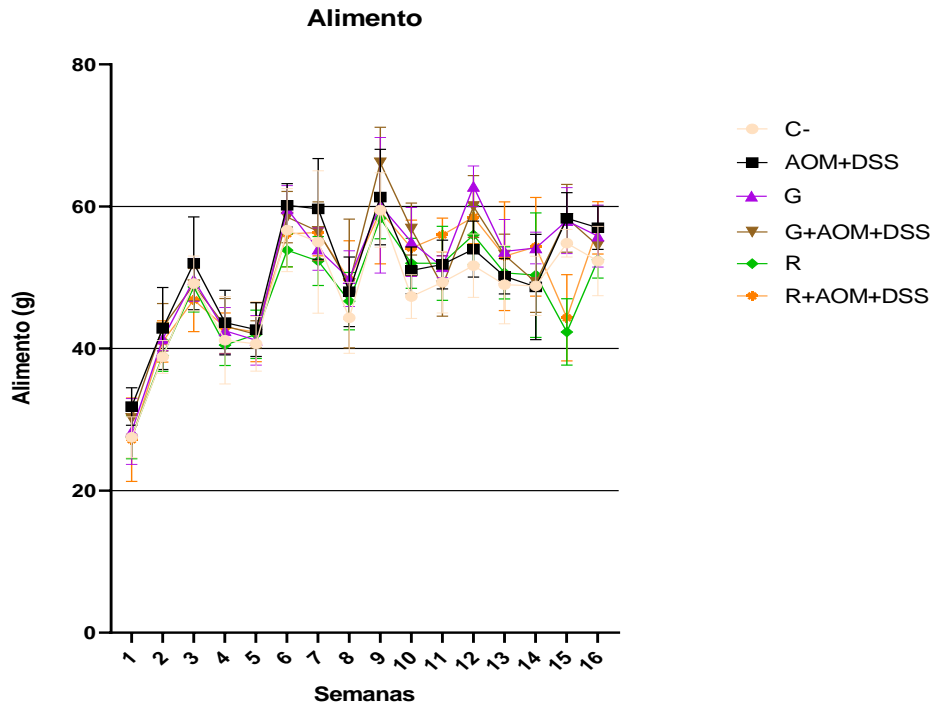


Figura 8. Consumo de alimento en grupos alimentados con garambullo, residuo de garambullo y administrados con azoximetano.
 C-: Control negativo, AOM: azoximetano, DSS: dextrano sulfato de sodio, G: garambullo, R: residuo. Los resultados se muestran como el promedio (n=12) ± DE
 *Diferencia significativa, prueba Dunnett ($\alpha= 0.05$)

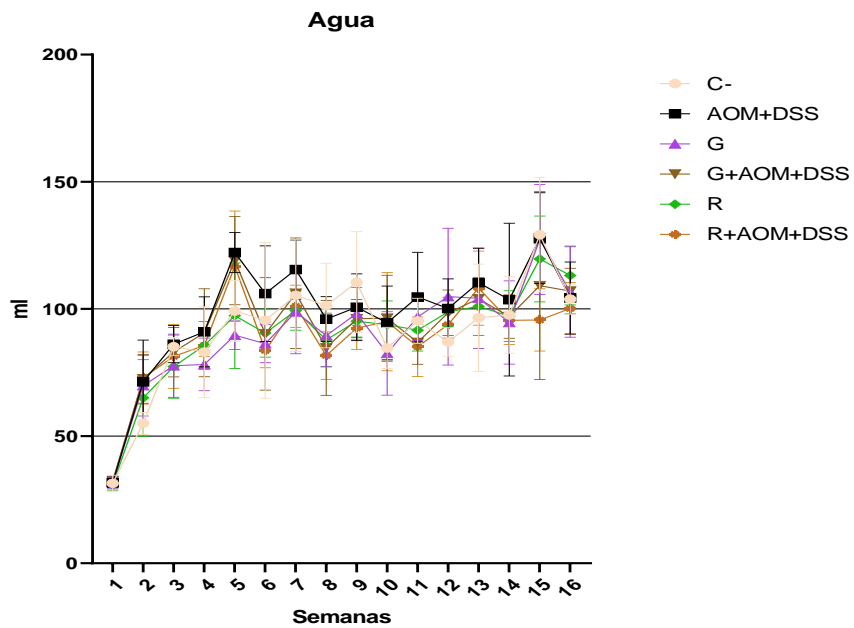


Figura 9. Consumo de agua en grupos alimentados con garambullo, residuo de garambullo y administrados con azoximetano.
 C-: Control negativo, AOM: azoximetano, DSS: dextrano sulfato de sodio, G: garambullo, R: residuo. Los resultados se muestran como el promedio (n=12) ± DE *Diferencia significativa, prueba Dunnet ($\alpha= 0.05$)

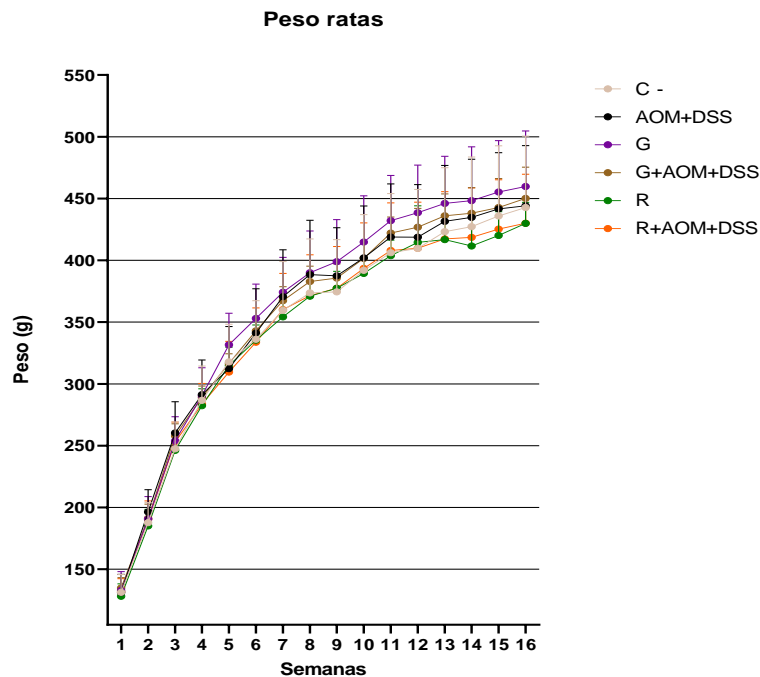


Figura 10. Ganancia de peso en grupos experimentales.
 C-: Control negativo, AOM: azoximetano, DSS: dextrano sulfato de sodio, G: garambullo, R: residuo. Los resultados se muestran como el promedio (n=12) ± DE *Diferencia significativa, prueba Dunnet ($\alpha= 0.05$)

Semanalmente se registró el consumo de agua y alimento presentados en las Figuras 8 y 9. La ingesta tanto de agua como el consumo de alimento fueron similares en los 6 grupos, sin presentar diferencia estadísticamente significativa al comparar los datos entre grupos semanalmente. Sin embargo, podemos observar que de la semana 4 a la 5 y de la 6 a la 7 hay una tendencia a incrementar el consumo de agua y a disminuir el consumo de alimento en los grupos AOM, G+AOM y R+AOM. Lo anterior sugiere que es debido al estrés producido por la inyección de AOM y el consumo de la sal DSS al 2% por 7 días, regularizándose en las semanas posteriores. Todos estos datos sugieren que los tratamientos en general fueron bien tolerados por las ratas.

El incremento de peso a lo largo del experimento se muestra en la Figura 10. El aumento de peso fue conforme a lo esperado y reportado para roedores de la misma cepa y sexo (Cossio-Bolaños et al. 2013). Sin embargo, se puede decir que existe una tendencia a menor ganancia de peso en el grupo del residuo y residuo + AOM, esto probablemente por una mayor saciedad, propiciada por la ingesta de fibra a través de la galleta de residuo de garambullo. En las últimas dos semanas se puede apreciar una meseta en cuanto a la ganancia de peso, normal según las guías de seguimiento de la cepa Sprague-Dawley (Sprague-Dawley® growth chart, 2015). También se observó que posterior a la primera y segunda dosis de AOM en la semana 3 y 4 las ratas disminuyeron su ingesta de alimento, sin embargo, se normalizó a la semana siguiente.

Las ratas mostraron un comportamiento esperado, teniendo mayor interés por consumir la galleta de garambullo que su alimento de costumbre. No se han observado signos que sugieran necrosis, diarrea, vómito, pérdida significativa de peso.

8.1.10 Análisis bioquímicos de sangre

Hasta ahora, es de nuestro conocimiento que el único estudio que reporta experimentos *in vivo* del consumo de garambullo es el publicado por Reynoso et al. (1999), donde sugiere la dosis inocua máxima de 5g/kg en ratas Wistar; sin embargo, no incluye análisis bioquímicos sanguíneos, es por esto, que en el presente estudio se realizaron con el propósito de determinar si el consumo de garambullo o su residuo causaban alguna alteración en la química sanguínea. Además, debido a que el AOM es metabolizado por el hígado, algunos marcadores bioquímicos como lo son las enzimas hepáticas podrían alterarse, como señal de daño hepático, sumado a que se han reportado alteraciones en el metabolismo de la glucosa, dentro de la transición de la etapa de iniciación a progresión del cáncer de colon (Venkatachalam et al. 2020).

Otro aspecto para considerar en el análisis bioquímico de la sangre de ratas inducidas con AOM, es que, en el cáncer de colon humano, un marcador importante para el pronóstico basado en la inflamación es la relación entre la proteína C reactiva y la albúmina (Ishizuka et al. 2015).

Tabla 5. Efecto del garambullo y su residuo en la química sanguínea de ratas Sprague Dawley inducidas con AOM+DSS

	C-	AOM+DSS	G	G + AOM+DSS	R	R+ AOM+DSS
ACURIC (mg/dl)	5.9 ± 1.3	8.8 ± 0.84	5.7 ± 0.9	7.2 ± 0.9*	6.4 ± 1	7.5 ± 0.9*
ALB (g/dl)	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.6 ± 0.2	3.4 ± 0.2
COL (mg/dl)	72.6 ± 7.9	98.5 ± 9.7	81.6 ± 8.2	94.7 ± 7.9	76.5 ± 8	92 ± 5.5
HDLc (mg/dl)	46.6 ± 4	36.5 ± 3.4	57.7 ± 7.1	52.5 ± 5.2	44.1 ± 4.6	52.4 ± 5.5
CREAT (mg/dl)	0.7 ± .07	0.6 ± 0.09	0.6 ± 0.05	0.6 ± 0.07	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.09
GLU (mg/dl)	353.6 ± 4.5	330.9 ± 30	340.2 ± 17	350 ± 15	349 ± 3.6	342 ± 26
TGO (mg/dl)	214 ± 20.4	186.3 ± 8.7	164.9 ± 21 ⁺	169.5 ± 17	186 ± 13	181 ± 18
TGP (mg/dl)	213 ± 19.4	188.3 ± 17	167.1 ± 14 ⁺	144.9 ± 15*	168 ± 22	178.3 ± 20
PT (g/dl)	7.0 ± 0.24	6.8 ± 0.4	6.9 ± 0.3	6.8 ± 0.4	7.0 ± 0.2	6.6 ± 0.5
TRIG (mg/dl)	120.8 ± 12	116 ± 16	162.7 ± 28 ⁺	162 ± 25*	153 ± 14 ⁺	184.5 ± 19*
UREA (mg/dl)	42.9 ± 4.1	44.3 ± 4.5	45.8 ± 3.1	41.3 ± 2.3	43.1 ± 3.5	43.3 ± 5.1
BUN	19.5 ± 1.7	20.4 ± 1.7	21.6 ± 1.4	19.6 ± 1.8	20.1 ± 1.4	19.7 ± 1.6
GLOB (mg/dl)	3.4 ± 0.51	3.3 ± 0.5	3.4 ± 0.5	3.3 ± 0.4	3.3 ± 0.5	3.3 ± 0.5
AG	1.0 ± 0	1.2 ± 0.6	1.0 ± 0	1.0 ± 0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
LDL (mg/dl)	15.6 ± 2.8	13.5 ± 1.4	13.8 ± 2	13.8 ± 2.4	13 ± 3.3	16.6 ± 3.4
VLDL (mg/dl)	23.1 ± 5.2	27.9 ± 3.9	33.3 ± 3.7	29.3 ± 4.4	28.3 ± 3.2	32.6 ± 4.2
FACL (U/L)	294.2 ± 19	312 ± 34	239.4 ± 24 ⁺	226.1 ± 22*	219 ± 31 ⁺	222 ± 25*
BILIST (mg/dl)	0.3 ± 0.08	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.03
BILISD (mg/dl)	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.05	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.0	0.0 ± 0.02	0.0 ± 0.01

Resultados muestran el promedio de 12 repeticiones n=12. * muestra una diferencia significativa en comparación con grupo AOM+DSS (ANOVA, prueba de Tukey *pos hoc*, p <0.05) + muestra una diferencia significativa en comparación con grupo C- (ANOVA, prueba de Tukey *pos hoc*, p <0.05)

En la mayoría de los análisis bioquímicos no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos bajo algunas excepciones. El ácido úrico es un potente antioxidante en plasma, una de sus funciones es proteger el ADN de daño oxidativo y de mediar la reparación de cualquier área nuclear que es expuesta a oxidación, una vez que entra al ambiente intracelular, se comporta como un poderoso pro-oxidante (Roumeliotis et al. 2019). En el presente estudio se muestra un incremento en el grupo AOM+DSS al compararse con el control, lo cual pudiera explicarse por lo mencionado anteriormente, ya que el AOM funciona como un pro-oxidante del ADN. Asimismo, se puede observar una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con tratamiento de garambullo y su residuo vs grupo AOM, disminuyendo los niveles de ácido úrico. Esto es similar a los resultados reportados por Ayman et al. (2014) donde en ratones, el ácido úrico incrementó significativamente tras la administración de 10 mg/kg de AOM, así mismo, el tratamiento con extractos de *P. pavonina* (alga que contiene polifenoles) disminuyó los niveles de ácido úrico al compararse con el control (AOM), esto, debido probablemente a la disminución del estrés oxidativo y aumento del sistema de defensa antioxidante. Resultados similares son reportados en estudios donde el tratamiento con extractos de frutos como la manzana, se reduce significativamente el ácido úrico circulante, esto en estudios *in vivo* (Cicero et al. 2017).

En cuanto a marcadores de hepatotoxicidad, tanto la albúmina como las enzimas hepáticas TGO y TGP no aumentaron en el grupo AOM/DSS al compararse con el control. Asimismo, aunque no hay una diferencia significativa, se muestra una tendencia por parte de los grupos tratados; G+AOM+DSS y R+AOM+DSS a disminuir niveles de TGO y TGP vs el grupo AOM+DSS. Los resultados aquí mostrados difieren a lo reportado por Mostafa et al. (2016) donde la albúmina disminuye marcadamente en el grupo AOM (control 3.2 ± 0.9 a 0.92 ± 0.04), y aumenta significativamente (aproximadamente al doble) los niveles de TGO Y TGP, esta diferencia de resultados, probablemente por la diferencia de dosis en el AOM, ya que en el estudio mencionado fue de 15 mg/kg.

La fosfatasa alcalina fue mayor en el grupo control al comparar con los grupos G y R. Lo anterior sugiere que el garambullo tiene efecto antiinflamatorio (Cortés et al. 2014). En cuanto a los triglicéridos, los grupos G y R resultaron con mayor concentración estadísticamente significativa al comparar con el grupo C-, así como los grupos G+AOM+DSS y R+AOM+DSS al comparar con el grupo AOM+DSS. Se sabe que, naturalmente, las frutas contienen azúcares, estructuras básicas de los carbohidratos como lo son glucosa y fructuosa. Estudios han demostrado que el incremento en el consumo de fructuosa se asocia al incremento sérico de triglicéridos (Keskin & Yoldas-Ilktac, 2022). Hasta donde es de nuestro conocimiento, no existen estudios científicos que reporten del contenido de fructuosa del garambullo, sin embargo, se infiere que la contiene y probablemente debido a esto, los grupos que consumieron garambullo, aumentaron su consumo de fructuosa al compararse con los grupos que sólo consumieron su dieta peletelizada normal, presentando un aumento en los triglicéridos, lo cual, es similar a lo reportado por Di Majo et al. (2024) donde se muestra un aumento significativo de triglicéridos en ratas Wistar suplementadas por 8 semanas con tuna (*Opuntia Ficus Indica*) al compararse con el grupo control. El resto de los parámetros no presentan diferencias. Estos resultados sugieren que no hay daño hepático, por lo que se puede decir que el garambullo y su residuo no modifican la química sanguínea de manera negativa y, por lo tanto, fue inocua su ingesta por parte de las ratas.

