

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

*Germinado de avena: una alternativa nutracéutica para la
prevención de cáncer de colon*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta:

I.A. MARGARITA DAMAZO LIMA

Dirigida por:

DRA. MINERVA RAMOS GÓMEZ

Querétaro, Qro. a noviembre de 2019.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

*Germinado de avena: una alternativa nutracéutica para la
prevención de cáncer de colon*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

I.A. Margarita Damazo Lima

Dirigida por:

Dra. Minerva Ramos Gómez

Dra. Minerva Ramos Gómez

Presidente

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Secretario

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez

Vocal

Dr. Eduardo Castaño Tostado

Suplente

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre 2019
México

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de este proyecto de investigación.

A mi directora de tesis, Dra. Minerva Ramos Gómez, por confiar en mí y ayudarme a crecer como persona y profesionista, por compartir conmigo sus conocimientos, experiencia y tiempo, así como; por sus consejos.

A mis sinodales: Dra. Rosalía Reynoso Camacho, Dr. Eduardo Castaño Tostado, Dra. Iza F. Pérez Ramírez, Dr. Gerardo M. Nava Morales, quienes aportaron su conocimiento y experiencia para mejorar este proyecto de investigación y mi desempeño académico.

A Carmelita Campos, por su excelente trato humano, por siempre apoyarme con todas mis dudas y necesidades, por sus consejos y palabras de motivación en momentos difíciles.

A mis compañeros y excompañeros del laboratorio: Nancy, Lau, Yunnuen, Josué, Beto, Delia, Itzel y Lupita, con quienes, sin duda, compartí grandes pláticas y momentos de distracción en el quehacer diario del laboratorio. De manera muy especial, quiero agradecer a Nancy, Delia e Itzel por apoyarme y alentarme durante las diferentes etapas de este proyecto.

A Alex, el mejor amigo que tuve durante esta etapa, quien, no sólo me demostró su apoyo incondicional, sino que también; con su ejemplo, esfuerzo, dedicación y trabajo constante me motivó a dar lo mejor de mí. Todo mi agradecimiento y admiración para él.

A Fer, por ser la amiga más sincera, directa y divertida que me deja la maestría, y con quien compartí grandes momentos y diversas emociones: risas y carcajadas, lágrimas, desvelos, estrés y nervios. Gracias por siempre estar ahí.

A mi hermosa familia: a mi mamá, Cristy; y a mis hermanos, Maci y Jesús, quienes, sin saberlo, se convirtieron en mi motor para seguir avanzando y no rendirme ante las dificultades. A mi mamá Lala, por siempre estar al pendiente de mí y por ser mi ejemplo de lucha, espiritualidad y empoderamiento. A mi papá, Sergio; y a mi tía, Gema, que siempre me mostraron su empatía, preocupación y afecto durante esta etapa formativa. Hoy, este logro, también es suyo.

A Omar, por alentarme a creer en mí misma y motivarme a estudiar esta maestría, por apoyar cada una de mis decisiones, por sus locuras y ocurrencias que me mantuvieron alegre y positiva, por su cariño y afecto.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Cáncer de colon	3
2.1.1 Epidemiología del cáncer colorrectal (CCR)	4
2.1.2 Factores de riesgo asociados a CCR	4
2.1.2.1 Inflamación intestinal	4
2.1.3 Metabolismo microbiano en el colon	5
2.1.4 Modelo murino azoximetano/dextrano sulfato sódico (AOM/DSS) para el estudio de la carcinogénesis en colon	6
2.1.5 Estrés oxidativo y CCR	9
2.2 Avena	12
2.2.1 Producción de avena en México	12
2.2.2 Fibra de la semilla de avena	14
2.2.3 Polifenoles de la semilla de avena	15
III. OBJETIVOS	21
Objetivo general:	21
Objetivos específicos:	21
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1 Materiales	22
4.1.1 Químicos	22
4.1.2 Biológicos	22
4.2 Métodos	23
4.2.1 Preparación del extracto fenólico alto en AVAs	23
4.2.2 Cuantificación de compuestos fenólicos por UPLC-PDA	24

4.2.3 Modelo animal de CCR	24
4.2.4 Análisis macroscópico de las lesiones colónicas	28
4.2.5 Análisis histopatológico.....	29
4.2.6 Análisis de pH	30
4.2.7 Determinación de la actividad de la enzima β -glucuronidasa (β -GA).....	30
4.2.8 Determinación de los sistemas de defensa antioxidante	30
4.2.9 Análisis estadístico	34
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	35
5.1 Cuantificación de compuestos fenólicos por UPLC-PDA.....	35
5.2 Efecto quimioprotector de germinado de avena y su extracto fenólico sobre el desarrollo de cáncer de colon	37
5.2.1 Ganancia de peso y supervivencia	37
5.2.2 Evaluación macroscópica del colon en ratones con cáncer de colon	39
5.2.3 Evaluación histopatológica del colon de ratones inducidos con AOM/DSS y tratados con germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVAs	44
5.2.4 Efecto del germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVAs sobre el pH en el contenido cecal, colónico y fecal	47
5.2.5 Efecto del germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVA sobre la actividad de β -glucuronidasa (β -GA) en el contenido cecal, colónico y fecal.....	49
5.2.6 Efecto del germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVAs sobre la concentración de glutatión reducido (GSH) en eritrocitos	52
5.2.7 Efecto del germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVA sobre la actividad de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado	54
5.2.8 Efecto del germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVAs sobre la actividad de glutatión-S-transferasa (GST) en colon	56
5.2.9 Efecto del germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVA sobre la actividad de quinona óxidorreductasa (NQO1) en hígado	58
5.2.10 Efecto del germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVAs sobre la actividad de quinona óxidorreductasa (NQO1) en colon.....	59
VI. CONCLUSIONES.....	63
VII. REFERENCIAS	64
VIII. ANEXOS.....	77
8.1 Estándares para la cuantificación de compuestos fenólicos libres	77
8.2 Reactivos para β -glucuronidasa.....	79
8.3 Reactivos para la cuantificación de proteína.....	79