8.1.11 Evaluación *in vivo* del efecto del garambullo y su residuo, sobre la longitud y peso de colon e hígado

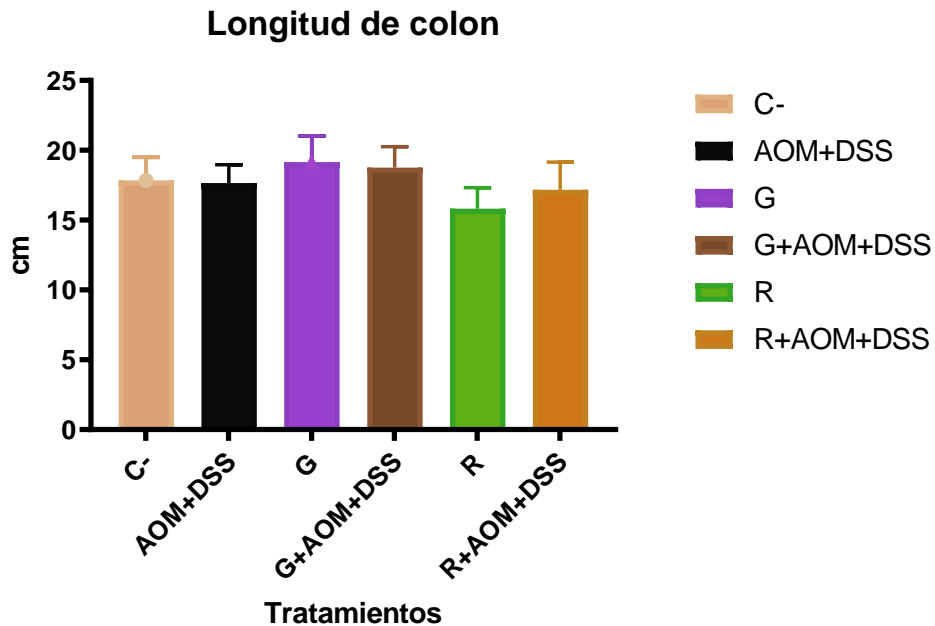


Figura 11. Longitud de colon de 72 ratas expuestas a los diferentes tratamientos. Los resultados se muestran como el promedio \pm DE (n=12).

La longitud de colon de los diferentes grupos no presentó diferencia estadísticamente significativa. Se ha reportado que el acortamiento del colon es herramienta visual macroscópica que refleja inflamación colorrectal severa y ha sido reportado para matrices alimenticias (Oficjalska et al. 2015; Chen et al. 2016). Es por esto, que podemos sugerir que los tratamientos no generan daños visibles en el colon en el periodo de 16 semanas de duración del experimento. Estos resultados son los esperados ya que el diseño del experimento contempla un estadio temprano de cáncer, es decir llegar a la parte de iniciación del cáncer, las FCA.

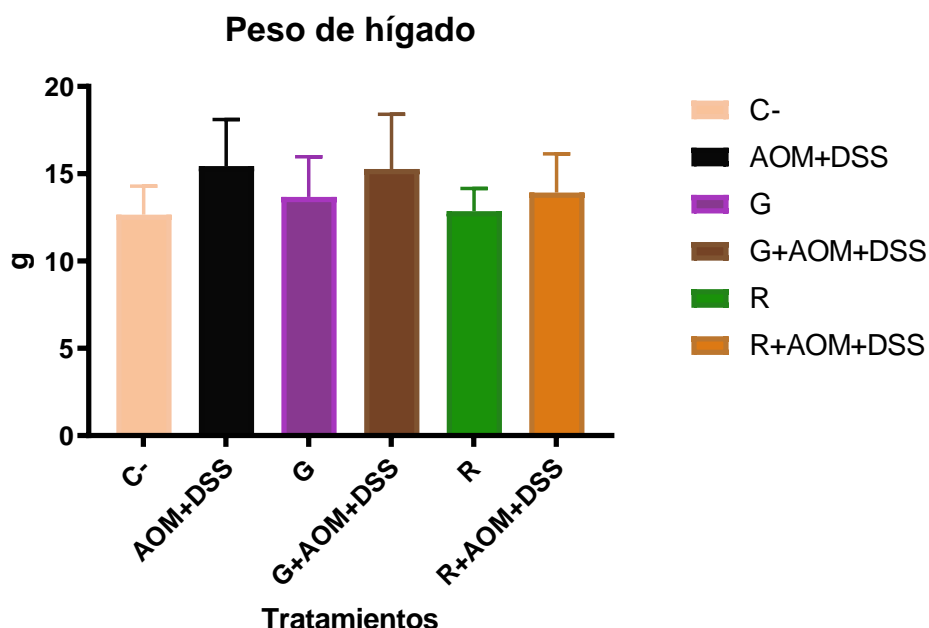


Figura 12. Peso de hígado de 72 ratas expuestas a los diferentes tratamientos. Los resultados se muestran como el promedio \pm DE (n=12).

El peso del hígado no muestra diferencias estadísticamente significativas entre grupos, lo que sugiere que tanto el garambullo como su residuo en la dosis administrada (5g/kg) no son hepatotóxicos. Por un lado, los grupos con AOM (AOM+DSS, G+AOM+DSS, R+AOM+DSS) presentan una tendencia al aumento del peso del hígado, lo que indica ligero daño hepático (De Robertis et al. 2011). El AOM es metabolizado en el hígado una vez inyectado, en donde las enzimas de fase I lo convierten en metilazoximetanol, mismo que es conjugado por enzimas de fase II con ácido glucurónico, con el que es enviado a través de la bilis al colon para ser eliminado por las heces (Venkatachalam et al. 2020). Por lo tanto, no es sorprendente que los 3 grupos administrados con AOM presenten cierto grado de inflamación. Sin embargo, ambos grupos tratados, tanto con G como con el R, aún con presencia de AOM y DSS, presentan menor peso del hígado que el grupo AOM+DSS. Por otro lado, los grupos G y R presentan un peso similar al control negativo, por lo que se sugiere que su consumo diario-crónico no representa un riesgo de daño hepático.

8.1.12 Identificación de FCA

8.1.12.1 Tinción azul de metileno

El experimento *in vivo* tuvo una duración de 16 semanas (1 semana de adaptación), al finalizar, los animales fueron sacrificados y el colon fue removido y teñido con azul de metileno para la identificación de FCA. En la Figura 6 se pueden observar fotografías de cada grupo, donde las FCA son evidentes en el grupo AOM, las cuales presentan las características descritas en la literatura como lo es el aumento del tamaño pericriptal, criptas ovaladas, epitelio engrosado, teñido más oscuro que las criptas normales, presentan más de un foco por cripta y sobresalen del plano focal (Wargovich et al. 2010; Almet et al. 2019).

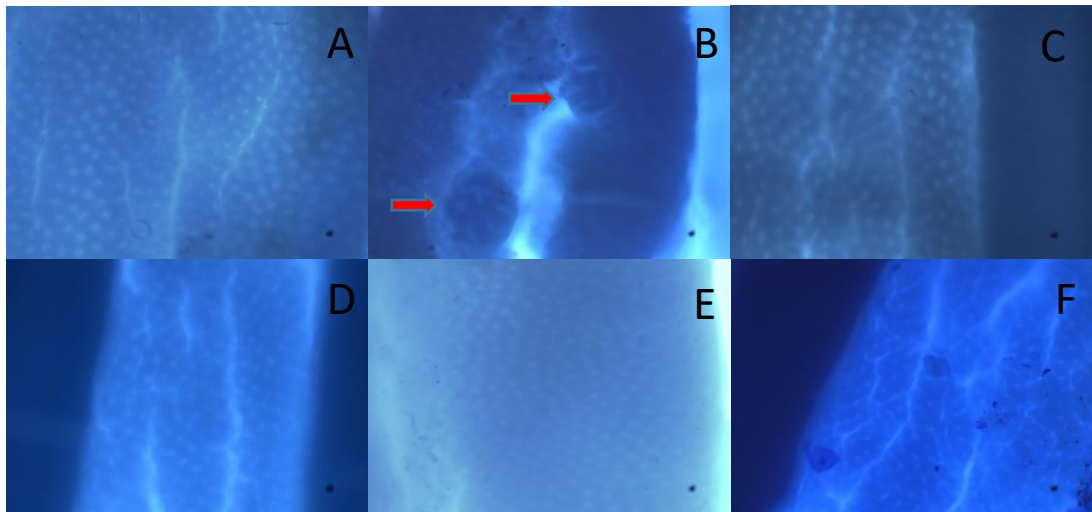


Figura 13. Fosas crípticas normales y aberrantes del colon distal con tinción azul de metileno. A: control, B: AOM+DSS, C: G, D: G+AOM+DSS E: R F: R+AOM+DSS

Tabla 6. Efecto del garambullo y su residuo en la formación de FCA en 72 ratas macho Sprague Dawley inducidas con AOM

GRUPO	FCA	Multiplicidad			
		1	2	3	4+
C	2.1 ± 1.2 ^a	1.83 ± 0.8 ^a	0.58 ± 0.52 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
AOM+DSS	9.7 ± 1.5 ^b	1.27 ± 1 ^a	1.54 ± 1 ^a	1.92 ± 1.2 ^b	2.81 ± 1 ^b
G	1.08 ± 0.7 ^a	0.83 ± 0.6 ^a	0.25 ± 0.46 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
G+AOM+DSS	5.9 ± 1.2 ^c	1.63 ± 0.67 ^a	2.72 ± 0.69 ^b	0.92 ± 0.94 ^b	0.37 ± 0.42 ^c
R	2.08 ± 0.8 ^a	1.66 ± 0.50 ^a	0.33 ± 0.46 ^a	0.08 ± 0.30 ^c	0 ± 0 ^a
R+AOM+DSS	5.2 ± 1.6 ^c	2.25 ± 1.45 ^a	2.25 ± 0.40 ^{ab}	1.25 ± 0.46 ^d	0.08 ± 0.30 ^c

Los resultados se expresan como el promedio de n=12 ratas ± DE

Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa p=0.05, prueba Tukey

Las FCA detectadas en los grupos con tratamiento de garambullo (G) y su residuo (R) no difieren estadísticamente a las encontradas en el control negativo (C-), estos resultados sugieren que el garambullo no propicia la formación de FCA ni aumento en la multiplicidad de las mismas (Tabla 5). Los grupos con tratamiento de G+AOM y R+AOM muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al grupo control positivo que es el AOM, lo cual sugiere que el garambullo y su residuo son capaces de inhibir la formación de FCA (Tabla 5). En cuanto a la multiplicidad, se sabe que es el número de criptas por foco y que entre mayor multiplicidad (\geq de 4 criptas por foco) hay mayor probabilidad de formación de adenomas y adenocarcinomas (Cardeni et al. 2003). Los tratamientos G+AOM y R+AOM disminuyeron la multiplicidad (\geq de 4 criptas por foco) de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$), en cuanto a la multiplicidad de 3 focos por cripta, a pesar de que no hay una diferencia significativa se puede observar una tendencia a la baja por parte de los grupos con tratamiento; G+ AOM y R+AOM (Tabla 5).

Estos resultados son similares a los reportados por Boateng et al. (2007) quienes evaluaron el efecto de jugo de blueberry y granada en la formación de FCA en ratas macho Fisher inducidas con AOM (duración de estudio 16 semanas), donde ambos jugos disminuyeron las FCA en comparación con el control (11.33 ± 2.85 y 15.67 ± 1.86 vs 171.67 ± 5.6 , respectivamente) (total de FCA por colon). Así mismo,

Klewicka et al. (2010) reportan una reducción significativa del número de FCA y la multiplicidad (> 4 criptas por foco), en ratas tratadas con MNU (carcinógeno utilizado) al ser tratadas con jugo de betabel durante 8 semanas (FCA 55 ± 18 a 21 ± 6 y multiplicidad 45 ± 21 a 7 ± 4) (Total de FCA por colon). También Banerjee et al (2016) prueban la eficacia de una bebida de ciruela en la formación de FCA en ratas Sprague Dawley tratadas con AOM reportando una disminución de FCA en un 48% vs el control (duración del experimento 9 semanas donde el conteo de FCA se realizó por 1cm^2). Fragoso et al. (2018) reportan una reducción de FCA totales en ratas Wistar inducidas con DMH al ser tratadas con Açai liofilizado, así como una disminución en la multiplicidad en las fosas con ≥ 4 criptas, pero no así en las fosas con 1-3 criptas (similar a los resultados del presente estudio) disminuyendo 222.4 ± 48.5 (grupo control) a 138 ± 49.7 (duración del estudio 25 semanas, conteo total de FCA por colon). A su vez, Arango et al. (2022) reporta la disminución de FCA en un 30% en ratones inducidos con AOM vs el control al ser tratados con berry Andean (duración del estudio 8 semanas, conteo de FCA por 4 cm^2 de colon distal), fruto subutilizado endémico de Colombia, que contiene ácido dihidroxibenzóico y ácido gálico como compuestos mayoritarios, compuestos también identificados en el garambullo (Montiel-Sánchez et al. 2021).

En el presente proyecto, la caracterización del garambullo demuestra que el fruto contiene compuestos bioactivos que pudieran inducir efectos moleculares de protección contra daño producido por carcinógeno en el colon. Por ejemplo, el ácido gálico ha mostrado actividad anticancerígena en células Caco-2 por medio del ensayo MTT, exhibiendo una actividad citotóxica significativa (45%) en comparación con el control (Gulcin et al. 2020). Asimismo, Secme et al. (2023) el efecto antiproliferativo, apoptótico y anti-invasivo del ácido caféico en células de cáncer de colon HTC116 por medio de la regulación de expresión de genes relacionados a apoptosis, ciclo celular e invasión celular, así como microRNAs, además reduciendo el estrés oxidativo y la actividad de la enzima glutatión S-transferasa. Otro compuesto encontrado en el garambullo, que ha sido reportado ampliamente en la

literatura como anticancerígeno, es la quercetina, flavonoide que ha demostrado inducir apoptosis y arresto del ciclo celular a través de efectos antioxidantes y anti-inflamatorios Vollmannová et al. (2024). Por ejemplo, Tezerji et al. (2022) reportó la disminución de la expresión de β -catenina y de proteínas Bcl-2 así como el incremento de la expresión de caspasa 3 en células de cáncer de colon tratadas con quercetina, en comparación con el control. Asimismo, betalainas purificadas de betabel (*Beta vulgaris*) redujeron significativamente COX-2 e IL-8 a nivel de expresión de mRNA en células CaCo-2, produciendo un efecto citotóxico (IC_{50} a 25 μ g/ml), proponiéndose como nutracéutico que limita la iniciación y desarrollo del cáncer colorrectal (Farabegoli, 2017).

El garambullo, como matriz alimentaria, con los compuestos aquí identificados y los que aún no han sido identificados, han mostrado de manera sinérgica, alta capacidad antioxidante, siendo capaz de neutralizar radicales libres derivados del nitrógeno (resultado de la prueba DPPH). Esto sugiere, que estos compuestos fenólicos contenidos en el garambullo, podrían reducir la toxicidad del carcinógeno AOM, ya que este genera un radical de nitrógeno durante su metabolismo en el hígado. Como se había mencionado, el AOM se metaboliza a MAM el cual se glucoronida para su excreción y se libera de este glucorónico en el colon mediante la enzima β -glucoronidasa, ejerciendo así sus efectos cancerígenos (Sears et al. 2014). En esta parte, los compuestos fenólicos del garambullo podrían reducir la activación del MAM una vez liberado en el colon.

Los resultados del presente proyecto, indican que el consumo de garambullo y su residuo dos semanas antes de la exposición al AOM+DSS previene el desarrollo y la proliferación de FCA, sugiriendo un efecto quimiopreventivo en las primeras etapas del cáncer de colon. Los resultados descritos, muestran que la matriz del garambullo contiene fibra dietética y fitoquímicos que pudieran estar actuando a nivel molecular para prevenir la aparición de las FCA. Debido a esto, se hipotetiza que los compuestos no digeridos en la parte superior del tracto gastrointestinal

llegan al colon y previenen el daño que causa el AOM+DSS, sustancia desencadenante y promotora de cáncer de colon, además estos compuestos pudieran también potenciar mecanismos moleculares de defensa celular que impidan el desarrollo de las primeras lesiones.

8.1.12.2 Análisis histológicos de FCA con tinción hematoxilina & eosina

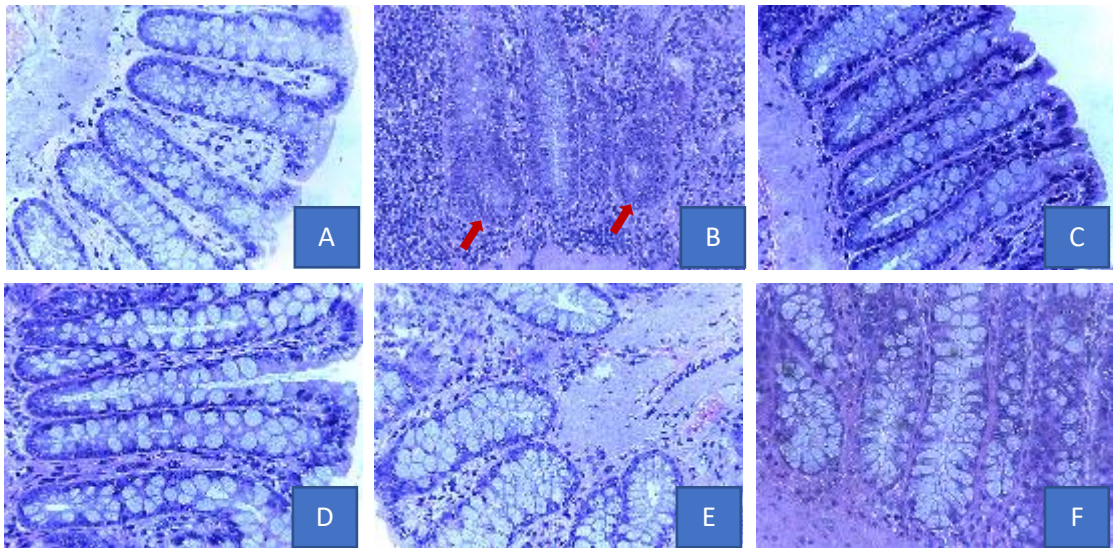


Figura 14. Criptas normales y aberrantes del colon distal con tinción hematoxilina y eosina
A: control, B: AOM+DSS, C: G, D: G+AOM+DSS E: R F: R+AOM+DSS

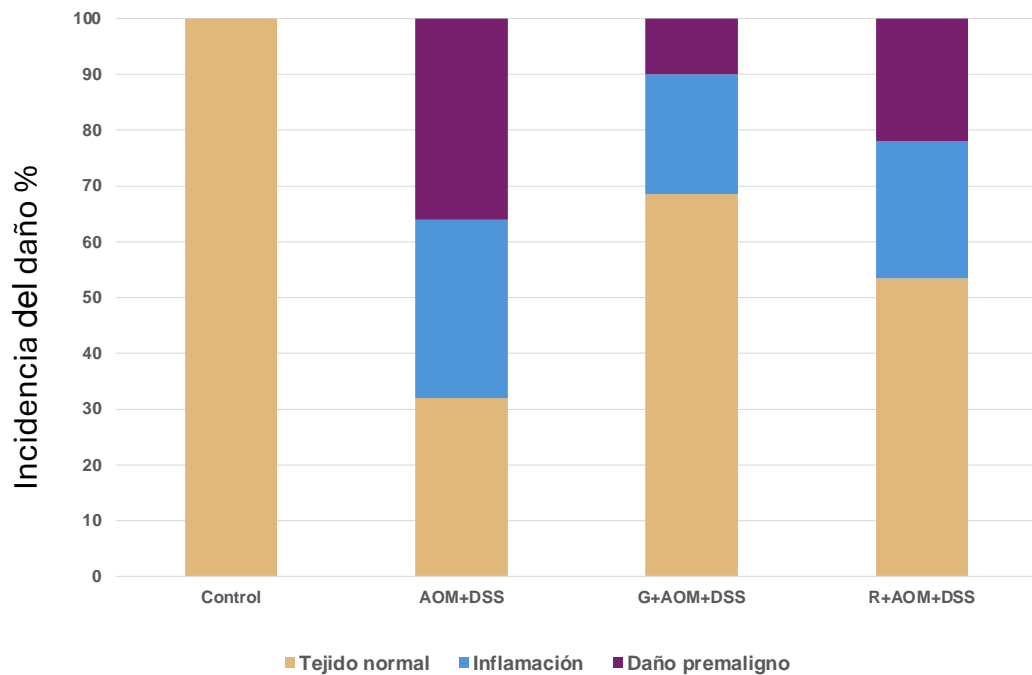


Figura 15. Incidencia de inflamación y daño premaligno en el colon

El análisis histológico del colon distal también se llevó a cabo por medio de la tinción hematoxilina y eosina. La figura 14 muestra la incidencia de inflamación y de daño premaligno en el colon entre los grupos y la figura 15 muestra imágenes representativas del tejido de colon distal de cada grupo. En la imagen correspondiente al grupo control negativo (Fig 14) se puede observar la arquitectura conservada de las criptas así como la preservación del epitelio. La imagen del grupo AOM+DSS (Fig 14) presenta distorsión de la arquitectura de las criptas, dada por el acortamiento e inicio de ramificación de las mismas, así como un aumento de proliferación en la base (flechas rojas). Asimismo, se observa displasia de las células de goblet, estratificación nuclear, expansión de la lámina propia e infiltración linfocitaria. Estos hallazgos se deben a que el AOM induce un daño al ADN de las células normales al ser metabolizado inicialmente en el hígado por el citocromo p450, transformándolo en especies alquilantes altamente reactivas que inducen aductos en el ADN resultando en transiciones Guanina-Adenina. La inducción de mutagénesis en el oncogen KRAS y en el gen supresor de tumor CTNNB1 inducen

a que las células iniciadas afecten las células normales formando las lesiones preneoplásicas, siendo el DSS un polisacárido sulfatado que actúa como promotor al ser tóxico para el epitelio colónico provocando daño epitelial e inflamación (Kuri-García et al. 2019). En las imágenes D y F correspondientes a los tratamientos, se puede observar que el garambullo y su residuo presentaron un efecto quimiopreventivo al reducir la frecuencia de lesiones aberrantes, hiperproliferación, presencia de glóbulos rojos en lámina propia, displasia, pérdida de la arquitectura de la cripta, así como la infiltración linfocitaria, esto al compararse con el grupo AOM. El AOM+ DSS es un detonante de FCA e inflamación, lo cual se refleja en los resultados del presente estudio, donde este carcinógeno y promotor inducen un 35.6% de inflamación y un 33.0% de FCA así como la alteración de la arquitectura de los tejidos del colon de las ratas. La administración del garambullo y su residuo redujo el daño en un 72.5 y 39.7% respectivamente (Figura 15), en comparación con el grupo AOM+DSS, reflejándose una preservación parcial de la arquitectura tisular sin atrofia observable. Diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, sugieren que los polifenoles de diferentes fuentes alimentarias tienen la capacidad de retrasar el desarrollo y progresión del cáncer a través de disminuir la proliferación celular, inactivación de carcinógenos, inducción del arresto del ciclo celular, así como apoptosis y modulación inmunitaria. Estos compuestos han demostrado tener actividades anticancerígenas y quimiopreventivas actuando en diferentes vías de señalización como lo son NF- κ B, proteína cinasa C, proteína activadora AP-1, Nrf2 y modulando el estrés oxidativo (Khan et al. 2020).

8.1.13 Actividad de β -glucuronidasa

Los resultados mostraron que la administración diaria de garambullo y su residuo en una dosis de 5 g/kg fueron suficientes para reducir la actividad bacteriana β -glucuronidasa en heces obteniéndose 49.3 ± 4.0 y 45.5 ± 3.7 pmol/min/ml de muestra, respectivamente, en comparación con el grupo AOM que presentó 85.0 ± 2.2 pmol/min/ml de muestra (Figura 16).

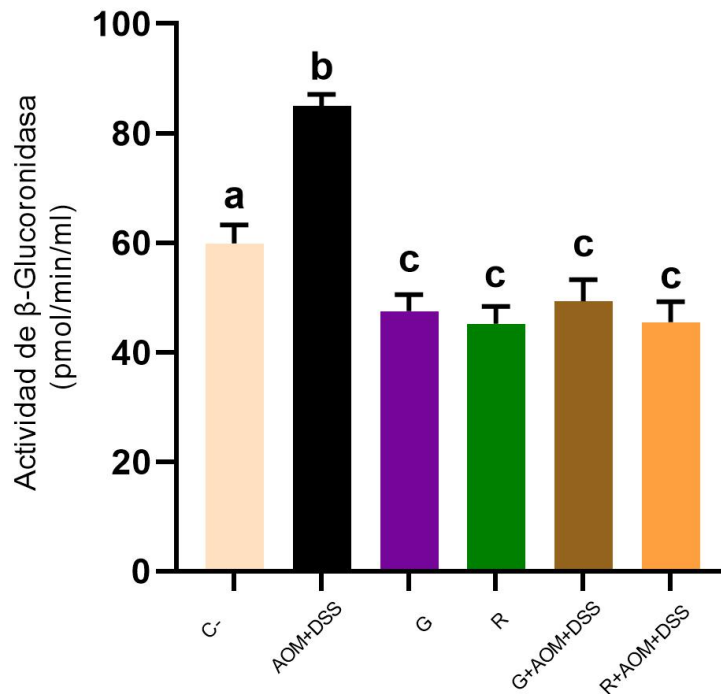


Figura 16. Actividad de β -glucoronidasa en los grupos experimentales. Los resultados son expresados como la media de dos experimentos independientes por duplicado DE. Letras diferentes por columna indican una diferencia significativa $p= 0.05$, prueba Tukey. C-: negativo, AOM: azoximetano; DSS: dextrano sulfato de sodio; G: garmbullo, R: residuo de garmbullo.

Ya se ha demostrado que la alta actividad de la enzima β -glucuronidasa en ratas contribuye al aumento del número de FCA (Arimochi et al. 1999). Por lo tanto, la reducción de la actividad de la β -glucuronidasa en los grupos administrados con garmbullo y su residuo e inducidos con AOM podría contribuir al mecanismo de quimioprotección reflejado en la prevención del desarrollo de FCA en ambos grupos del modelo animal utilizado. La reducción de la actividad de la β -glucuronidasa se debe probablemente a la disminución de la población bacteriana patógena que produce una mayor cantidad de β -glucuronidasa en el colon, como las especies de *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Bacteroides* (Skar et al. 1998). Resultados similares a los del presente estudio se reportaron por Karthik et al. (2009) donde la actividad de β -glucuronidasa aumentó significativamente en ratas wistar inducidas con DMH al compararse con ratas inducidas con DMH y tratadas

con morin, un flavonoide que actúa como agente quimiopreventivo (28.3 ± 2.8 vs 15.8 ± 1.6 mg de p-nitrofenol liberado/min/g proteína). Asimismo, Hijová E et al. (2013) reporta una disminución significativa de la actividad de β -glucoronidasa en contenido cecal de ratas Sprague-Dawley inducidas con DMH y tratadas con prebióticos (inulina) al compararse con las ratas inducidas con DMH (0.18 ± 0.009 vs 0.38 ± 0.16 nitrofenol $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$).

8.1.14 Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

La producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se monitorizó al principio, a la mitad y al final de la fase experimental (Figura 17). La cantidad de AGCC es similar en todos los grupos al comienzo e incrementa con el tiempo, presentando la mayor concentración el ácido acético, seguido del propionato y la concentración más baja fue el butirato, en todos los grupos, a las 16 semanas. A las 8 semanas, el acetato y el butirato aumentan en los grupos G y R (12.08 ± 1.92 y 11.79 ± 0.67 μM de acetato, 7.49 ± 0.84 y 7.41 ± 0.27 μM de butirato, respectivamente), mientras que el grupo AOM tiene mayor concentración de acetato a las 16 semanas (17.30 ± 0.51 μM), y los grupos C- y R tienen un mayor contenido de butirato (7.09 ± 0.90 y 7.88 ± 0.74 μM , respectivamente). Los grupos AOM+DSS, G, G+AOM/DSS y R+AOM/DSS presentaron una menor concentración de este compuesto al final del experimento (5.74 ± 0.58 , 5.33 ± 0.52 , 5.81 ± 0.07 y 5.81 ± 0.81 μM , respectivamente). Entre todos los AGCC producidos, el butirato se oxida rápidamente para generar combustible después de la absorción en los enterocitos en las células epiteliales intestinales diferenciadas y contribuye a la proliferación de mucosa sana. Sin embargo, existe una discrepancia en la función del butirato en células neoplásicas e indiferenciadas, ya que no se utiliza como fuente de energía, utilizándose preferentemente la glucosa, y su acumulación en el citoplasma conduce a la modificación de las histonas (inhibición de HDAC) y a la detención del ciclo celular (Gasaly et al. 2021; Fagundes et al. 2024). Lo anterior podría ser la

explicación de que los grupos G+AOM+DSS y R+AOM+DSS tengan concentraciones de butirato similares al final del período experimental.

Por una parte, el grupo AOM+DSS tiene una acumulación de butirato producida por el metabolismo bacteriano sin ser excretado en las heces, y, por otra parte, los grupos G+AOM/DSS y R+AOM/DSS utilizan el butirato producido en procesos moleculares que dan como resultado la detención de la proliferación y la protección de los colonocitos, lo que se refleja en una disminución significativa en el desarrollo de FCA en este estudio. Sze et al. (2019) informaron que las concentraciones de AGCC fecales no difieren entre el colon de humanos sanos y de aquellos con adenomas o carcinomas de colon. Además, la fermentación de la fibra dietética se acompaña de cambios químicos en los compuestos fenólicos, produciendo AGCC hidroxilados como el ácido 3,4-diOH-fenilacético, el ácido 3-fenilpropiónico, el ácido hidroxibenzoico y otros (Serra et al. 2012). Otros autores plantean la hipótesis de que desempeñan un papel en el desencadenamiento de la muerte celular, la diferenciación y/o la inhibición del crecimiento de los colonocitos transformados al regular el nivel de ARN mensajero de los genes implicados en estos procesos (Sivaprakasam et al. 2016; Wang et al. 2019). A pesar de que en el presente proyecto no se identificaron los AGCC mencionados, se tiene la hipótesis de que, si se producen y que pudieran inducir esos mecanismos protectores en los grupos inducidos que consumieron el garambullo y su residuo, sin embargo, análisis adicionales para identificar los AGCC hidroxilados serán necesarios como parte de la continuidad de este proyecto.

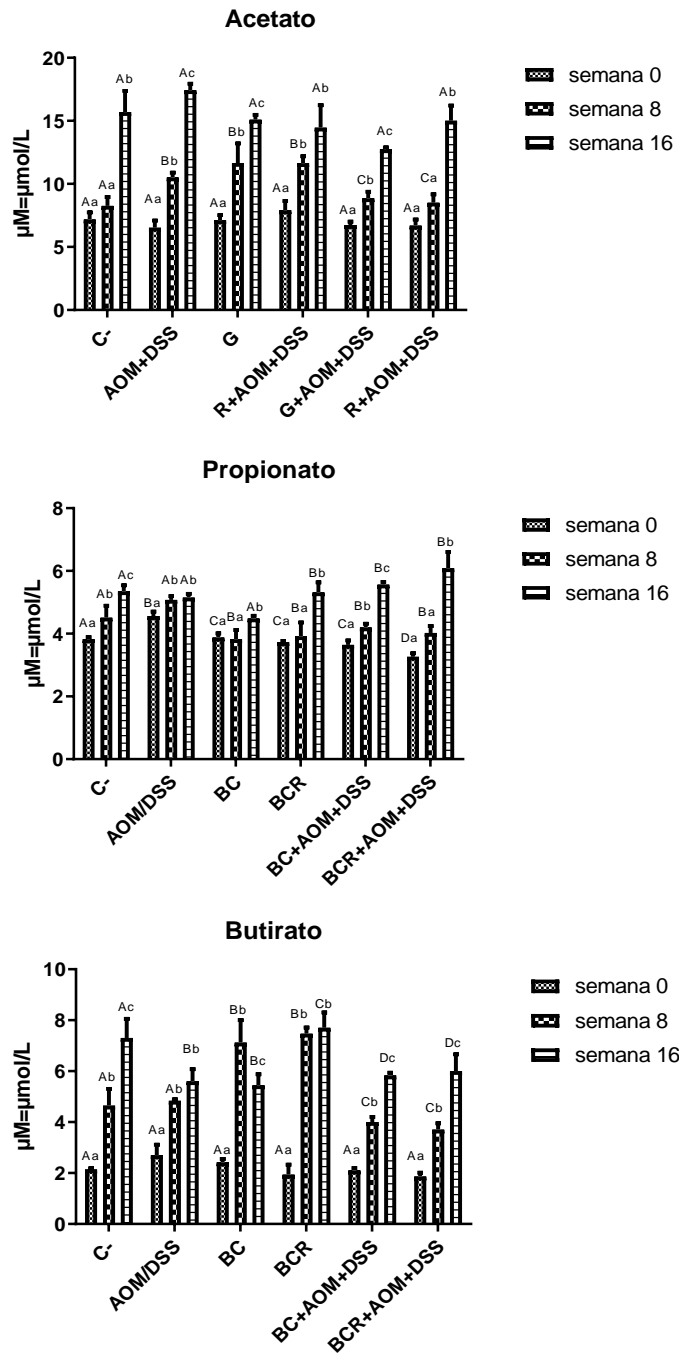


Figura 17. Ácidos grasos de cadena corta en heces de los grupos experimentales. Los resultados son expresados como la media de dos experimentos independientes por duplicado DE. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre los grupos y letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre semanas (p=0.05), prueba Tukey. C-: negativo, AOM: azoximetano; DSS: dextrano sulfato de sodio; G: garambullo, R: residuo de garambullo.