8.4 Reactivos para la determinación de glutatión reducido (GSH).....	79
8.5 Reactivos para la preparación de homogenados citosólicos	80
8.6 Reactivos para la determinación de glutatión-S-transferasa (GST)	81
8.7 Reactivos para la determinación de quinona óxidorreductasa (NQO1)	81

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Metabolismo de activación y conjugación del AOM en hígado y colon	9
2	Volumen de la producción nacional de avena forrajera 2012-2017	12
3	Volumen de la producción nacional de avena grano 2012-2017	13
4	Estructura química de las avenantramidas (AVAs)	16
5	Diagrama de los grupos experimentales del modelo <i>in vivo</i> de CCR	26
6	Clasificación de tumores	29
7	Peso de ratones tratados con GA (30 mg/día) y AVAs (0.084 mg/día) e inducidos con AOM + DSS	39
8	Clasificación macroscópica encontrada en ratones inducidos con AOM (10 mg/kg) y promovidos con DSS (2%) al finalizar el período experimental	40
9	Corte histopatológico transversal de colon: A) Grupo sano (300x), B) Grupo control (AOM + DSS) (100x)	45
10	Corte histopatológico transversal de colon: A) Grupo AVAs (AVAs + AOM + DSS) (300x), B) Grupo GA (GA + AOM + DSS) (300x)	45
11	Efecto de los tratamientos GA (30 mg/día) y AVAs (0.084 mg/día) en la actividad de la enzima β -glucuronidasa (β -GA) en muestras de contenido cecal, colónico y fecal de ratones inducidos con AOM + DSS	51

12	Actividad enzimática de GST en hígado de ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA (30 mg/ día) y AVAs (0.084 mg/ día)	55
13	Actividad enzimática de GST en colon de ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA (30 mg/día) y AVAs (0.084 mg/día)	57
14	Actividad enzimática de NQO1 en hígado de ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA (30 mg/día) y AVAs (0.084 mg/día)	59
15	Actividad enzimática de NQO1 en colon de ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA (30 mg/día) y AVAs (0.084 mg/día)	61

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Contenido de CFT, fibra insoluble, fibra soluble, fibra total, ácido fítico y composición proximal en avena variedad Turquesa y GA (25 °C/60% HR)	19
2	Contenido de compuestos fenólicos libres presentes en el extracto fenólico de GA cuantificados mediante UPLC	36
3	Porcentaje de incidencia, número promedio y multiplicidad de placas en ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA (30 mg/día) y AVAs (0.084 mg/día).	41
4	Porcentaje de incidencia, número promedio y multiplicidad de pólipos en ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA y AVAs	42
5	Distribución por zona de placas en ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA y AVAs	43
6	Distribución por zona de pólipos en ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA y AVAs	44
7	Incidencia de adenocarcinomas encontrados en tejido colónico de ratones inducidos con AOM + DSS analizado mediante histopatología	46
8	Valores de pH en contenido cecal, colónico y muestras de heces en ratones tratados con GA y AVAs e inducidos con AOM + DSS.	49
9	Concentración de GSH en eritrocitos de ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA y AVAs	53
A1	Estándares para la cuantificación mediante UPLC-PDA de compuestos fenólicos libres presentes en el GA	77
A2	Curva de calibración de fenoltaleína	79

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es el 4° cáncer más frecuente en México y el riesgo de padecerlo se ha asociado a un bajo consumo de vegetales y cereales. Por lo tanto, el consumo de alimentos ricos en fibra y fitoquímicos puede emplearse como una estrategia altamente efectiva para prevenir y controlar el desarrollo de CCR. Aunado a lo anterior, el proceso de germinación mejora el perfil y contenido fitoquímico de algunos cereales. En este sentido, la germinación de avena (*Avena sativa* L.) ha demostrado incrementar el contenido de sus compuestos fenólicos únicos, particularmente las avenantramidas (AVAs), cuyas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias han sido evaluadas *in vitro*. Por lo anterior, nos propusimos evaluar el efecto quimioprotector de germinado de avena (GA) y su extracto fenólico alto en AVAs en un modelo animal de CCR inducido con azoximetano (AOM, 10 mg/kg, única dosis mediante inyección intraperitoneal) y dextrano sulfato sódico (DSS al 2% en el agua de beber por una semana). Se emplearon ratones macho de la cepa CD-1, los cuales se dividieron en cuatro grupos experimentales: 1) sano (n = 10, vehículo), 2) control (n = 10, AOM+DSS), 3) AVAs+AOM+DSS (n = 8, tratado con 0.084 mg/día de extracto fenólico alto en AVAs proveniente de GA), 4) GA+AOM+DSS (n = 8, tratado con 30 mg/día de GA). Los tratamientos con GA y AVAs se administraron vía intragástrica antes y después de la inyección del AOM durante 16 semanas. Al término de este periodo, se realizó el sacrificio de los animales por decapitación y se extrajeron los órganos y muestras de interés para las determinaciones posteriores. El 80% de los animales de este grupo desarrollaron pólipos y adenocarcinomas. Contrastantemente, los grupos tratados con GA y AVAs tuvieron una menor incidencia de pólipos y adenocarcinomas, lo que representa una disminución del 52.5 y 37.5% en la incidencia de adenocarcinomas ($\alpha=0.05$). El pH y la actividad de β -glucuronidasa (β -GA) fue significativamente mayor en muestras de contenido cecal, colónico y fecal del grupo control (AOM + DSS). Además, el tratamiento con GA redujo significativamente la actividad de β -GA en contenidos cecal (22%), colónico (27%) y fecal (57%) y normalizó la actividad de GST y NQO1 en colon, así como los valores de pH y el nivel de GSH en eritrocitos, lo que indica una mejora en los parámetros intestinales y en el estado redox de los animales, contribuyendo al efecto quimioprotector de la avena germinada. Este es el primer estudio *in vivo* que muestra la actividad anticancerígena de la avena germinada y su extracto AVAs en el modelo de carcinogénesis colorrectal inducida por AOM-DSS.

Palabras clave: Avena germinada, avenantramidas, cáncer colorrectal, azoximetano, dextrano sulfato sódico.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the fourth most common cancer in Mexico and it is associated with vegetable -and cereal- poor diets. Therefore, the consumption of foods rich in fiber and phytochemicals could be used as an effective strategy to prevent or control CRC. In addition, the germination process enhances the phytochemical content and profile of some cereals. In this sense, sprouted oat (*Avena sativa* L.) has shown an increased content of its unique phenolic compounds, specifically avenanthramides (AVAs), whose antioxidant and anti-inflammatory properties has been evaluated *in vitro*. Therefore, we pursued to evaluate the chemoprotective effect of sprouted oat (SO) and its rich-AVA phenolic extract (AVAs) in an azoxymethane (AOM, 10 mg/kg, intraperitoneal single dose,) and dextran sodium sulfate (DSS, 2% in drinking water for one week) CRC model. Male CD-1 mice were divided in four groups: 1) normal (n=10, vehicle), 2) control (n=10, AOM+DSS), 3) AVAs+AOM+DSS (n=8, treated with 0.084 mg of AVA-phenolic extract), 4) SO+AOM+DSS (n=8, treated with 30 mg of SO). SO and AVAs treatments were administered intragastrically before and after AOM injection for 16 weeks. Eighty percent of the animals of this group developed both tumors and adenocarcinomas. Interestingly, SO- and AVAs-treated groups showed a lower tumor and adenocarcinoma incidence, representing a decrease of 52.5 and 37.5% in the incidence of adenocarcinomas ($\alpha=0.05$). Moreover, pH and β -glucuronidase activity (β -GA) were significantly higher in caecal, colonic, and fecal samples of AOM+DSS group. In addition, SO treatment significantly reduced caecal (22%), colonic (27%), and fecal (57%) β -GA, and normalized colonic GST and NQO1 activities, as well as pH values and erythrocytes GSH level, thus indicating an improvement in intestinal parameters and in the redox state of the animals, contributing to the chemoprotective effect of sprouted oat. This is the first *in vivo* report on the anticarcinogenic activity of sprouted oat in AOM-DSS-induced colorectal carcinogenesis model.

Key words: sprouted oat, avenanthramides, colorectal cancer, azoxymethane, dextran sodium sulfate.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) ataca a 1 millón de personas cada año y es responsable de más de 500,000 muertes anuales asociadas al cáncer en todo el mundo. En México, de acuerdo con el Instituto Nacional de Salud Pública (2015), el CCR es el 4° tipo de cáncer más frecuente. El CCR presenta una serie de cambios genéticos y morfológicos en el epitelio colónico, que inician con la formación de fosas crípticas aberrantes (FCA), pólipos y adenomas hasta llegar a desarrollar adenocarcinomas.

La etiología de esta enfermedad es diversa; sin embargo, se distinguen dos causas principales que conllevan a padecerla: el 80-90% de los casos de CCR son debidos a factores ambientales como la dieta y el estilo de vida, mientras que sólo el 10-20% es debido a factores hereditarios o alteraciones genéticas. De este modo, se sabe que una dieta alta en grasas saturadas y carnes rojas procesadas junto con una baja ingesta de fibra dietética, frutas, verduras y cereales, así como un alto consumo de tabaco y alcohol, incrementan el riesgo de padecer CCR. Otro factor importante que puede desencadenar esta patología es cursar con eventos frecuentes y progresivos de estrés oxidativo e inflamación a nivel de intestino grueso.

Por su parte, la microbiota colónica está estrechamente relacionada con el riesgo de padecer CCR, ya que enzimas bacterianas como las β -glucuronidasas (β -GA) intervienen en la activación de metabolitos procarcinógenos que llegan a colon. La evidencia científica apunta a que la composición de la microbiota colónica puede modularse mediante la dieta, logrando disminuir aquellas poblaciones bacterianas con una alta actividad de β -GA, reduciendo con ello el riesgo de padecer CCR.

En la actualidad, se acepta a la quimioprevención como una estrategia altamente efectiva para bloquear, revertir o retrasar el proceso de carcinogénesis; de este modo, se han analizado un gran número de compuestos naturales provenientes de la dieta en cuanto a su capacidad para proteger contra el cáncer.

En este proyecto, se propuso evaluar avena (*Avena sativa* L.) germinada debido a que es una fuente importante de fibra dietética y compuestos fenólicos, entre los que destacan las avenantramidas (AVAs), amidas fenólicas presentes únicamente en este cereal, que han demostrado tener efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antiproliferativos tanto *in vitro* como *in vivo*.

El estudio del papel quimiopreventivo de la avena germinada sentará las bases del entendimiento acerca de los efectos que esta matriz alimentaria tiene sobre parámetros fisiológicos del tejido colónico como el pH, la actividad de β -GA y los mecanismos de defensa antioxidante, así como su efectividad para controlar el desarrollo de pólipos, adenomas y adenocarcinomas en un modelo *in vivo* de CCR.

II. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer de colon

El tracto gastrointestinal (GI), y de manera particular la barrera intestinal, juega un papel primordial en el mantenimiento de la salud de un individuo (Bruneau *et al.*, 2018; Feng *et al.*, 2018). Sin embargo, esta barrera protectora se ve afectada por la exposición a sustancias tóxicas (fármacos y xenobióticos) y por la entrada de patógenos a través de los alimentos, activando mecanismos inflamatorios y contribuyendo con un ambiente oxidativo a nivel intestinal, eventos que de continuar avanzando, conducen al cáncer (Bhattacharyya *et al.*, 2014).

El cáncer es una enfermedad genética que altera el delicado equilibrio que existe entre proliferación, apoptosis y diferenciación celular. La célula deja de ser susceptible a las señales que regulan el equilibrio entre la división y la muerte celular, comenzando a proliferar de manera autónoma, formando un tumor. Las células tumorales sufren numerosos cambios que afectan la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la adhesión, el movimiento, entre muchos otros. Estos cambios tienen lugar de modo progresivo y se acompañan de un creciente número de alteraciones genéticas que les proporcionan ventajas evolutivas y permiten su diseminación en el organismo y su resistencia frente a fármacos y condiciones adversas (Calvo, 2015).