9 CONCLUSIONES

El garambullo es un fruto que ha demostrado contener compuestos bioactivos como lo son fenoles, flavonoides, taninos y betalaínas. Por lo general las técnicas de análisis de estos fitoquímicos emplean medios extractantes solubles; sin embargo, en el presente estudio al realizar un análisis tanto en la parte soluble como en la fibra, se puede concluir que la mayor proporción de éstos se encuentran precisamente en esta fracción comúnmente subestimada. Específicamente, la hidrólisis ácida con 1M fue capaz de extraer la mayor cantidad de fenoles totales, flavonoides totales y taninos totales del garambullo. Hasta donde es de nuestro conocimiento, en este proyecto se reportan por primera vez, tanto en la fracción extraíble como en la no extraíble los siguientes compuestos: kaempferol hexósido, ácido dihidroxibenzoico isómero I, ácido metil-gálico, ácido dihidroxibenzoico hexósido, ácido dihidroxibenzoico isómero II, ácido gálico, ácido hidroxibenzoico isómero III, cumamaroil hexósido y ácido cafeico. Las betalaínas no fueron identificadas en la fracción no extraíble.

Además, la capacidad antioxidante demostrada por los 4 ensayos (DPPH, TEAC, FRAP, ORAC) nos muestra su potencial como neutralizador de radicales libres, donador de hidrógenos y quelante de hierro, por encima de otros frutos similares que son más comerciales. La fracción no extraíble mostró mayor capacidad antioxidante por los 4 métodos.

En cuanto al experimento *in vivo*, se puede concluir que el garambullo y su residuo administrados durante 16 semanas a una dosis de 5 g/kg en ratas Sprague Dawley no promueven la formación de lesiones preneoplásicas como lo son las FCA, ni provocan alteraciones bioquímicas en sangre que pudieran indicar daño, así mismo, no afecta la morfología macroscópica del colon e hígado, órganos involucrados en el metabolismo del carcinógeno AOM. En cambio, el garambullo y su residuo si previenen el desarrollo del estadio temprano de cáncer de colon, al disminuir la formación de FCA, la multiplicidad de las mismas, así como preservar la arquitectura

de la mucosa y submucosa del colon, reduciendo la displasia y la infiltración linfocitaria, todo esto al comparar los grupos tratados con el grupo AOM+DSS. Resultados que pudieran explicarse por la disminución en la actividad de la enzima β -glucoronidasa. Es por todo esto, que el garambullo es un fruto que puede prevenir el cáncer de colon, el valor agregado que le confieren los resultados aquí reportados debe ser tomado en cuenta por la población, así como la industria para promover su consumo y su industrialización.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abate, M., Festa, A., Falco, M., Angela, L., Amalia, L., Grimaldi, A. Zappavigna, S., Sperlongano, P., Irace, C., Caraglia, C., Misso, G. (2019). Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence. *Seminars in Cell & Development Biology*, 98(1), 139-153.

DOI <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.022>

Adom, K.K., & Liu, R.H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6182-6187. DOI: [10.1021/jf0205099](https://doi.org/10.1021/jf0205099)

Afrin, S., Giampieri, F., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T.Y., Cianciosi, D., Reboledo-Rodríguez, P., Jiao, Z., Piera, P.M., Daglia, M., Atanas, G., Battino, M. (2020). Dietary phytochemicals in colorectal cancer prevention and treatment: A focus on the molecular mechanisms involved. *Biotechnology Advances*, 38(1), 107322. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.011>

Aghabozorgi, A.S., Bahreyni, A., Soleimani, A., Bahrami, A., Khazaei, M., Ferns, G.A., Avan, A. (2019). Role of Adenomatous Polyposis Coli (APC) gene mutations in the pathogenesis of colorectal cancer; current status and perspectives. *Biochimie*, 157(1), 64-71. doi: [10.1016/j.biochi.2018.11.003](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.003).

Agner, A.R., Bazo, A.P., Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F. (2005). DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (*Bixa Orellana* L.) in rat colon carcinogenesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 582(1), 146-154.

doi:[10.1016/j.mrgentox.2005.01.009](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.01.009)

Ahmad, S., Tan, M.L., Hamid, S. (2023). DNA repair mechanisms: Exploring potentials of nutraceutical. *Journal of Functional Foods*, 101,105415. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105415>

Alasalvar, C., Grigor, J.M., Zhang, D., Quantick, P.C., Shahidi, F. (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1410–1416.

DOI: [10.1021/jf000595h](https://doi.org/10.1021/jf000595h)

Almet, A.A., Maini, P.K., Moulton, D.E., Byrne, H.B. (2019). Modelling perspectives on the intestinal crypt, a canonical system for growth, mechanics, and remodeling. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 15(1), 32-39.

<https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.12.012>

Alrawi, J.S., Schiff, M., Carroll, R.E., Dayton, M., Gibbs, J.F., Kulavlat, M., Tan, D., Berman, K., Stoler, D.L., Anderson, G. (2006). Aberrant crypt foci. *Anticancer Research*, 26(1), 107–119. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16475686/>

American Cancer Society, 2019. Recuperado 13/05/2019 de <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-colon-recto/acerca/estadisticas-clave.html>

Aprikian, O., Duclos, V., Catherine, B., Claudine, M., Christine, M., Christian, R., Christian, D., Guyot, S., Annick, B. (2003). Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. *The Journal of Nutrition*, 133(6), 1860–1865.

<https://doi.org/10.1093/jn/133.6.1860>

Arango-Varela, S.S., Luzardo-Ocampo, I., Maldonado-Celis, M.E. (2022). Andean berry (*Vaccinium meridionale* Swartz) juice, in combination with Aspirin, displayed antiproliferative and pro-apoptotic mechanisms in vitro while exhibiting protective effects against AOM-induced colorectal cancer in vivo. *Food Research International*, 157(1), 111244.

Arimochi, H., Kataoka, K., Kuwahara, T., Nakayama, H., Misawa, N., Ohnishi, Y. (1999). Effects of β -glucuronidase-deficient and lycopene-producing *Escherichia coli* strains on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262(2), 322–327. DOI: [10.1006/bbrc.1999.1199](https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1199)

Arranz, S. & Saura-Calixto, F. (2010). Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: A study in wheat flour and wheat bran and cereals of the diet. *Journal of Cereal Science*, 51, 313-318. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.01.006>

Arranz, S., Silván, J.M., Saura-Calixto, F. (2010). Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: a study on the Spanish diet. *Molecular Nutrition Food & Research*, 54(11), 1646-1658. DOI: [10.1002/mnfr.200900580](https://doi.org/10.1002/mnfr.200900580)

Ayman, M.M., Azza, M.E., Khaled, N.M.E., Ehab, M.A. (2014). Brown seaweeds ameliorate renal alterations in mice treated with the carcinogen azoxymethane. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(11), 71-76. <https://journals.innovareacademics.in/index.php/ijpps/article/view/3312/9318>

Banerjee, N., Kim, H., Talcott, S.T., Turner, N.D., Byrne, D.H., Mertens-Talcott, S.U. (2016). Plum polyphenols inhibit colorectal aberrant crypt foci formation in rats:

Potential role of the miR-143/AKT/mTOR target of rapamycin axis. *Nutrition Research*, 36(10), 1105-1113. doi: [10.1016/j.nutres.2016.06.008](https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.06.008)

Barr, F.A., Elliot, P.R., Gruneberg, U. (2011). Protein phosphatases and the regulation of mitosis. *Journal of Cell Science*, 124(14), 2323-2334.

DOI: [10.1242/jcs.087106](https://doi.org/10.1242/jcs.087106)

Belenguer, A., Duncan, S.H., Calder, A.G., Holtrop, G., Louis, P., Lobley, G.E., Flint, H.J. (2006). Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3593–3599. OI: [10.1128/AEM.72.5.3593-3599.2006](https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3593-3599.2006)

Benzie I. and Strain J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 239(1): 70-76. DOI: <https://doi.org/10.1006/ABIO.1996.0292>

Bird, R.P. (1987). Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Letters*, 37(2), 147-151. doi: [10.1016/0304-3835\(87\)90157-1](https://doi.org/10.1016/0304-3835(87)90157-1)

Boateng, J., Verghese, M., Shackelford, L., Walker, L.T., Khatiwada, J., Ogutu, S., Williams, D.S., Jones, J., Guyton, M., Asiamah, D., Henderson, F., Grant, F., DeBruce, M., Johnson, A., Washington, S., Chawan, C.B., (2007). Selected fruits reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45(5), 725–732.

DOI: [10.1016/j.fct.2006.10.019](https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.10.019)

Bonelli, M., Monica, S.L., Fumarola, C., Alfieri, R. (2019). Multiple effects of CDK 4/6 inhibition in cancer: from cell a cycle arrest to immunomodulation. *Biochemical Pharmacology*, 170:113676. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113676>

Bounaama, A., Djerdjouri, B., Laroche, A., L., Morvan, V.L., Robert, J. (2012). Short curcumin treatment modulates oxidative stress, arginase activity, aberrant crypt foci, and TGF- β 1 and HES-1 transcripts in 1,2-dimethylhydrazine-colon carcinogenesis in mice. *Toxicology*, 302(2), 308-317. doi: [10.1016/j.tox.2012.08.014](https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.08.014).

Bravo, L.A., Mañas, E., Saura-Calixto, F. (1993). Dietary non-extractable condensed tannins as indigestible compounds: effects on fecal weight and protein and fat excretion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63(1), 63–68. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740630111>

Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity Using the DPPH Free Radical Method. *LWT-Food Science and Technology*, 30(6), 609-615. <https://doi.org/10.1006/food.1997.0240>

Branzei, D. & Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4), 297-308. doi: [10.1038/nrm2351](https://doi.org/10.1038/nrm2351).

Bunzel, M. (2010). Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 47–64. <https://doi.org/10.1007/s11101-009-9139-3>

Burke, P.J. (2017). Mitochondria, bioenergetics and apoptosis in cancer. *Trends in Cancer*, 3(12), 857-870. DOI: [10.1016/j.trecan.2017.10.006](https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.10.006)

Burr, S.J. & Fry, S.C. (2009). Extracellular cross-linking of maize arabinoxylans by oxidation of feruloyl esters to form oligoferuloyl esters and ether-like bonds. *The Plant Journal*, 58(4), 554–567. DOI: [10.1111/j.1365-3113.2009.03800.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2009.03800.x)

Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A. M., Kohen, R., Livrea, M.A. (2002). Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6895–6901. DOI: [10.1021/jf025696p](https://doi.org/10.1021/jf025696p)

Caldecott, K.W. (2014). DNA single-strand break repair. *Experimental Cell Research*, 329(1), 2–8.

DOI: [10.1016/j.yexcr.2014.08.027](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.027)

Calderón-Lozano I. E. & García-Compeán D. 2017. Semiología y métodos de exploración del intestino Delgado. (pp. 86-100). Manual Moderno México

Caliceti, C., Nigro, P., Rizzo, P., Ferrari, R. (2014). ROS, Notch and Wnt signaling pathways: crosstalk between three major regulators of cardiovascular biology. *BioMed Research International*, 218714. doi: [10.1155/2014/318714](https://doi.org/10.1155/2014/318714).

Campos-Vega, R., Guevara-González, R.G., Guevara, B.L., Oomah, B.D., Loarca-Piña, G. (2010). Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polysaccharides modulate gene expression in human colon cancer cells (HT-29). *Food Research International*, 43(4),1057-1064. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.01.017>

Canani, R.B., Di Costanzo, M., Leone, L., Pedata, M., Meli, R., Calignano, A. (2011). Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 17(12), 1519–1528. doi: [10.3748/wjg.v17.i12.1519](https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i12.1519)

Canani, R.B., Terrin, G., Cirillo, P., Castaldo, G., Salvatore, F., Cardillo, G., Coruzzo, A., Troncone, R. (2004). Butyrate as an effective treatment of congenital chloride diarrhea. *Gastroenterology*, 127(2), 630–634. DOI: [10.1053/j.gastro.2004.03.071](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.03.071)

Cappell, S.D., Chung, M., Jaimovich, A., Spencer, L.S., Meyer, T. (2016). Irreversible APC(Cdh1) Inactivation Underlies the Point of No Return for Cell-Cycle Entry. *Cell*, 166(1), 167-180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.077>

Cardeni, G., Femia, A.P., Giannini, A., Favuzza, A., Luceri, C., Salvadori, M., Dolara, P. (2003). Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. *Cancer Research*, 63(10), 2388-2392. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12750256/>

Casimiro, C. (2002). Factores etiopatogénicos en el cáncer colorrectal. Aspectos genéticos y clínicos. *Nutrición Hospitalaria*, 17(3), 128-138. <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3302.pdf>

Chavez-Santoscoy, R.A., Gutierrez, J.A., Serna-Saldívar, S.O. (2009). Phenolic composition, antioxidant capacity and in vitro cancer cell cytotoxicity of nine prickly pear (*Opuntia* spp.) juices. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(2), 146-152. DOI: [10.1007/s11130-009-0117-0](https://doi.org/10.1007/s11130-009-0117-0)

Cheng, Y.T., Yang, C.C., Shyur, L.F. (2016). Phytomedicine: modulating oxidative stress and the tumor microenvironment for cancer therapy. *Pharmacological research*, 114(1), 128-143. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.phrs.2016.10.022>

Canepa, E.T. (2007). Proliferación o quiescencia: una difícil decisión celular. *Revista Química Viva*, 1(6), 17-27. <https://www.redalyc.org/pdf/863/86360104.pdf>

Cao, H., Ou, J., Chen, L., Zhang, Y., Szkudelski, T., Delmas, D., Daglia, M., Xiao, J. (2019). Dietary polyphenols for managing type 2 diabetes: human studies and clinical Trial. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(20), 3371-3379. OI: [10.1080/10408398.2018.1492900](https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1492900)

Carle, R. & Schweiggert, R. 2016. Handbook on natural Pigments in food and beverages: Industrial Applications for Improving Food Color. Elsevier.

Chen, G., Yang, Y, Hu, C., Cheng, X., Xu, Y. (2016). Protective effects of Huangqin decoction against ulcerative colitis and associated cancer in mice. *Oncotarget*, 7(38), 6163-6165. doi: [10.18632/oncotarget.11426](https://doi.org/10.18632/oncotarget.11426)

Cicero, A.F.G., Caliceti, C., Fogacci, F., Giovannini, M., Calabrio, D., Colleti, A., Veronesi, M., Roda, A., Borgi, C. (2017). Effect of apple polyphenols on vascular oxidative stress and endothelium function: a translational study. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(11). doi: [10.1002/mnfr.201700373](https://doi.org/10.1002/mnfr.201700373). Epub 2017 Sep 1.

Cossio-Bolaños, M., Gómez-Campos, R., Vargas-Vitoria, R., Hochmuller-Fogaca, R.T., De Arruda, M. (2013). Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutrición hospitalaria*, 28(6), 2151-2156.
https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S02121611201300060004
[Z](#)

Comalada, M., Bailon, E., De Haro, O., Lara-Villoslada, F., Xaus, J., Zarzuelo, A., Galvez, J. (2006). The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 132(8), 487–497. DOI: [10.1007/s00432-006-0092-x](https://doi.org/10.1007/s00432-006-0092-x)
[X](#)

Cortés-Castell, E., Galindo, C.V., Montell, L.T., Segura, E.S., Rizo-Baeza, M.M., Guillén, G.V. (2014). Actividad antiinflamatoria de un extracto polifenólico de hueso de olivas en la línea celular de monocitos humanos THP1-XBLUE-CD14. *Nutrición Hospitalaria*, 30(1), 113-117. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2014.30.1.7482>

Cox, M.A., Jackson, J., Stanton, M., Rojas-Triana, A., Bober, L., Lavery, M., Yang, X., Zhu, F., Liu, J., Wang, S., Monsma, F., Vassileva, G., Maguire, M., Gustafson, E., Bayne, M., Chou, C.C., Lundell, D., Jenh, C.H. (2009). Short chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World Journal of Gastroenterology*, 15(44), 5549–5557. doi: [10.3748/wjg.15.5549](https://doi.org/10.3748/wjg.15.5549)

Cruz-Bustillo, C.D. (2004). Genética molecular del cancer colorectal. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 96(1), 48-49.
https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1130-01082004000100007

Curti, V., Di Lorenzo, A., Dacrema, M., Xiao, J., Nabavi, S.M., Daglia, M. (2017). In vitro polyphenol effects on apoptosis: an update of literature data. *Seminars in Cancer Biology* 46(1), 119-131. DOI: [10.1016/j.semcan.2017.08.005](https://doi.org/10.1016/j.semcan.2017.08.005)

Cutsem, E.V., Labianca, R., Bodoky, G., Barone, C., Aranda, E., Nordlinger, B., Topham, C., Tabernero, J., André, T., Sobrero, A.F., Mini, E., Greil, R., Di Constanzo, F., Collete, L., Cisar, L., Zhang, X., Khayat, D., Bokemeyer, C., Roth, D., Cunningham, D. (2016). Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *Journal of Clinical Oncology*, 27(19), 3117–25.
doi: [10.1200/JCO.2008.21.6663](https://doi.org/10.1200/JCO.2008.21.6663).