El cáncer colorrectal (CCR) se desarrolla de una manera gradual comenzando con una proliferación celular autónoma, seguida de la formación de FCA que conducen al desarrollo de pólipos adenomatosos, los cuales se consideran precursores del CCR (Dulal & Keku, 2014). Los pólipos colónicos se clasifican principalmente en función de sus propiedades para progresar a malignidad (hiperplásica o adenomatosa). Otra forma de clasificarlos es con base en su estructura (sésiles, pedunculados y planos), su forma (tubular, vellosa, serrada), y/o su tamaño

(pequeño 1-5 mm, medio 5-10 mm y grande ≥ 10 mm). El subconjunto de pólipos hiperplásicos serrados se asocia con un mayor riesgo de CCR. Sin embargo, los pólipos adenomatosos o adenomas representan aproximadamente el 70% de los pólipos en el colon y tienen el potencial de progresar a CCR con el tiempo si no se seleccionan y extirpan (Dulal & Keku, 2014).

2.1.1 Epidemiología del cáncer colorrectal (CCR)

El CCR ataca a 1 millón de personas cada año y es responsable de más de 500,000 muertes anuales asociadas al cáncer en todo el mundo (Kasdagly *et al.*, 2014). De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud Pública (2015), el CCR es el 4° tipo de cáncer más frecuente en México. Si bien, la mortalidad se debe principalmente a la metástasis de la enfermedad, detectarla a tiempo y, sobre todo, implementar estrategias preventivas contra el desarrollo de esta patología resultan de vital importancia.

2.1.2 Factores de riesgo asociados a CCR

La evidencia acumulada sugiere que existen numerosos factores de riesgo asociados al CCR entre los que destacan: a) alteraciones genéticas, como la activación de oncogenes (*KRAS* y β -catenina) o la inactivación de genes supresores de tumores (*APC* y *p53*); b) desarrollo de pólipos en el colon; c) edad avanzada (mayor de 50 años); d) antecedentes familiares de CCR; e) colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal y/o enfermedad de Crohn; f) factores del estilo de vida (tabaquismo, alcoholismo, sedentarismo); g) dieta (rica en grasas saturadas y carnes rojas: dieta occidental); entre otros (Kasdagly *et al.*, 2014; Instituto Nacional de Salud Pública, 2015).

2.1.2.1 Inflamación intestinal

La inflamación es un sistema de autodefensa del cuerpo que se clasifica como un tipo de inmunidad innata en la que participan principalmente macrófagos y neutrófilos (Ren *et al.*, 2009). La investigación ha puesto de relieve las funciones

fisiopatológicas de los macrófagos en respuesta a diversas enfermedades inflamatorias y los numerosos mecanismos moleculares por los cuales los macrófagos modulan las respuestas inflamatorias (Tsan & Gao, 2004). La secreción de quimiocinas, citocinas [factor de necrosis tumoral (TNF- α)], mediadores inflamatorios (inmunoglobulina), óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (EROs) y factores de coagulación, entre otros, estimulan el tráfico de leucocitos y la quimiotaxis, fagocitosis y eliminación de bacterias y virus. Todos estos son eventos representativos que ocurren en la respuesta inflamatoria (Sun *et al.*, 2005).

La enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) son dos formas principales de enfermedad inflamatoria intestinal crónica (EII). Ocurren en el tracto GI presentando inflamación de la mucosa causada por la infiltración de leucocitos del hospedero (neutrófilos, macrófagos y células “killer” naturales). Estas dos afecciones se asocian con síntomas de sangrado rectal, diarrea y pérdida de peso corporal. Las principales manifestaciones clínicas son dolor abdominal, mucosa en las heces, heces con sangre y purulentas, episodios recurrentes y recaídas (Velayos & Sandborn, 2007). El número de pacientes que padecen EII ha aumentado dramáticamente y la enfermedad puede provocar problemas graves de salud como CCR; así, el riesgo de desarrollar cáncer en estos pacientes es de un 5% tras 20 años de enfermedad y de un 12% tras 25 años (Vilela *et al.*, 2012).

2.1.3 Metabolismo microbiano en el colon

El término “microbiota intestinal” generalmente se refiere a la comunidad microbiana diversa (bacterias, hongos, arqueas, virus y protozoos) que coloniza el tracto GI de su huésped (Shukla *et al.*, 2017).

Bruneau y colaboradores (2018) reconocen a la microbiota como un “órgano oculto”, por sus funciones digestivas, metabólicas e inmunes beneficiosas para su huésped. A pesar de que cada individuo tiene una composición específica de microorganismos, éstos realizan las mismas funciones en todos los seres humanos. Ejemplo de estas funciones son: a) protección contra patógenos (efecto “barrera”);

b) síntesis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC); c) maduración del tubo digestivo (mantenimiento de la mucosa intestinal, producción de moco, actividad enzimática de la mucosa); d) implicaciones en fenómenos inflamatorios; entre muchas otras.

Destacada mención merece una de las principales funciones de la microbiota intestinal, su capacidad para metabolizar componentes de la dieta y generar un amplio rango de metabolitos. Varios de estos metabolitos derivados de microorganismos aportan beneficios a la salud humana (Saha *et al.*, 2016). Sin embargo, algunos otros metabolitos bacterianos intervienen en la promoción de células cancerosas, esto principalmente como consecuencia de la actividad de enzimas bacterianas, entre las que se encuentran las β -glucuronidasas (β -GA). Las β -GA hidrolizan compuestos conjugados de glucurónido, que ya se habían inactivado en hígado, pero que al llegar a colon vuelven a activarse por la acción de estas enzimas, permitiendo la liberación de metabolitos procarcinogénicos activos al lumen intestinal, aumentando el riesgo de mutaciones en las células colónicas, con la posterior formación de tumores en el intestino grueso (Fiala, 1977; Perše & Cerar, 2010).

2.1.4 Modelo murino azoximetano/dextrano sulfato sódico (AOM/DSS) para el estudio de la carcinogénesis en colon

Un gran número de experimentos han demostrado la relevancia del modelo murino AOM/DSS en el estudio de los mecanismos de la carcinogénesis humana en colon, debido a los efectos sinérgicos del azoximetano (AOM, agente inductor de tumores) y del dextrano sulfato sódico (DSS, agente promotor de tumores). El modelo AOM/DSS reproduce la carcinogénesis colorrectal promovida por una fase inicial de inflamación aguda, mostrando un periodo de latencia más corto que los modelos basados en la administración única de AOM (Meira *et al.*, 2008).

Como es descrito por Tanaka (2009), el modelo AOM/DSS se basa en una única inyección intraperitoneal de AOM (10 mg/kg de peso corporal) y un sólo ciclo del

agente inflamatorio DSS (2%) en el agua de beber. Con este protocolo hay un rápido desarrollo de múltiples tumores en diversas cepas de ratones, entre ellas la cepa exogámica CD1, en aproximadamente 12 semanas. El DSS disuelto en agua es tóxico para el revestimiento epitelial del colon y produce colitis severa, que se caracteriza por la pérdida de peso corporal y diarrea sanguinolenta en las primeras semanas después del consumo de DSS; sin embargo, estos fenómenos disminuyen significativamente después de 5 semanas desde el comienzo del tratamiento AOM/DSS.

El desarrollo del cáncer en este modelo refleja el patrón observado en los humanos. Los tumores inducidos en ratones expuestos al tratamiento con AOM/DSS recapitulan con precisión la patogénesis observada en el CCR humano. Por ejemplo, los tumores son muy frecuentes en la parte distal del colon, que también es la ubicación predominante de CCR espontáneo en el hombre. A menudo, estas lesiones comienzan con un crecimiento polipoide y exhiben con frecuencia características histopatológicas similares al CCR humano. Sin embargo, los tumores inducidos por AOM a menudo carecen de invasividad en la mucosa (Boivin *et al.*, 2003).

Los modelos con 1,2-dimetilhidrazina (DMH) y su metabolito AOM se han utilizado ampliamente para estudiar el papel de la dieta o algún fitoquímico en la etiología del CCR, debido a que varios marcadores histopatológicos y moleculares que se utilizan para el seguimiento del proceso carcinogénico en los modelos inducidos con DMH/AOM son similares a los desarrollados en humanos (Tanaka, 2009).

2.1.4.1 Metabolismo de activación e inactivación del AOM

El AOM, metabolito carcinógeno de DMH, requiere de varios pasos metabólicos para su activación (incluyendo N-oxidación e hidroxilación). Después de ser inyectado vía intraperitoneal, el AOM circula por la vena porta hasta llegar al hígado, donde es hidroxilado en metilazoximetanol (MAM). MAM es un compuesto altamente inestable que se descompone de manera espontánea en formaldehído e

ion metildiazonio, el cual se sabe que es el carcinógeno final que puede alquilar macromoléculas en el hígado y el colon, y adicionar grupos metilo en la posición O⁶ o N⁷ de la guanina (O⁶-metil-deoxiguanosina y N⁷-metil-deoxiguanosina) en la molécula de ADN (Figura 1). Se ha demostrado que la metilación en la posición O⁶ de la guanina es la principal lesión promutagénica producida por AOM (Delker *et al.*, 1998).

También en hígado los diferentes metabolitos del AOM pueden ser conjugados por enzimas de fase 2 de detoxificación como la uridín difosfato glucuronosil-transferasa (UGT), quinona óxidoreductasa (NQO1) y glutatión-S-transferasa (GST) a metabolitos no tóxicos, los cuales son posteriormente eliminados a través de las heces o la orina. Sin embargo, una vez en colon, la reactivación puede darse a través de las enzimas β -GA propias de la microbiota colónica. De esta manera, el metabolito tóxico (MAM) que fue conjugado en hígado mediante la glucuronidación es liberado o hidrolizado a nivel de colon, de donde se deriva el ion metildiazonio que, al unirse al ADN, da origen a la formación de aductos y finalmente al desarrollo de tumores (Figura 1) (Fiala, 1977; Perše & Cerar, 2010).