David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., *et al.* (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505, 559-563.

De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M.L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E., Fazio, V.M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon

carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of Carcinogenesis*, 24(1), 10-9. DOI: [10.4103/1477-3163.78279](https://doi.org/10.4103/1477-3163.78279)

Demidenko, Z.N. & Blagosklonny, M.V. (2004). Flavopiridol induces p53 via initial inhibition of Mdm2 and p21 and, independently of p53, sensitizes apoptosis-reluctant cells to tumor necrosis factor. *Cancer Research*, 64(10), 3653–60. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-04-0204](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0204)

Deshpande, S.S. & Cheryan, M. (1985). Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. *Journal Food Science*, 50(4), 905-910. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb12977.x>

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., Liu, R.H. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010–3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>

Di Majo, D., Ricciardi, N., Di Liberto, V., Allegra, M., Frinchi, M., Urone, G., Scordino, M., Massaro, A., Mudó, G., Ferraro, G., Sardo, P., Giglia, G., Gambino, G. (2024). The remarkable impact of Opuntia Ficus Indica fruit administration on metabolic syndrome: Correlations between cognitive functions, oxidative stress and lipid dysmetabolism in the high-fat, diet-fed rat model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 177(1). doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117028

Dick, A.E. & Gerlich, W.D. (2013). Kinetic framework of spindle assembly checkpoint signaling. *Nature Cell Biology*, 15(11), 1370-1377. DOI: [10.1038/ncb2842](https://doi.org/10.1038/ncb2842)

D'Ottavio, G.E., Wulfson, A.M., Rojman, J.A. (2014). Carcinogénesis colorectal nuevas perspectivas e implicancias clinicas para su detección. *Revista Médica del Rosario*, 80(2), 63-74. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-725905>

Durazzo, A., Turfani, V., Azzini, E., Maiani, G., Carcea, M. (2013). Phenols, lignans and antioxidant properties of legume and sweet chestnut flours. *Food Chemistry*, 140(4), 666-671. DOI: [10.1016/j.foodchem.2012.09.062](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.062)

Domínguez-Rodríguez, G., Marina, M.L., Plaza, M. (2017). Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants. *Journal of Chromatography A*, 151(1), 1-5. DOI: [10.1016/j.chroma.2017.07.066](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.066)

Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S., Gürel, A.L., Aktaş, L.Y., Gesheva E. (2008). Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Plant Physiology*, 34(1), 67-78.
http://www.bio21.bas.bg/ipp/gapbfiles/v-34_pisa-08/08_pisa_1-2_67-78.pdf

Erdogan, A. & Yeh-Lee Y. (2020). Colon and pelvic floor anatomy and physiology. Clinical and basic neurogastroenterology and motility. (pp. 113-126). Academic Press.

Esparza-Martínez, F.J., Miranda-López, R., Guzmán-Maldonado, S.H. (2016). Effect of air-drying temperature on extractable and non-extractable phenolics and antioxidant capacity of lime wastes. *Industrial Crops and Products*, 84(1), 1-6.
<https://doi.org/10.1186/s43014-020-00022-0>

Esparza-Martínez, F.J., Miranda-López, R., Mata-Sánchez, S.M., Guzmán-Maldonado, S.H. (2016b). Extractable and non-extractable phenolics and antioxidant capacity of mandarin waste dried at different temperatures. *Plant Food for human nutrition*, 71(3), 294-300. DOI: [10.1007/s11130-016-0559-0](https://doi.org/10.1007/s11130-016-0559-0)

Fagundes, R.R., Belt, S.C., Bakker, B.M., Dijkstra, G., Harmsen, H.J.M., Faber, K.N. (2024). Beyond butyrate: Microbial fiber metabolism supporting colonic epithelial homeostasis. *Trends in Microbiology*, 32(2), 178–189.

DOI: [10.1016/j.tim.2023.07.014](https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.07.014)

Farabegoli, F., Scarpa, E.S., Frati, A., Serafini, G., Papi, A., Spisni, E., Antonini, E., Benedetti, S., Ningali, P. (2017). Betalains increase vitexin-2-O-xyloside cytotoxicity in CaCo-2 cancer cells. *Food Chemistry*, 1(218), 356-365.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.112>

Feltes, B.C. (2019). Architects meets repairers: The interplay between homeobox genes and DNA repair. *DNA Repair*, 73(1), 74-78.

<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.10.007>

Femia, A.P. & Caderni, G. (2008). Rodent models of colon carcinogenesis for the study of chemopreventive activity of natural products. *Planta Medica*, 74(13), 1602-1607. DOI: [10.1055/s-2008-1074577](https://doi.org/10.1055/s-2008-1074577)

Fiala, E. (1977). Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer*, 40(5), 2407-2412.

DOI: [10.1002/1097-0142\(197711\)40:5+<2436::aid-cnrcr2820400908>3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197711)40:5+<2436::aid-cnrcr2820400908>3.0.co;2-u)

Fragoso, M.F., Romualdo, G.R., Vanderveer, L.A., Franco-Barraza, J., Cukierman, E., Clapper, M.L., Carvalho, R.F., Barbisan, L.F. (2018). Lyophilized açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart) attenuates colitis-associated colon carcinogenesis while its main anthocyanin has the potential to affect the motility of colon cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.078>.

Feregrino-Pérez, A.A., Berumen, L.C., García-Alcocer, G. Guevara-González, R.G., Ramos-Gómez, M. Reynoso-Camacho, R., Gallegos, A., Loarca-Piña, G. (2008).

Composition and Chemopreventive Effect of Polysaccharides from Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on Azoxymethane-Induced Colon Cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8737-8744. DOI: [10.1021/jf8007162](https://doi.org/10.1021/jf8007162)

Ganapathy, V., Thangaraju, M., Prasad, P.D., Martin, P.M., Singh, N. (2013). Transporters and receptors for short-chain fatty acids as the molecular link between colonic bacteria and the host. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(6), 869–874. DOI: [10.1016/j.coph.2013.08.006](https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.08.006)

Gandía-Herrero, F. & García-Carmona, F. (2013). Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science*, 18(6), 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.003>

Gao, Y., Mutter-Rottmayer, E., Zlatanou, A., Vaziri, C., Yang, Y. (2017). Mechanisms of post-replication DNA repair. *Genes*, 8(2), 64. doi: [10.3390/genes8020064](https://doi.org/10.3390/genes8020064)

García-Compeán D. & Maldonado-Garza H.J. (2017). Gastroenterología y hepatología. Manual Moderno. https://www.academia.edu/39763527/Gastroenterologia_y_Hepatologia_2aEdicion

García-Villalba, R.; Giménez-Bastida, J.A.; García-Conesa, M.T.; Tomás-Barberán, F.A.; Carlos Espín, J.; Larrosa, M. Alternative method for gas chromatography-mass spectrometry analysis of short-chain fatty acids in faecal samples. *J. Sep. Sci.* 2012, 35, 1906–1913.

Gasaly, N., Hermoso, M.A., Gotteland, M. (2021). Butyrate and the fine-tuning of colonic homeostasis: Implication for inflammatory bowel diseases. *International Journal of Molecular Science*, 22(6), 3061. DOI: [10.3390/ijms22063061](https://doi.org/10.3390/ijms22063061)

Gems, D., Doonan, R. (2009). Antioxidant defense and aging in *C. elegans*: is the oxidative damage theory of aging wrong?. *Cell Cycle*, 8(1), 1681-1687. DOI: [10.4161/cc.8.11.8595](https://doi.org/10.4161/cc.8.11.8595)

Gill, R.K. & Dudeja, P.K.R. 2011. A novel facet to consider for the effects of butyrate on its target cells. Focus on “the short-chain fatty acid butyrate is a substrate of breast cancer resistance protein”. *American journal of physiology-cell physiology*, 301(5), 977-979. DOI: [10.1152/ajpcell.00290.2011](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00290.2011)

Gunderson, L.L., Jessup, J.M., Sargent, D.J., Greene, F.L., Stewart, A.K. (2010). Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *Journal of Clinical Oncology*, 28(2), 264–71. doi: [10.1200/JCO.2009.24.0952](https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.0952).

Goñi, I. & Serrano, J. (2005). The intake of dietary fiber from grape seeds modifies the antioxidant status in rat cecum. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(11), 1877–1881. DOI: [10.1002/jsfa.2213](https://doi.org/10.1002/jsfa.2213)

Greer, J.B., O’Keefe, S.J. (2011). Microbial induction of immunity, inflammation, and cancer. *Frontiers in Physiology*, 1(1), 168. DOI: [10.3389/fphys.2010.00168](https://doi.org/10.3389/fphys.2010.00168)

Grimsrud, P.A., Xie, H., Griffin, T.G., Bernlohr, A. (2008). Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(32), 21837-21841. doi: [10.1074/jbc.R700019200](https://doi.org/10.1074/jbc.R700019200)

Grilo, A.L. & Mantalaris, A. (2019). Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology advances*, 37(3), 459-475. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2019.02.012](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.012)

Gulcin, A.S.C., Demirkaya, A., Kondolot, E.S. (2020). Antioxidant and anticancer activities of gallic acid loaded sodium alginate microspheres on colon cancer. *Current Applied Physics*, 40(1), 30-42. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2020.06.002>

Guo, C., Yang, J., Wei, J., Yunfeng, L., Jing, X., Yugang, J. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23(1), 1719-1726. doi:10.1016/j.nutres.2003.08.005

Gupta, B., Das, P., Ghosh, S., Manhas, J., Sen, S., Pal, S., Sahni, P., Upadhyay, A.D., Panda, S.K., Gupta, S.D. (2016). Identification of the high-risk aberrant crypt foci and mucin depleted foci in human colon, with study of colon cancer stem cell markers. *Clinical Colorectal Cancer*, 16(3), 204-213.
doi: 10.1016/ j.clcc.2016.09.001.

Gupta, C.S., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W., Aggarwal, B.A. (2012). Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(11), 1295-1322. doi: [10.1089/ars.2011.4414](https://doi.org/10.1089/ars.2011.4414)

Guzmán-Maldonado, S.H., Herrera-Hernández, G., Hernández-López, D., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Tovar, A., Vaillant, F., Brat, P. (2010). Physicochemical nutritional and functional characteristics of two underutilized fruit cactus species (*Myrtillocactus*) produces in central Mexico. *Food Chemistry*, 121(2), 269-386. DOI: [10.1016/j.foodchem.2009.12.039](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.039)

Hamer, H.M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F.J., Brummer, R.J. (2008). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27 (2), 104-119. DOI: [10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x)

Han, Y., Huang, M., Li, Lingfei., Cai, Xiaokun., Gao, Z., Li, F., Rakariyatham, K., Song, M., Fernández-Tomé, S., Xia, H. 2019. Non-extractable polyphenols from cranberries: potential anti-inflammation and anti-colon-cancer agents. *Food & Function*, 10, 7714. DOI: [10.1039/c9fo01536a](https://doi.org/10.1039/c9fo01536a)

Hang, B. & Singer, B. (2003). Protein-protein interactions involving DNA glycosylases. *Chemical Research in Toxicology Journal*, 16(10), 1181-1195. DOI: [10.1021/tx030020p](https://doi.org/10.1021/tx030020p)

Hano-García, O.M., Wood-Rodríguez, L., Galbán-García, E., Abreu-Vázquez, M.R. (2011). Factores de riesgo para el cáncer colorrectal. *Revista Cubana de Medicina*, 50(2).

Hartzfeld, P.W., Forkner, R., Hunter, M.D., Hagerman, A.E. Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(7), 1785-1790. DOI: [10.1021/jf0111155](https://doi.org/10.1021/jf0111155)

Hernández-López, D., Vaillant, F., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Maldonado, S.H. (2008). Myrtillocactus (cactaceae): botanical, agronomic, physicochemical and chemical characteristics of fruits. *Fruits*, 63(5), 269-276. <http://dx.doi.org/10.1051/fruits:2008042>

Herrera-Hernández, M.G., Guevara-Lara, F., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Maldonado, S.H. (2011). Effects of maturity stage and storage on cactus berry (*Myrtillocactus geometrizans*) phenolics vitamin C, betalains and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 129(4), 1744-1750. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.042>

Instituto Nacional de Salud Pública. (2018). Infografía del cáncer de colon, recuperado el 10/05/2019 de <https://www.insp.mx/infografias/cancer-colon-recto.html>

Hijová, E., Szabadosova, V., Stofilova, J., Hrcckova, G. (2013). Chemopreventive and metabolic effects of inulin on colon cancer development. *Journal of Veterinary Science*, 14(4), 387-393. doi.org/10.4142/jvs.2013.14.4.387

Hustedt, N., Durocher, D. (2016). The control of DNA repair by the cell cycle. *Nature Cell Biology*, 19(1), 1-9. DOI: [10.1038/ncb3452](https://doi.org/10.1038/ncb3452)

Hu, W., Feng, Z., Eveleigh, J., Iyer, G., Pan, J., Amin, S., Chung, F.L., Tang, M. (2002). The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 23(11), 1781–1789. DOI: [10.1093/carcin/23.11.1781](https://doi.org/10.1093/carcin/23.11.1781)

Ichim, G., & Tait, S.W.G. (2016). A fate worse than death: Apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, 16(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.58>.

Imoto, H. & Okada, M. (2019). Signal-dependent regulation of early-response genes and cell cycle: a quantitative view. *Current Opinion in Systems Biology*, 15(1), 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2019.04.00>

Irony-Tur, S.M. & Kerem, B. (2017). DNA replication stress drives fragile site instability. *Mutation Research*, 808(1), 56-61. DOI: [10.1016/j.mrfmmm.2017.10.002](https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.10.002)

Ishizuka, M., Nagata, H., Takagi, K. (2016). Clinical Significance of the C-Reactive Protein to Albumin Ratio for Survival After Surgery for Colorectal Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 23(3), 900–907 . <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4948-7>

John, J.A. & Shahidi, F. (2010). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*). *Journal of Functional Foods*, 2(1), 196-209. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.04.008>

Juárez-Vázquez, C.I. & Rosales-Reynoso, M.A. (2014). Cáncer colorrectal (CCR): alteraciones genéticas y moleculares. *Gaceta Médica de México*, 150(1), 154-64. https://www.anmm.org.mx/GMM/2014/n2/GMM_150_2014_2_154-164.pdf

Karthik, K.V., Vennila, S., Nalini, N. (2009). Modifying effects of morin on the development of aberrant crypt foci and bacterial enzymes in experimental colon cancer. *Food and Chemical Toxicology*, 47(2), 309-315. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.017>

Karanam, K. (2012). Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Molecular Cell*, 47(2), 320–329. DOI: [10.1016/j.molcel.2012.05.052](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.052)

Kardum, N. & Glibetic, M. (2018). Chapter Three - Polyphenols and Their Interactions with Other Dietary Compounds: Implications for Human Health. *Advances in Food and Nutrition Research*, Academic Press, 84(1), 103-144. DOI: [10.1016/bs.afnr.2017.12.001](https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.12.001)

Kernan J, Bonacci T, Emanuele M. 2018. Who guards the guardian? Mechanisms that restrain APC/C during the cell cycle. *Molecular Cell Research*. 1865:1924-1933.

Keskin, E. & Yoldas-Ilktac, H. (2022). Fructose consumption correlates with triglyceride-glucose index and glycemic status in healthy adults. *Clinical Nutrition ESPEN*, 52(1), 184-189. doi.org/10.1016/j.clnesp.2022.11.008

Khan, H., Reale, M., Ullah, H., Sureda, A., Tejada, S., Wang, Y., Zhang-Jin, Z., Xiao, J. (2020). Anti-cancer effects of polyphenols via targeting p53 signaling pathway: Updates and future directions. *Biotechnology Advances*, 38: 107385.

DOI: [10.1016/j.biotechadv.2019.04.007](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.007)

Khodyreva, S. & Lavrik, O. (2020). Non-canonical interaction of DNA repair proteins with intact and cleaved AP sites. *DNA Repair*, 90(1), 102847. DOI <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102847>

Klewicka, E., Nowak, A., Zdunczyk, Z., Cukrowska, B., Blasiak, J. (2010). Protective effect of lactofermented beetroot juice against aberrant crypt foci formation and genotoxicity of fecal water in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64(6), 599-604. DOI: [10.1016/j.etp.2010.12.001](https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.12.001)

Koliadenko, V. & Wilanowski, T. (2019). Additional functions of selected proteins involved in DNA repair. *Free radical biology and medicine*, 146(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.010>

Krantz, C., Monier, M., Wahlstrom, B. (1980). Absorption, excretion, metabolism and cardiovascular effects of beetroot extract in the rat. *Food and Cosmetics Toxicology*, 18(4), 363-366. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(80\)90190-X](https://doi.org/10.1016/0015-6264(80)90190-X)

Kristl, J., Slekovec, M., Tojnko, S., Unuk, T. (2011). Extractable antioxidants and non-extractable phenolics in the total antioxidant activity of selected plum cultivars (*Prunus domestica* L): Evolution during on-tree ripening. *Food Chemistry*, 125(1), 29-34. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.027>

Kuri-García, A., Godínez-Santillán, R.I., Mejía, C., Ferriz-Martínez, R.A., García-Solís, P., Enríquez-Vázquez, A., García-Gasca, T., Chávez-Servín, J.S. (2019). Preventive Effect of an Infusion of the Aqueous Extract of Chaya Leaves (*Cnidioscolus aconitifolius*) in an Aberrant Crypt Foci Rat Model Induced by Azoxymethane and Dextran Sulfate Sodium. *Journal of Medicinal Food*, 22(8), 851-860. doi:10.1089/jmf.2019.0031

Lagunas-Rangel, F.A. (2018). Daño y reparación del ADN. *Ciencia* 69(4), 1-8. <https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/online/DanoADN.pdf>

Lagunas-Cruz M.C., Valle-Mendiola, A., Soto-Cruz, I. (2014). Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Revista especializada en Ciencias de la Salud*, 17(2), 98-107. <https://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2014/vre142e.pdf>

Lechner, J.F., Wang, L.S., Rocha, C.M., Larue, B., Henry, C., McIntyre, C.M., Riedl, K.M., Schwartz, S.J., Stoner, G.D. (2010). Drinking water with red beetroot food color antagonizes esophageal carcinogenesis in N-nitrosomethylbenzylamine-treated rats. *Journal of Medicinal Food*, 13(3), 733-739. DOI: [10.1089/jmf.2008.0280](https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0280)

Lecomte, T., André, T., Bibeau, F., Blanc, B., Cohen, R., Lagasse, J.P., Laurent-Puig, P., Babau, J.M., Panis, Y., Portales, F., Taieb, J. (2018). Cancer du Colon In: *Thésaurus National de Cancérologie Digestive*. <http://www.tncd.org>

Lee, C., Kim, H., Park, K.S., Park, H.G. (2019). Nucleic acid-based fluorescent methods for the determination of AND repair enzyme activities: A review. *Analytical Chimical Acta*, 1060(1), 30-44. DOI: [10.1016/j.aca.2018.12.055](https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.12.055)

Lee, H.S., Cho, H.J., Kwon, T.G., Park, J.H.Y. (2014). Kaempferol downregulates insulin-like growth Factor-I receptor and ErbB3 signaling in HT-29 human colon

cancer cells. *Journal of Cancer Prevention*, 19(3), 161–169.
<https://doi.org/10.15430/JCP.2014.19.2.161>.

Lee, S.L., Yi, M.Y., Yun, J.W., Jung, H.J., Kim, D.H., Kim, H.J., Chang, S.H., Kim, G., Ryu, C.H., Shin, S.C., Hong, S.C., Choi, Y.H., Jung, J.M. (2014). Polyphenols isolated from *Allium cepa* L. induces apoptosis by induction of p53 and suppression of Bcl-2 through inhibiting PI3K/Akt signaling pathway in AGS human cancer cells. *Journal of Cancer Prevention*, 19(1), 14-22. doi: [10.15430/jcp.2014.19.1.14](https://doi.org/10.15430/jcp.2014.19.1.14)

Lei, X.G., Zhu, J.H., Cheng, W.H., Bao, Y., Ho, Y., Reddi, A.R. (2016). Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. *Physiological Reviews*, 96(1), 307–364. DOI: [10.1152/physrev.00010.2014](https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2014)

León, V.M. & Sáenz, R. (2007). Focos de criptas aberrantes El comienzo de la historia. *Gastroenterología Latinoamericana*, 4(18), 383-389.
<https://gastrolat.org/DOI/PDF/10.0716/gastrolat2007n400008.pdf>

Ley, E.R., Peterson, A.D. & Gordon, J.I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4), 837-848.
DOI: [10.1016/j.cell.2006.02.017](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017)

Lim, M.C., Won, Y.J., Lim, J., Seo, S.S., Kand, S., Yoo, C.W., Kim, Y.J., Oh, J.H., Bristow, R.E., Park, S.Y. (2018). Second primary colorectal cancer among endometrial cancer survivor: shared etiology and treatment sequelae. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144(5), 845-854.

Lin, Y., Huang, G., Zhang, Q., Wang, Y., P. Dia, V., Meng, X. 2020. Ripening affects the physicochemical properties, phytochemicals and antioxidant capacities of two blueberry cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 162.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.111097>

Litescu, S.C., Eremia, S.A., Tache, A., Radu, G.L., Vasilescu, I. (2014). The use of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assays in the assessment of beverages' antioxidant properties. Selective assays for antioxidants. Processing and Impact on Antioxidants in Beverage. (pp. 245-251), Academic Press. DOI: [10.1016/B978-0-12-404738-9.00025-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00025-8)

Lizarbe-Iracheta, M.A. (2007). El suicidio y la muerte celular. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 101(2). <https://rac.es/ficheros/doc/00553.pdf>

Lizarraga, D., Vinardel, M.P., Noe, V., Delft-Joost, V.H., Alcaráz-Vizán, G. Van-Breda, S.G. Staal, Y., Günther, U.L., Reed, M.A., Ciudad, C.J., Torres, J.L. Cascante, M. (2011). A lyophilized red grape pomace containing proanthocyanidin-rich dietary fiber induces genetic and metabolic alterations in colon mucosa of female C57Bl/6J mice. *The Journal of Nutrition*, 141(9), 1597–1604. <https://doi.org/10.3945/jn.110.133199>

López-Olivía, M.E., Agis-Torres, A., García-Palencia, P., Goñi, I. Muñoz-Martínez, E. (2006). Induction of epithelial hypoplasia in rat cecal and distal colonic mucosa by grape antioxidant dietary fiber. *Nutrition Research*, 26(12), 651–658. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2006.09.013>

López-Olivía, M.E., Agis-Torres, A.A., Goñi, I., Muñoz-Martínez, E. (2010). Grape antioxidant dietary fiber reduced apoptosis and induced a pro-reducing shift in the glutathione redox state of the rat proximal colonic mucosa. *British Journal of Nutrition*, 103(8), 1110–1117. DOI: [10.1017/S0007114509992996](https://doi.org/10.1017/S0007114509992996)

López-Olivia, M.E., Pozuelo, M.J., Rotger, R., Muñoz-Martínez, E., Goñi, I. (2013). Grape antioxidant dietary fiber prevents mitochondrial apoptotic pathways by enhancing Bcl-2 and Bcl-xL expression and minimising oxidative stress in rat distal colonic mucosa. *British Journal of Nutrition*, 109(1), 4–16.

DOI: [10.1017/S0007114512000517](https://doi.org/10.1017/S0007114512000517)

Lu, L., Chan, R.L.Y., Luo, X.M., Wu, W.K.K., Shin, V.Y., Cho, C.H. (2014). Animal models of gastrointestinal inflammation and cancer. *Life Sciences*, 108(1), 1-6.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.04.036>

MacLeod, R.J. (2013). Extracellular calcium-sensing receptor/PTH knockout mice colons have increased Wnt/ β -catenin signaling, reduced non-canonical Wnt signaling, and increased susceptibility to azoxymethane-induced aberrant crypt foci. *Laboratory Investigation*, 93(5), 520-527.

DOI: [10.1038/labinvest.2013.51](https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.51)

Mahadevan, J., Bowerman, S., Luger, K. (2019). Quantitating repair accumulation at DNA lesions: past, present and future. *DNA Repair*, 81:102650.

doi: [10.1016/j.dnarep.2019.102650](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102650)

Mahadevan, V. (2020). Anatomy of the caecum, appendix and colon. *Surgery*, 38(1),

1-6. DOI: [10.1016/j.mpsur.2019.10.017](https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2019.10.017).

Majumdar, A.P.N., Banerjee, S., Nautiyal, J., Patel, B., Patel, V., Du, J., Yu, Y., Elliot, A., Levi, E., Sarkar, H. (2009). Curcumin synergizes with resveratrol to inhibit colon cancer. *Nutrition and Cancer*, 61(49), 544-553. doi: [10.1080/01635580902752262](https://doi.org/10.1080/01635580902752262)

Mani, C., Reddy, P.H., Palle, K. (2019). DNA repair fidelity in stem cell maintenance, health and disease. *BBA-Molecular basis of Disease*, 1866(4), 165444.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.03.017>

Mañé-Almero, J. (2007). Modelos experimentales *in vivo* de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal. Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad. *Nutrición hospitalaria*, 22(2), 178-89.

https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S021216112007000200007

Martin de Civetta, M.T. & Civetta, J. (2011). Carcinogénesis. *Salud Pública de México*, 53(5). <https://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/7086>

Martín-Carrón, N., Saura-Calixto, F., Goñi, I. (2000). Effects of dietary fiber- and polyphenol-rich grape products on lipidemic and nutritional parameters in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(8), 1183–1188.

[10.1002/1097-0010\(200006\)80:8<1183::AID-JSFA617>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200006)80:8<1183::AID-JSFA617>3.0.CO;2-G)

Martysiak-Zurowska, D. & Wenta, W. (2012). A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Scientiarum Polonorum Technología Alimentaria*, 11(1), 83-89.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22230978/>

Massagué, J. (2004). G1 Cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432(7015), 298-306. DOI: [10.1038/nature03094](https://doi.org/10.1038/nature03094)

Miller, J.J., Summers, M.K., Hansen, D.V., Nachury, M.V., Lehman, N.L., Loktev, A., Jackson, P.K. (2006). Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes & Development*, 20(17), 2410-2420.

doi: [10.1101/gad.1454006](https://doi.org/10.1101/gad.1454006)

Mochida, S., Rata, S., Hino, H., Nagai, T., Novák, B. (2016). Two bistable switches govern M phase entry. *Current Biology*, 26(24), 3361-3367. [10.1016/j.cub.2016.10.022](https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.10.022)

Montiel-Sánchez, M., García-Cayuela, T., Gómez-Maqueo, A., García, H.S., Cano, M.P. (2021). In vitro gastrointestinal stability, bioaccessibility and potential biological activities of betalains and phenolic compounds in cactus berry fruits (*Myrtillocactus geometrizans*). *Food Chemistry*, 342, 128087

Moreira, L., Balaguer, F., Lindor, N., De la Chapelle, A., Hampel, H., Aaltonen, L.A., Hopper, J.L., Le Marchand, L.L., Gallinger, S., Newcomb, P.A., Haile, R., Thibodeau, S.N., Gunawardena, S., Jenkis, M.A., Buchanan, D.D., Potter, J.D., Baron, J.A., Ahnen, D.J., Moreno, V... Consortium, E. (2012). Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA*, 308(15), 1555-1565.

Morry, J., Ngamcherdtrakul, W., Yantasee, W. (2017). Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. *Redox Biology*, 11(1), 240-253.

DOI: [10.1016/j.redox.2016.12.011](https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.011)

Mostafa, I.W., Ahmed, A.A.A., Insaaf, M.A., Mohammad, S.R. (2016). Red Seaweed (*Hypnea Bryodies* and *Melanothamnus Somalensis*) extracts counteracting azoxymethane-induced hepatotoxicity in rats. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(12), 5071-5074. DOI:[10.22034/APJCP.2016.17.12.5071](https://doi.org/10.22034/APJCP.2016.17.12.5071)

Munteanu, I.G. & Apetri, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(22), 7. DOI: [10.3390/ijms22073380](https://doi.org/10.3390/ijms22073380)

Nabavi, S.F., Atanasov, A.G., Khan, H., Barreca, D., Trombetta, D., Testai, L., Sureda, A., Tejada, S., Vacca, R.A., Pittalá, V., Gulei, D., Berindan-Neagoe, I., Shiroomie, S., Nadavi, S.M. (2018). Targeting ubiquitin-proteasome pathway by natural, in particular polyphenols, anticancer agents: lessons learned from clinical trials. *Cancer Letters*, 10(434), 101–113. DOI: [10.1016/j.canlet.2018.07.018](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.07.018)

Nalini, N., Chitra, S., Sabitha, K., Viswanathan, P., Menon, V.P. (1996). Effect of *Cocos nucifera* and red chilli on intestinal b-glucuronidase and mucinase activity in experimental colon cancer. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 5(2), 96-99. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24394518/>

Nambiar, P.R., Girnung, G., Lilona, N.A., Guda, K., Whiteley, H.E., Rosenberg, D.W. (2003). Preliminary analysis of azoxymethane induced colon tumors in inbred mice commonly used as transgenic/knockout progenitors. *International Journal of Oncology*, 22(1), 145-150. <https://doi.org/10.3892/ijo.22.1.145>

Nielsen, H. & Krokan, H.E. (2003). Base excision repair in a network of defense and tolerance. *Carcinogenesis*, 22(7), 987-998. DOI: [10.1093/carcin/22.7.987](https://doi.org/10.1093/carcin/22.7.987)

Novák, B., Heldt, F.S., Tyson, J.J. (2018). Genome Stability Cell Proliferation: A systems analysis of molecular mechanisms controlling progression through the eukaryotic cell cycle. *Current Opinion in Systems Biology*, 9(1), 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2018.02.004>

Nyskohus, L.S., Watson, A.J., Margison, G.P., Le, R.K.L., Kim, S.W., Lockett, T.J., Head, R.J., Young, G.P., Hu, Y. (2013). Repair and removal of azoxymethane-induced O6-methylguanine in rat colon by O6-methylguanine DNA methyltransferase and apoptosis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 758(1), 80-86. DOI: [10.1016/j.mrgentox.2013.10.001](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.10.001)

Oficjalska, K., Raverdeau, M., Aviello, G., Wade, S.C., Hickey, A., Sheehan, K.M., Corr, S.C., Kay, E.W., O'Neill, L.A., Mills, K.H.G., Creagh, E.M. (2015). Protective role of caspase-11 during acute experimental murine colitis. *Journal of Immunology*, 194(3), 1252-1260. DOI: [10.4049/jimmunol.1400501](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400501).

Organización mundial de la salud. 3 Agosto 2018. Datos y cifras. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>

Organización mundial de la salud. 9 Julio 2020. Datos y cifras. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>

Organización mundial de la salud. 11 Julio 2023. Datos y cifras. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626. DOI: [10.1021/jf010586o](https://doi.org/10.1021/jf010586o)

Pan, P., Huang, Y.W., Oshima, K., Yearsley, M., Zhang, J., Yu, J., Arnold, M., Wang, L.S. (2018). An immunological perspective for preventing cancer with berries. *Journal of Berry Research*, 8(3), 163-175. doi: [10.3233/JBR-180305](https://doi.org/10.3233/JBR-180305)

Passalacqua, C.H., Aravena, T.A., Castillo, S.T. (2010). Genética del cancer de colon. *Revista Hospital Clínico Universidad de Chile*, 21(1), 162-9. https://www.redclinica.cl/Portals/0/Users/014/14/14/Publicaciones/Revista/genetica_cancer_colon.pdf

Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M.E., Saura-Calixto, F. (2013). Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence metabolic fate and health effects. *Nutrition Research Reviews*, 26 (2), 118–129.

DOI: [10.1017/S0954422413000097](https://doi.org/10.1017/S0954422413000097)

Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. (2005). Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12) 5036-5040. DOI: [10.1021/jf050049u](https://doi.org/10.1021/jf050049u)

Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. (2015). Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: intake in four European countries. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 74(1), 315-323.

DOI: [10.1016/j.foodres.2015.05.007](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.007)

Pérez-Jiménez, J. & Torres, J.L. (2011). Analysis of non-extractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 12713–12724. DOI: [10.1021/jf203372w](https://doi.org/10.1021/jf203372w)

Periasamy, V.S. & Alshatwi, A. (2013). Tea polyphenols modulate antioxidant redox system on cisplatin-induced reactive oxygen species generation in a human breast cancer cell. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 112(6), 374-384.

DOI: [10.1111/bcpt.12035](https://doi.org/10.1111/bcpt.12035)

Perry, R.J., Peng, L., Barry, N.A., Cline, G.W., Zhang, D., Cardone, R.L. (2016). Acetate mediates a microbiome–brain– β -cell axis to promote metabolic syndrome.

Nature, 534(7606), 213-217. DOI: [10.1038/nature18309](https://doi.org/10.1038/nature18309)

Perse, M. & Cerar, A. (2011). Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *Journal of biomedicine and biotechnology*, 28(1), 473964. doi: [10.1155/2011/473964](https://doi.org/10.1155/2011/473964)

Pisoschi, A.M. & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 5(97), 55-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

Pointet, A.L. & Taieb, J. (2017). Cáncer de colon. *Tratado de Medicina*, 21(1), 1-7. [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(16\)81792-4](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(16)81792-4).