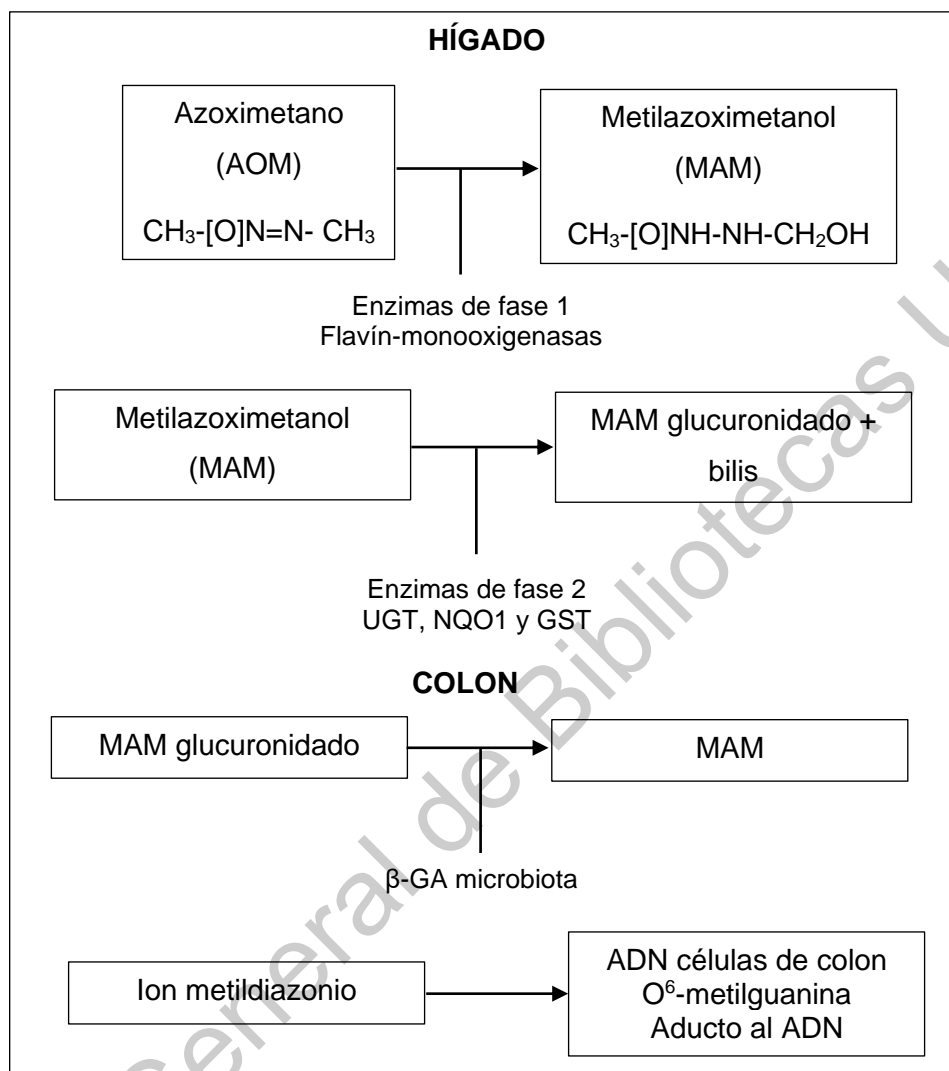


Figura 1. Metabolismo de activación y conjugación del AOM en hígado y colon (Corpet & Taché, 2002). AOM: Azoximetano, MAM: Metilazoximetanol, UGT: Uridín difosfato glucuronosil-transferasa, NQO1: Quinona oxidoreductasa, GST: Glutatió-S-transferasa. β-GA: actividad de β-glucuronidasa.

2.1.5 Estrés oxidativo y CCR

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) incluyen: el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), el oxígeno (O_2) y el ácido hipocloroso ($HOCl$). Las EROs pueden generarse por fuentes como los contaminantes, el tabaquismo, factores ambientales o como un producto secundario de las reacciones del metabolismo. Se sabe que las EROs juegan un papel

importante en el mantenimiento de la homeostasis redox. Sin embargo, si el balance entre la formación y la eliminación de las EROs se altera a favor de lo primero, estas especies oxidantes inducen reacciones en cadena, capaces de dañar macromoléculas de importancia biológica (carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos), a este fenómeno se le denomina estrés oxidativo (EO). El EO desempeña un papel importante en una variedad de procesos fisiológicos y enfermedades, entre las que destaca el cáncer de colon (Gyuraszova *et al.*, 2017).

Los organismos vivos están constantemente expuestos a numerosos desafíos que pueden afectar significativamente el potencial redox de sus células. Por lo tanto, éstos han desarrollado mecanismos de defensa antioxidante que proporcionan a las células una enorme capacidad de homeostasis redox (Bhattacharyya *et al.*, 2014).

2.1.5.1 Sistemas de defensa antioxidante

2.1.5.1.1 Mecanismos antioxidantes exógenos

Desde el punto de vista químico, un antioxidante es un compuesto químico que previene la oxidación de otra especie química. Los antioxidantes desempeñan un papel fundamental en la protección de estructuras celulares que pudieran dañarse en reacciones que involucran radicales libres, pues éstos atacan a los ácidos grasos saturados en las membranas, causando así peroxidación de lípidos y disminución en la permeabilidad membranal, así como daño a proteínas membranales. También se producen alteraciones en el ADN en condiciones de EO, con un incremento en sus niveles de fragmentación y modificaciones oxidativas en bases púricas y pirimídicas. Estos procesos están relacionados con el desarrollo de diversas patologías, como enfermedades cardiovasculares, disfunción cerebral, cáncer, entre otras. Por consiguiente, los compuestos antioxidantes son importantes reguladores de EROs, de gran valor en la prevención y/o progresión de dichas enfermedades (Owuor & Kong, 2002).

2.1.5.1.2 Mecanismos antioxidantes endógenos enzimáticos y no enzimáticos

El sistema de defensa antioxidante está conformado por numerosas enzimas antioxidantes que trabajan en conjunto, e incluyen superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), quinona óxidorreductasa (NQO1) y las enzimas del sistema glutatión: glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST). A estas enzimas también se les conoce como enzimas de fase 2 o de detoxificación, ya que protegen a las células contra los efectos tóxicos de carcinógenos convirtiendo los electrófilos reactivos en productos menos tóxicos y de más fácil excreción para el organismo (Bhattacharyya *et al.*, 2014).

En cuanto al sistema de defensa no enzimático, el glutatión (GSH) se encuentra en todas las células eucarióticas y es uno de los antioxidantes clave no enzimáticos en el cuerpo. Generalmente, el glutatión está presente en su forma reducida (GSH) y junto con otras enzimas (antes mencionadas) forma parte del sistema glutatión. En la mucosa intestinal, el sistema GSH sirve como una barrera antioxidante (Bhattacharyya *et al.*, 2014). El GSH no elimina directamente las EROs, más bien ayuda a mantener el equilibrio redox y participa en las reacciones enzimáticas antioxidantes proporcionando reductores equivalentes (Bhattacharyya *et al.*, 2014).

Es importante mantener y promover los niveles adecuados de los sistemas endógenos de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos. Existe evidencia de que compuestos naturales presentes en una dieta rica en frutas, vegetales y cereales poseen múltiples beneficios, relacionados particularmente con su capacidad para inducir los sistemas antioxidantes endógenos y atenuar los procesos de EO e inflamatorios característicos de varias patologías, entre ellas el cáncer (Meydani, 2009; Bhattacharyya *et al.*, 2014; Boz, 2015; Liu *et al.*, 2015; Sang & Chu, 2017).

2.2 Avena

La avena (*Avena sativa* L.) es un cereal que se consume en cantidades más bajas que el trigo y el arroz alrededor del mundo. Sin embargo, su contenido de fibra y su valor nutricional es alto. La avena contiene diversos aminoácidos esenciales (metionina, cisteína, treonina, isoleucina, triptófano, valina, leucina, histidina, metionina, fenilalanina y tirosina) necesarios para el cuerpo humano (Biel *et al.*, 2009), entre otros nutrimentos importantes.

2.2.1 Producción de avena en México

En México, la avena se divide en 2 grandes grupos dependiendo de su consumo, en avena forrajera y avena grano. La forrajera es utilizada básicamente como alimento para animales y la avena grano para consumo humano, siendo la primera la que abarca un mayor volumen de producción nacional (Figuras 2 y 3). Las principales entidades productoras de avena grano son los estados de Chihuahua, México e Hidalgo. Por su parte, el consumo anual per cápita de avena en el país es de 2.2 kg (SAGARPA, 2018).

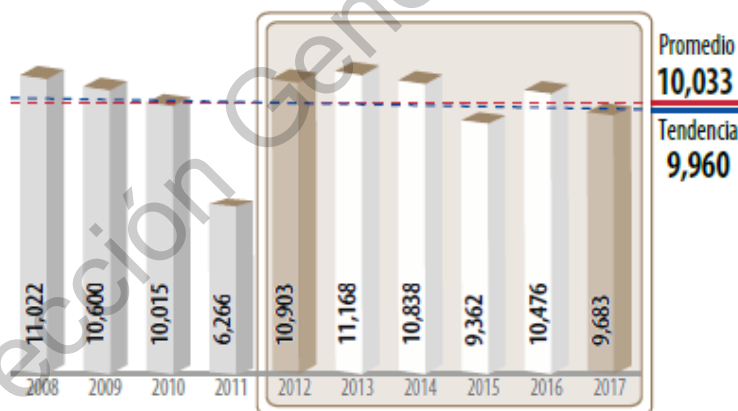


Figura 2. Volumen de la producción nacional de avena forrajera 2012-2017 (miles de toneladas) (SAGARPA, 2018).

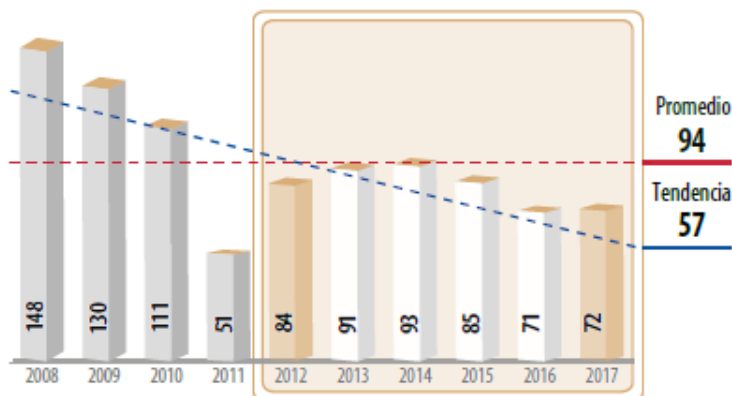


Figura 3. Volumen de la producción nacional de avena grano 2012-2017 (miles de toneladas) (SAGARPA, 2018).

A nivel mundial, México ocupa el lugar 34° como productor de avena grano con 72,092 toneladas producidas en 2017 (SAGARPA, 2018), siendo los principales países productores Rusia, Canadá, Estados Unidos, Finlandia y Polonia (FEN, 2017). Sin embargo, los principales países consumidores de avena grano, según la Fundación Española de la Nutrición (FEN, 2017), son Dinamarca con 9.49 kg/persona/año, seguida del Reino Unido y Finlandia con 6.62 y 5.48 kg/persona/año, respectivamente. Otros países como México y Argentina consumen cantidades mucho menores: 0.66 y 0.64 kg/persona/día, respectivamente. En nuestro país, la avena se consume principalmente en cereales para desayuno, galletas, salvado de avena y productos para hornear (FEN, 2017).

De acuerdo con el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, 2013), las principales variedades de avena grano en México son: Chihuahua, Karma, Avemex, Cevamex, Turquesa, Obsidiana Raramuri, Papigochi y Saia. Villaseñor y colaboradores (2009) reportaron que la variedad Turquesa sobresalió en más de 120 evaluaciones a nivel nacional por su alto rendimiento de grano y moderada resistencia a las diferentes plagas que han prevalecido en el país durante su período de evaluación (2002-2008).

2.2.2 Fibra de la semilla de avena

La avena es rica en fibra dietética, en ella podemos encontrar tanto fibra soluble como insoluble. Este cereal tiene un alto contenido de fibra soluble en forma de β -glucanos, y también contiene fibra insoluble como arabinosilanos y celulosa (Singh & Belkheir, 2013).

2.2.2.1 Fibra soluble

La avena puede considerarse como la mejor fuente de β -glucanos (Dodevska *et al.*, 2013), un polímero natural compuesto por moléculas de glucosa que están unidas por una serie de enlaces β -D- (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4) (Queenan *et al.*, 2007). Así, el contenido de β -glucanos en cereales como el trigo es aproximadamente del 1%, mientras que en la avena oscila entre 3-7%.

A la fecha, numerosos estudios han investigado los beneficios a la salud que trae consigo el consumo de avena, estableciendo que los β -glucanos son los responsables de dichos efectos (Brennan & Cleary, 2005; Shen *et al.*, 2012). De este modo, a los β -glucanos se les han atribuido importantes beneficios fisiológicos en el cuerpo, tales como: función inmunomoduladora, hipolipidémica e hipoglucémica (Shen *et al.*, 2011). Se piensa que los efectos fisiológicos modulados por los β -glucanos están en parte mediados por la insulina y la secreción de hormonas gastrointestinales (Mälkki & Virtanen, 2001).

2.2.2.2 Papel de la fibra dietética de la avena en la prevención del CCR

Existen varias especulaciones sobre el mecanismo de acción de la fibra dietética en el cáncer de colon; todas enfatizan que la fibra dietética puede promover los movimientos intestinales, disminuir el tiempo de permanencia de las heces en el intestino, modificar la composición de la microbiota intestinal y el metabolismo local, y aumentar el volumen de las heces (Bingham, 1990; Kim, 2000). Además, la fibra soluble se fermenta en colon y produce AGCC (acetato, lactato, propionato y butirato); algunos de los cuales son fuente de energía para el epitelio colónico

(Hijová *et al.*, 2012; Bultman, 2014; Shen *et al.*, 2016); mientras que, la fibra insoluble suaviza el contenido fecal y acorta el tiempo de tránsito de las heces a través del colon, ajustando así la función intestinal para mantener la salud del colon (Yapo & Koffi, 2008).