Pozuelo, M.J., Agis-Torres, A., Hervert-Hernández, D., López-Olivia, M.E., Muñoz-Martínez, E., Rotger, R., Goñi, I. (2012). Grape antioxidant dietary fiber stimulates *Lactobacillus* growth in rat cecum. *Journal of Food Science*, 77(2), 59–62.

DOI: [10.1111/j.1750-3841.2011.02520.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02520.x)

Prakash, N.N., Medhe, S., Dahal, M., Koirala, P., Nirmal, S., Al-Asmari, F, Xu, B. (2024). Betalains protect various body organs through antioxidant and anti-inflammatory pathways. *Food Science and Human Wellness*, 13(3), 1109-1117.

<https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250093>

Pretlow, T.P., Cheyer, C., O’Riordan, M.A. (1994). Aberrant crypt foci and colon tumors in F344 rats have similar increases in proliferative activity. *International Journal of Cancer*, 56(4), 599-602. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910560422>

Prosky, L., Asp, N.G., Schweizer, T.F., DeVries, J.W., Furda, I. (1988). Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory Study. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 71(5), 1017–1023. <https://sci-hub.se/downloads/2020-02-18/49/prosky1988.pdf>

Pupo, E.V., Gómez-Robles, L., Campaña-Marrero, I.R. (2016). Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico*, 21(1), 1560-4381. <https://revcocmed.sld.cu/index.php/cocmed/article/view/2173>

Quirós-Sauceda, A.E., Palafox, H., Robles-Sánchez, R.M., González-Aguilar, G.A. (2012). Interacción de compuestos fenólicos y fibra dietaria: capacidad antioxidante y biodisponibilidad. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 7(3), 3-11. DOI:[10.18633/bt.v13i3.91](https://doi.org/10.18633/bt.v13i3.91)

Rady, H., Hemmaid, K.Z., Esmail, N.N., Eid, M., Elshat, A.A. (2018). Sidr Kashmiry honey and its fractions induced apoptosis in hepatocellular carcinoma in vitro. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(1), 343-351. DOI: <https://doi.org/10.3233/mnm-18209>

Rahimi, P., Abedimanesh, S., Mesbah-Namin, A.S., Ostadrahimi, A. (2018). Betalains, the nature-inspired pigments in health and diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(18), 2949-2978. DOI: 10.1080/10408398.2018.1479830

Raju, J. (2008). Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: relevance in studying chemoprevention of colon cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 14(43), 6632-6635. doi: [10.3748/wjg.14.6632](https://doi.org/10.3748/wjg.14.6632)

Ramamurthy, M.S., Maiti, B., Thomas, P., Nair, P.M. (1992). High performance liquid chromatography determination of phenolic acids in potato tubers (*Solanum tuberosum*) during wound healing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(4), 569-572. DOI: 10.1021/jf00016a007

Rasheed, S. & Rigas, B. (2008). Screening for colorectal cancer: does it all start with aberrant crypt foci?. *Gastrointestinal endoscopy*, 67(7), 1103-1105. doi:[10.1016/j.gie.2007.10.038](https://doi.org/10.1016/j.gie.2007.10.038)

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (2002). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. DOI: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3

Reboredo-Rodríguez, P. (2018). Potential roles of berries in the prevention of cancer progression. *Journal of Berry Research*, 8(4), 307-323.

DOI: <https://doi.org/10.3233/JBR-180366>

Reddy, M.K., Alexander-Lindo, R.L., Nair, M.G. (2005). Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9268-9273.

DOI: [10.1021/jf051399j](https://doi.org/10.1021/jf051399j)

Redson, M. (2001). Carcinogenesis in the GI tract: From morphology to genetics and back again. *Modern Pathology*, 14(3), 236-245. doi: 10.1038/modpathol.3880292.

Reynoso, R.C., Giner, T.V., González de Mejía, E. (1999). Safety of a filtrate of fermented garambullo fruit: biotransformation and toxicity studies. *Food and chemical toxicology*, 37(8), 825-830. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00070-8](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00070-8) .

Rodrigues, C.A., Nicácio, A.E., Boeing, J.S., Garcia, F.P., Nakamura, C.V., Visentainer, J.V., Maldaner, L. (2020). Rapid extraction method followed by a d-SPE clean-up step for determination of phenolic composition and antioxidant and antiproliferative activities from berry fruits, *Food Chemistry* 309(1), 125694. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125694>

Rodríguez-González, S., Pérez-Ramírez, I.F., Castaño-Tostado, E., Amaya-Llano, S., Rodríguez-García, M.E., Reynoso-Camacho, R. (2018). Improvement of physicochemical properties and phenolic compounds bioavailability by concentrating

dietary fiber of peach (*Prunus persica*) juice by-product. *Journal of the science of food and agriculture*, 98(8), 3109-3118. DOI: [10.1002/jsfa.8812](https://doi.org/10.1002/jsfa.8812)

Roumeliotis, S., Roumeliotis, A., Dounousi, E., Eleftheriadis, T., Liakopoulos, V. (2019). Dietary Antioxidant Supplements and Uric Acid in Chronic Kidney Disease: A review. *Nutrients*, 11(8), 1911. DOI: [10.3390/nu11081911](https://doi.org/10.3390/nu11081911) .

Salvo-Romero, E., Alonso-Cotner, C., Pardo-Camacho, C., Casado-Bedmar, M., Vicario, M. (2015). Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 107(11), 686-696. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S11300108201500110000

Saed, G., Diamond, M.P., Fletcher, N.M. (2017). Updates of the role of oxidative stress in the pathogenesis of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 145(3), 595-602. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.02.033>

Salehi, E., Emam-Djomeh, Z., Askari, G., Fathi, M. (2019). *Opuntia ficus indica* fruit gum: Extraction, characterization, antioxidant activity and functional properties. *Carbohydrate polymers*. 206(1), 565-572. DOI: [10.1016/j.carbpol.2018.11.035](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.035)

Sanabria, M.C., Umaña, A., Serrano, M.L., Sánchez, M., Mesa, J., Hernández, G.A. (2012). Vías de carcinogénesis colorrectal y sus implicaciones clínicas. *Revista Colombiana de Cancerología*, 16(3),170-181. <https://doi.org/10.35509/issn.0123-9015>

Sánchez-Tena, S., Lizarraga, D., Miranda, A., Vinardell, M.P., García-García Francisco, Dopazo, J., Torres, J.L., Saura-Calixto, F., Capellá, G., Cascante, M. (2013). Grape anti-oxidant dietary fiber inhibits intestinal polyposis in ApcMin/p mice: relation to cell cycle and immune response. *Carcinogenesis*, 34(8), 1881-1888. DOI: [10.1093/carcin/bgt140](https://doi.org/10.1093/carcin/bgt140) .

Saura-Calixto, F. (2012). Concept and health-related properties of non-extractable polyphenols: the missing dietary polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(45), 11195-11200. DOI: [10.1021/jf303758j](https://doi.org/10.1021/jf303758j) .

Saura-Calixto, F. & Pérez-Jiménez, J. (2018). Non-extractable polyphenols and carotenoids: importance in human nutrition and health. The royal society of Chemistry. Food chemistry, function and analysis. DOI:<https://doi.org/10.1039/9781788013208>

Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.006>

Schoen, R.E., Mutch, M., Ral, C., Dry, M., Seligson, D., Umar, A., Pinsky, P. (2008). The natural history of aberrant crypt foci. *Gastrointestinal Endoscopy*, 67(7), 1097-1102. doi: [10.1016/j.gie.2007.08.048](https://doi.org/10.1016/j.gie.2007.08.048)

Secme, M., Mutlu, D., Elmas, L., Arslan, S. (2023). Assessing effects of caffeic acid on cytotoxicity, apoptosis, invasion, GST enzyme activity, oxidant, antioxidant status and micro-RNA expressions in HCT116 colorectal cancer cells. *South African Journal of Botany*, 157(1), 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.03.046>

Serra, A., Macià, A., Romero, M.P., Reguant, J., Ortega, N., Motilva, M.J. (2012). Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chemistry*, 130(2), 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.055>

Serra, A.T., Poejo, J., Matías, A.A., Bronze, M.R., Duarte, C.M.M. (2013). Evaluation of *Opuntia* spp. Derived products as antiproliferative agents in human colon cancer

cell line (HT29). *Food Research International*, 54(1), 892-901.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.043>.

Sidorova, J.M. & Breeden, L.L. (2003). Precocious G1/S transitions and genomic instability: the origin connection. *Mutation Research*, 532(1), 5-19.
doi:[10.1016/j.mrfmmm.2003.08.006](https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.08.006)

Singh, B.N., Shankar, S., Srivastava, R. (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*, 82(12), 1807–1821.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.093>.

Singh, R., Letai, A., Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of Bcl-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 175-193. DOI: [10.1038/s41580-018-0089-8](https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8)

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* 299(1), 152-179.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

Sivaprakasam, S., Prasad, P.D., Singh, N. (2016). Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacology & Therapeutics*, 164(1), 144-151. DOI: [10.1016/j.pharmthera.2016.04.007](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.007)

Skar, V., Skar, A.G., Strømme, J.H. (1988). Beta-glucuronidase activity related to bacterial growth in common bile duct bile in gallstone patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 23(1), 83–90. <https://doi.org/10.3109/00365528809093853>

Slattery, M.L., Curtin, K.P., Edwards, S.L., Schaffer, D.M. (2004). Plant foods, fiber, and rectal cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(2), 274–281.

[doi:10.1093/ajcn/79.2.274](https://doi.org/10.1093/ajcn/79.2.274)

Sohn, O.S., Ishizaki, H., Yang, C.S., Fiala, E.S. (1991). Metabolism of azoxymethane, methylazoxymethanol and N-nitrosodimethylamine by cytochrome P450IIE1. *Carcinogenesis*, 12(1):127-131. DOI: [10.1093/carcin/12.1.127](https://doi.org/10.1093/carcin/12.1.127)

Soret, R., Chevalier, J., De Coppet, P., Poupeau, G., Derkinderen, P., Segain, J.P., Neunlist, M. (2010). Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats. *Gastroenterology*, 13(5), 1772–1782.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.053>

Sprague-Dawley® growth chart. 2015. <https://www.taconic.com/products/mouse-rat/standard-strains-and-stocks/sprague-dawley#tabsmobiledropdown-46a3213b35-item-ca950a49a1-tab>

Sreekanth, D., Arunasree, M.K., Roy, K.R., Reddy, C.T, Reddy, G.V., Reddanna, P.R. (2007). Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of opuntia ficus-indica induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line K562. *Phytomedicine*, 14(11), 739-746. DOI: [10.1016/j.phymed.2007.03.017](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.03.017).

Stewart, B.W. & Wild, C.P. (2014). World cancer report. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization.

<https://www.drugsandalcohol.ie/28525/1/world%20cancer%20report.pdf>

Sze, M.A., Topçuoğlu, B.D., Lesniak, N.A., Ruffin VI, M.T., Schloss, P.D. (2019). Fecal short-chain fatty acids are not predictive of colonic tumor status and cannot be predicted based on bacterial community structure. *mBio*, 10(4), e01454-19. Doi: 10.1128/mBio.01454-19.

Takahashi, M., Mutoh, M., Kawamori, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (2000). Altered expression of β -catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(7), 1319–1327. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.5.319>

Takahashi, M., Nakatsugi, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (2000). Frequent mutations of the β -catenin gene in mouse tumors induced by azoxymethane. *Carcinogenesis*, 21(6), 1117 – 1120. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.6.1117>

Takahashi, M. & Wakabayashi, K. (2004). Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Science*, 95(6), 475-480. DOI: [10.1111/j.1349-7006.2004.tb03235.x](https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03235.x)

Sohn, O.S., Ishizaki, H., Yang, C.S., Fiala, E.S. (1991). Metabolism of azoxymethane, methylazoxymethanol and N-nitrosodimethylamine by cytochrome P450IIE1. *Carcinogenesis*, 12(1), 127-131. DOI: [10.1093/carcin/12.1.127](https://doi.org/10.1093/carcin/12.1.127)

Takayama, T., Katsuki, S., Takahashi, Y., Ohi, M., Nojiri, S., Sakamaki, S., Kato, J., Kogawa, K., Miyake, H., Niitsu. (1998). Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *The New England Journal of Medicine*, 339(18), 1277-1284. [doi:10.1056/NEJM199810293391803](https://doi.org/10.1056/NEJM199810293391803)

Tanikawa, C., Zhang, Y., Yamamoto, R., Tsuda, Y., Tanaka, M., Funauchi, Y., Mori, J., Imoto, S., Yamaguchi, R., Nakamura, Y., Miyano, S., Nakagawa, H., Matsuda, K. (2017) The transcriptional landscape of p53 signalling Pathway. *EBioMedicine*, 20(1), 109-119. DOI: [10.1016/j.ebiom.2017.05.017](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.05.017)

Terasawa, M., Shinohara, A., Shinohara, M. (2014). Canonical non-homologous end joining in mitosis induces genome instability and is suppressed by M-phase-specific phosphorylation of XRCC4. *PLoS Genetics*, 10(8), 1004563.

DOI: [10.1371/journal.pgen.1004563](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004563)

Tezerji, S., Nazari, F., Abdolazimi, H., Falla, A., Talaei, B. (2022). Quercetin's effects on colon cancer cells apoptosis and proliferation in a rat model of disease. *Clinical nutrition ESPEN*, 48(1), 441-445 <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2022.01.004>

Thaker, A.I., Shaker, A., Rao, M.S., Ciorba, M.A. (2012). Modeling Colitis-Associated Cancer with Azoxymethane (AOM) and Dextran Sulfate Sodium (DSS). *Journal of visualized Experiments*, 67(1), 4100. DOI: [10.3791/4100](https://doi.org/10.3791/4100) .

Thomas, F., Hehemann, J., Rebuffet, E., Czjzek, M., Michel, G. (2011). Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. *Frontiers in Microbiology*, 2(93), 1-16. DOI: [10.3389/fmicb.2011.00093](https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093)

Thangaraju, M., Carswell, K. N., Prasad, D.P., Ganapathy, V. (2009). Colon cancer cells maintain low levels of pyruvate to avoid cell death caused by inhibition of HDAC1/HDAC3. *Biochemistry*, 417(1), 379–389. DOI: [10.1042/BJ20081132](https://doi.org/10.1042/BJ20081132)

Thangaraju, M., Cresci, G., Itagaki, S., Mellinger, J., Browning, D. D., Berger, F. G., Ganapathy, V. (2008). Sodium-coupled transport of the short chain fatty acid butyrate by SLC5A8 and its relevance to colon cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 12(10), 1773–1781. DOI: [10.1007/s11605-008-0573-0](https://doi.org/10.1007/s11605-008-0573-0)

Topping, D., L. & Lockett, T.J. (2016). Human physiology and health: dietary fiber, short-chain fatty acids, and their impact on gut physiology. *Food Science*, 1(1), 1-2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21016-0>

Tournigand, C. & Carbonnel, F. (2004). Cáncer de colon. *EMC-Tratado de Medicina*, 8 (3), 1-5 . [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(04\)70304-9](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(04)70304-9)

Venkatachalam, K., Vinayagam, R, Vijaya-Anad, M.A., Mat-Isa, N., Ponnaiyan, R. (2020). Biochemical and molecular aspects of 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis: a review. *Toxicology Research*, 9(1), 2–18. Doi 10.1093/toxres/tfaa004

Vollmannová, A., Bojnanská, T., Musilová, J., Lidiková, J., Cifrová, M. (2024). Quercetin as one of the most abundant represented biological valuable plant components with chemoprotective valuable plant components with remarkable chemoprotective effects- A review. *Heliyon*, 10(12), 333-342. Doi:10.4103/0973-7847.194044

Wakida, T., Ikurra, M., Kuriya, K., Ito, S., Shiroiwa, Y., Habu, T., Kawamoto, T., Okumura, K., Ikura, T., Furuya, K. (2017). The CDK-PLK1 axis targets the DNA damage checkpoint sensor protein RAD9 to promote cell proliferation and tolerance to genotoxic stress. *Elife* 6, 19(6), 250-264. Doi: 10.7554/eLife.29953

Wang, M., Wichienchot, S., He, X., Fu, X., Huang, Q., Zhang, B. (2019). In vitro colonic fermentation of dietary fibers: Fermentation rate, short-chain fatty acid production and changes in microbiota. *Trends in Food Science & Technology*, 88(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.005>.

Wargovich, M.J., Brown, V.R., Morris, J. (2010). Focos de cripta aberrantes: el caso de la inclusión como biomarcador del cáncer de colon. *Cánceres*, 2 (3), 1705-1716. <https://doi.org/10.3390/cancers2031705>

Warren, C.A., Paulhill, K.J., Davidson, L.A., Lupton, J.R., Taddeo, S.S., Hong, M.Y., Carroll, R.J., Chapkin, R.S., Turner, N.D. (2009). Quercetin may suppress rat

aberrant crypt foci formation by suppressing inflammatory mediators that influence proliferation and apoptosis. *The Journal of Nutrition*, 139(1), 101-105. Doi: 10.3945/jn.108.096271

Wijnands, M., Schoterman, H.C., Bruijntjes, J.B., Hollanders, V.M., Woutersen, R.A. (2001). Effect of dietary galacto-oligosaccharides on azoxymethane induced aberrant crypt foci and colorectal cancer in Fisher 244 rats. *Carcinogenesis*, 22(1), 127-132. DOI: [10.1093/carcin/22.1.127](https://doi.org/10.1093/carcin/22.1.127)

Wu, X., Wu, Y., He, L., Wu, L., Wang, X., Liu, Z. (2018). Effects of the intestinal microbial metabolite butyrate on the development of colorectal cancer. *Journal of Cancer*, 9(14), 2510-2517. Doi: 10.7150/jca.25324.

Xiao, B. (2017). Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: which show better biological significance? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9), 1874–1905. Doi: 10.1080/10408398.2015.1032400

Xu, S., Liu, C. X., Xu, W., Huang, L., Zhao, J. Y., Zhao, S. M. (2017). Butyrate induces apoptosis by activating PDC and inhibiting complex I through SIRT3 inactivation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1), 16035. Doi: 10.1038/sigtrans.2016.35

Xu, Y., Zhu, Y., Li, X., Sun, B. (2020). Dynamic balancing of intestinal short-chain fatty acids: The crucial role of bacterial metabolism. *Trends in Food Science & Technology*, 100(1), 118-130. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.026>.

Yao, G. (2017). Modelling mammalian cellular quiescence. *Interfase Focus Journals*, 4(3), 20130074. DOI: [10.1098/rsfs.2013.0074](https://doi.org/10.1098/rsfs.2013.0074)

Yang, H.W., Chung, M., Kudo, T., Meyer, T. (2017). Competing memories of mitogen and p53 signalling control cell-cycle entry. *Nature*, 549(1), 404-408. <https://www.nature.com/articles/nature23880>

Lin, Y., Huang, G., Zhang, Q., Wang, Y., Dia, V.P., Meng, X. (2020). Ripening affects the physicochemical properties, phytochemicals and antioxidant capacities of two blueberry cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 162(1), 111097. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.111097>.

Yang, Y., Yang, J., Tao, H., Jin, W. (2014). New perspectives on B-catenin control of cell fate and proliferation in colon cancer. *Food and Chemical Toxicology*, 74(1), 14-19. Doi: 10.1016/j.fct.2014.08.013 .

Ye, X., Chen, J., Liu, D., Jiang, P., Shi, J., Xue, S., Wu, D., Xu, J., Kakuda, Y. (2011). Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. *Food Chemistry*, 124(4), 1561-1566. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.013>

Yin, H., Xu, L., Porter, N.A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis, *Chemical Reviews*, 111(10) 5944 - 5972. Doi: 10.1021/cr200084z

Zamorano-Ponce, E., Lagos-Muñoz, P., Rivera-Caamaño, P., Fernández-Romero, J. (2008). Un modelo experimental inducible en ratón para conducir estudios en quimiprevención y anticarcinogénesis. *Theoria*, 17(1) 71-86. <https://www.ubiobio.cl/theoria/v/v17-1/7.pdf>

Zelenka, J., Koncošová, M., Ruml, T. (2018). Targeting of stress response pathways in the prevention and treatment of cancer. *Biotechnology advances*, 36(3), 583-602. Doi:10.1016/j.biotechadv.2018.01.007.

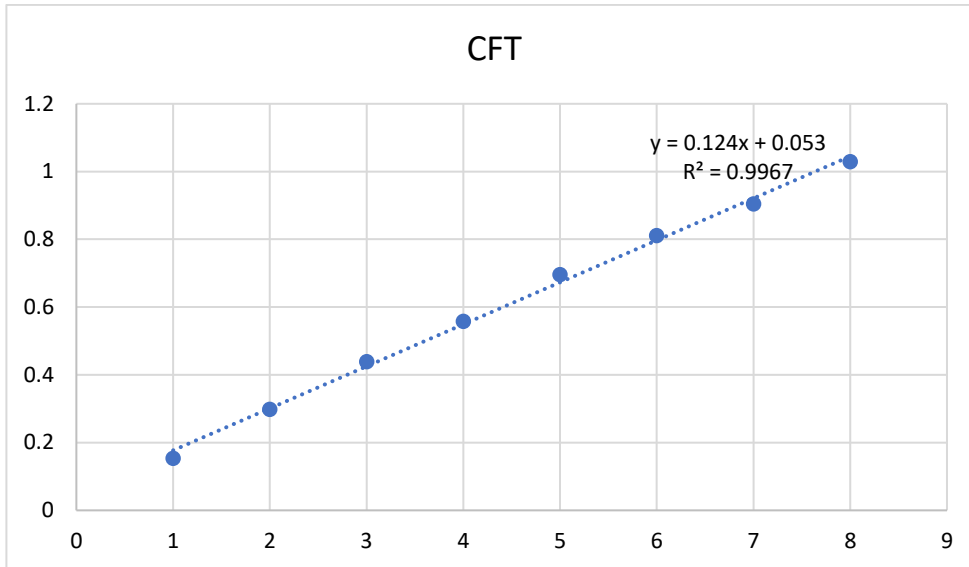
Zhang, J., Lacroix, C., Wortmann, E., Ruscheweyh, H., Sunagawa S, Sturla S, Schwab C. (2019). Gut microbial beta-glucuronidase and glycerol/diol dehydratase activity contribute to dietary heterocyclic amine biotransformation. *BMC Microbiology*, 19(1) 99, DOI:10.1186/s12866-019-1483-x

Zhao, L., Zhang, F., Ding, X., Wu, G., Lam, Y.Y., Wang, X., Fu, H., Xue, X., Lu, C., Ma, J., Xu, C., Ren, Z., Xu, Y., Xu, S., Shen, H., Zhu,X., Shi, Y., Shen, Q., Dong, W... Zhang, C. (2018). Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science*, 359(6380), 1151-1156. DOI: [10.1126/science.aao5774](https://doi.org/10.1126/science.aao5774)

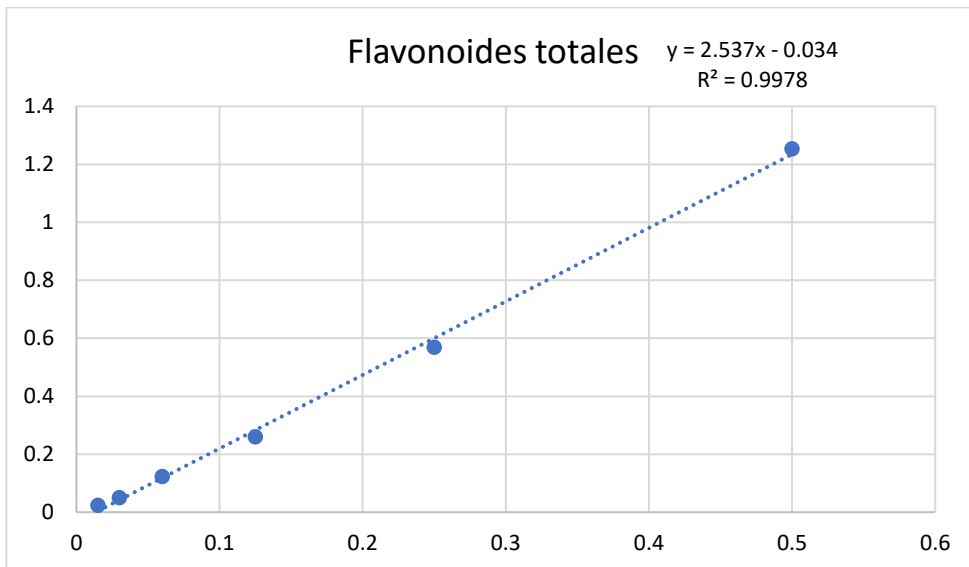
Zielinski, G., Devries, J., Shaw-Craig, S.A, Bridges, R. (2013). Dietary fiber methods in Codex Alimentarius: Current Status and Ongoing Discussions. *Cereal Foods World* 58(3), 148-152. DOI: 10.1002/mnfr.20090058

11 ANEXOS

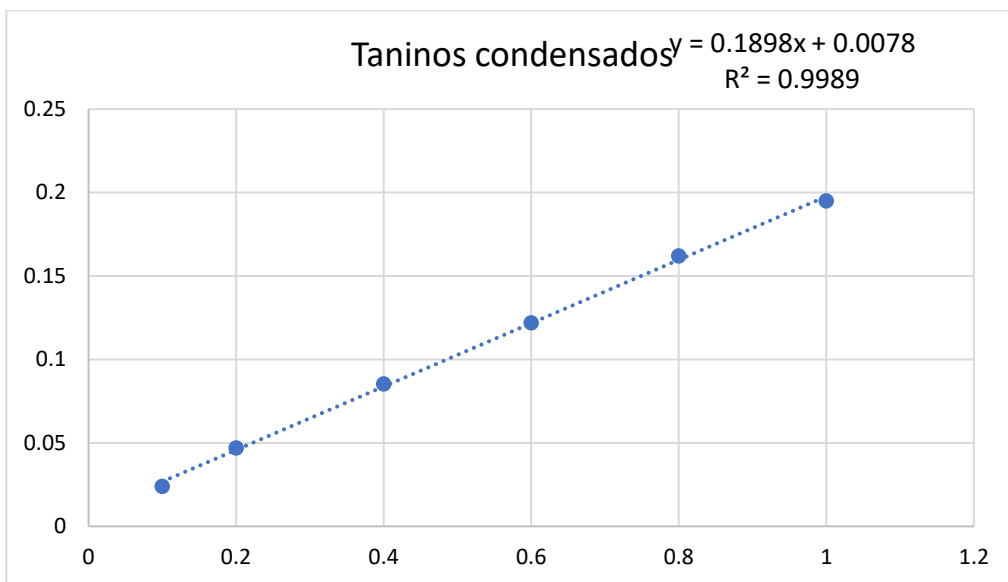
Anexo 1 Curva de equivalentes de ácido gálico, para determinación de compuestos fenólicos totales



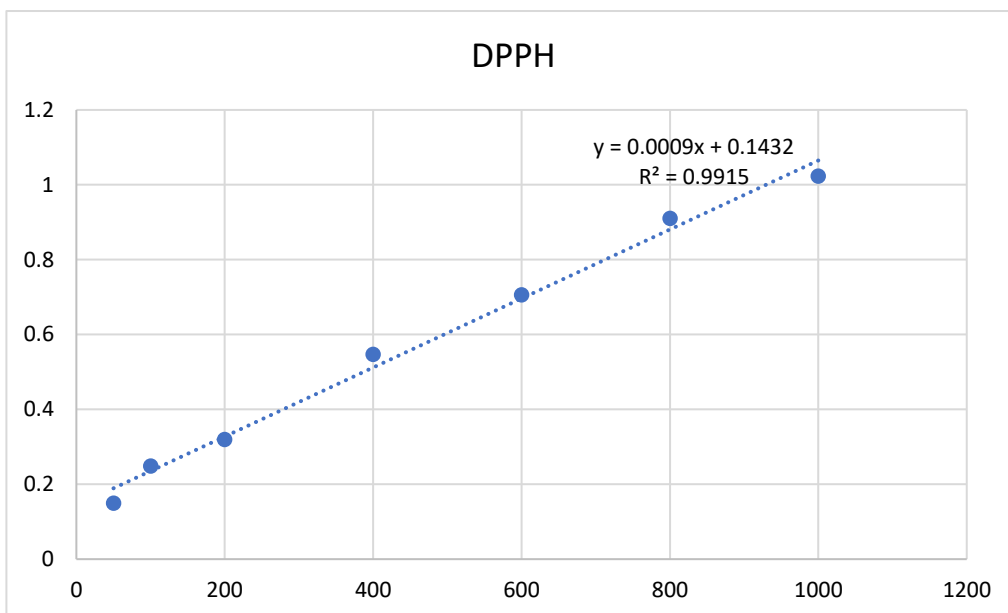
Anexo 2. Curva de equivalentes de catequina, para determinación de flavonoides totales



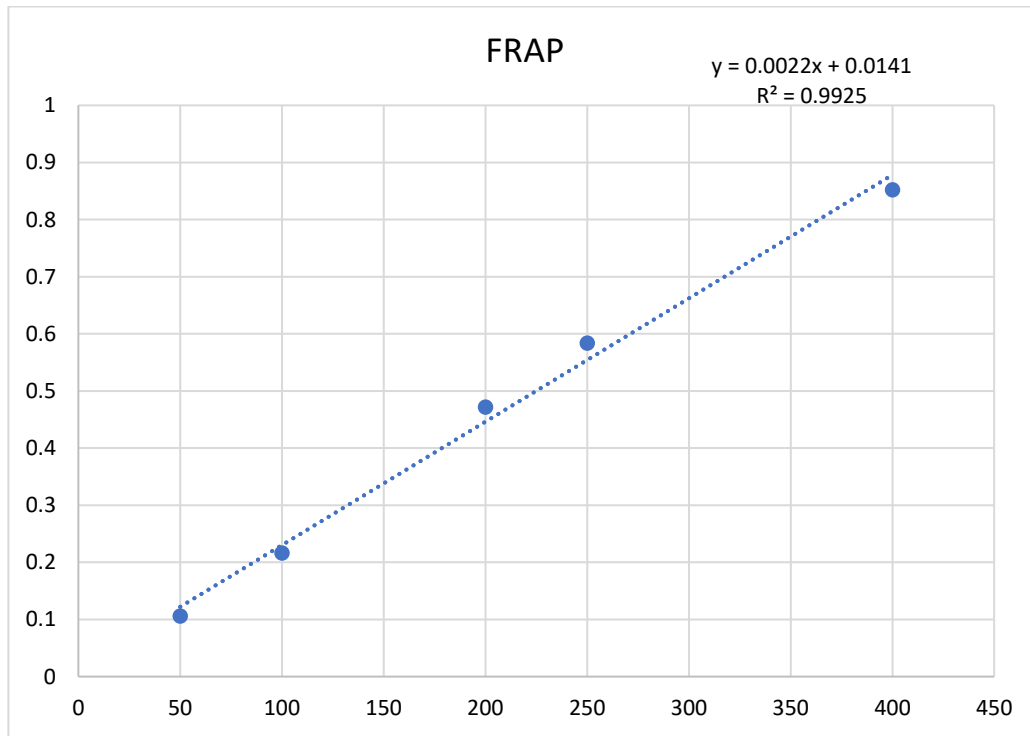
Anexo 3. Curva de equivalentes de catequina, para determinación de taninos condensados



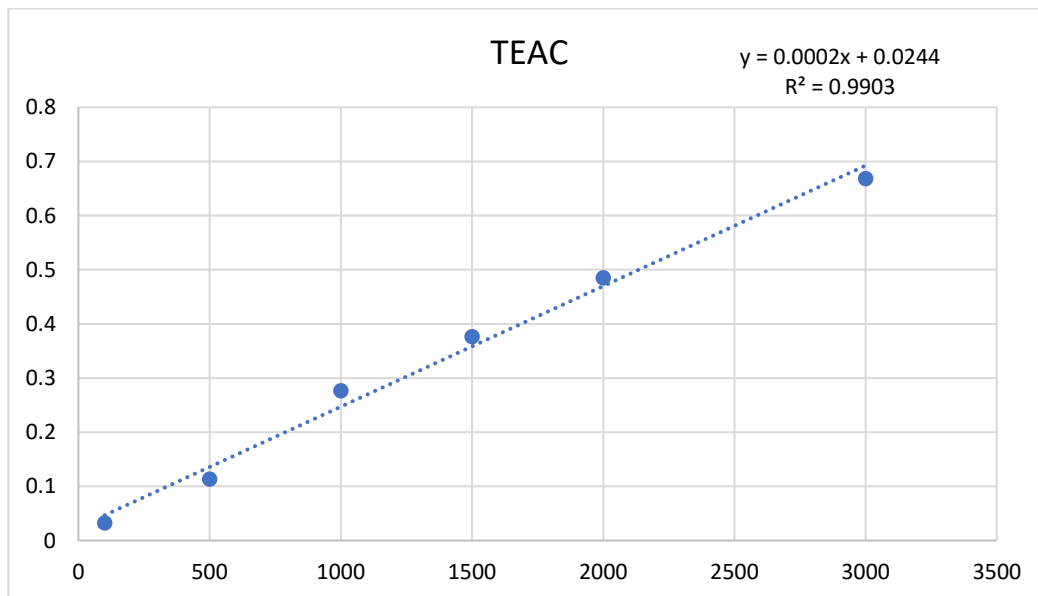
Anexo 4. Curva de equivalentes de trólox, para método DPPH



Anexo 5. Curva de equivalentes de trólox, para método FRAP



Anexo 6. Curva de equivalentes de trolox, para método TEAC



Anexo 7. Curva de equivalentes de trólox, para método ORAC