Se cree que los β -glucanos solubles aumentan la viscosidad del bolo alimenticio, lo que lleva a un retraso en el vaciado gástrico, un llenado intestinal mejorado y una absorción más lenta de nutrientes, lo que produce heces más voluminosas y acelera su paso a lo largo del intestino; esto reduce el tiempo de exposición de los tejidos del revestimiento intestinal a diversos irritantes y carcinógenos presentes en los desechos fecales (Singh & Belkheir, 2013). Además, se ha reportado que los β -glucanos promueven el aumento de poblaciones benéficas en el intestino grueso como *Bifidobacterias* y *Lactobacilos* (Mitsou *et al.*, 2010; Ji-Lin *et al.*, 2014), capaces de reducir la actividad de las enzimas metabólicas bacterianas como β -glucosidasa, β -GA y ureasa, las cuales transforman sustancias precarcinógenas en carcinógenas (Roberfroid *et al.*, 2010); además los β -glucanos pueden reducir el número de algunas, cepas de *E. coli* y *Clostridium sp.*, comúnmente conocidas por su alta actividad de β -GA (Wang & Gibson, 1993). La evidencia indica que los β -glucanos de la avena pueden reducir la incidencia de cáncer de colon a través de una variedad de mecanismos (Shen *et al.*, 2016). Sin embargo, también resulta relevante, el estudio del papel que juegan otros componentes importantes de la avena, como los compuestos fenólicos y, particularmente, las avenantramidas (AVAs), las cuales han demostrado poseer efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antiproliferativos que resultan relevantes para la prevención del cáncer de colon (Eudes *et al.*, 2011).

2.2.3 Polifenoles de la semilla de avena

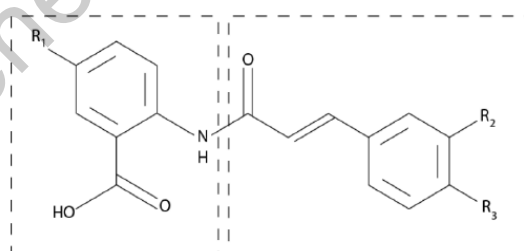
La avena posee polifenoles similares a los que están presentes en otros cereales: flavonas, como la apigenina y luteolina; isoflavonas, como la genisteína y daidzeína; flavonoides, como la catequina; ácidos hidroxibenzoicos, como el ácido elágico;

flavonoles, como el kaempferol, entre otros. Es importante resaltar que la avena también posee compuestos fenólicos únicos, que no están presentes en otros cereales, denominados avenantramidas (AVAs) (Kováčová & Malinová, 2007).

2.2.3.1 Avenantramidas (AVAs)

La avena contiene un grupo único de más de 25 tipos diferentes de AVAs que consisten en derivados de ácido antranílico (amidas de ácido antranílico) y derivados de ácido hidroxicinámico (Figura 4) (Wang *et al.*, 2014). Las tres AVAs más abundantes en la avena son AVA-A (2p), AVA-B (2f) y AVA-C (2c), que contienen ácido hidroxiantranílico y un tipo de ácidos hidroxicinámicos como *p*-cumárico, cafeico o ferúlico, respectivamente (Peterson *et al.*, 2002).

Las AVAs son compuestos fenólicos solubles de bajo peso que se expresan de forma constitutiva en los granos, apareciendo en casi todas las fracciones de la molienda, pero se encuentran en mayor concentración en el salvado y las capas externas del núcleo (Meydani, 2009). Asimismo, las AVAs son compuestos producidos por la planta en respuesta a la exposición a patógenos como hongos, por lo que se catalogan como antipatógenos (fitoalexinas) (Collins, 1989).



Ácido cinámico

Compuesto	Ácido antranílico			Ácido antranílico	Ácido cinámico
AVA-A	OH	H	OH	Ácido 5-hidroxiantranílico	Ácido <i>p</i> -cumárico
AVA-B	OH	OCH ₃	OH	Ácido 5-hidroxiantranílico	Ácido ferúlico
AVA-C	OH	OH	OH	Ácido 5-hidroxiantranílico	Ácido cafeico

Figura 4. Estructura química de las avenantramidas (AVAs) (Koenig, 2011).

2.2.3.2 Papel de los polifenoles de la avena en la prevención del CCR

Cereales como la avena son una fuente importante de compuestos fenólicos y, en años recientes, el estudio de los polifenoles de la avena ha adquirido notable interés, debido a que se les considera una fuente bioactiva de alto valor para la salud humana (Dimberg *et al.*, 2005).

La evidencia científica de los compuestos fenólicos de la avena se centra particularmente en el estudio de las propiedades benéficas de AVAs. Estas amidas fenólicas tienen propiedades antioxidantes y beneficios terapéuticos potenciales que incluyen efectos antiinflamatorios, antiproliferativos y antígenotóxicos (Eudes *et al.*, 2011), mecanismos importantes para la prevención y el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, se ha descubierto que la actividad antioxidante de AVAs es 10-30 veces mayor que la de los componentes típicos de los cereales: ácido ferúlico, ácidos hidroxibenzoicos, ácido vanílico, ácido siríngico y vanilina (Dimberg *et al.*, 2005; Meydani, 2009; Yang *et al.*, 2014).

Un estudio realizado en 4 líneas celulares de cáncer de colon demostró la capacidad antiproliferativa de AVAs. De manera adicional, este estudio habla de las propiedades antiinflamatorias y antiirritantes de estos compuestos de forma independiente a la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y a través de la inhibición de la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) en macrófagos (Guo *et al.*, 2010). Asimismo, un extracto enriquecido de AVAs demostró inhibir la activación *in vitro* del factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B activadas (NF-κB), regulador de genes asociados a la inflamación (Eudes *et al.*, 2014).

Por su parte, un estudio con animales de laboratorio reportó un incremento en la inducción de mecanismos de defensa antioxidante en diversos órganos, después del consumo de un extracto enriquecido de AVAs (100 mg/kg) (Ji *et al.*, 2003), demostrando que las AVAs pueden inducir los niveles de enzimas de biotransformación, en especial las enzimas de detoxificación de fase 2, que en condiciones fisiológicas se expresan constitutivamente a niveles relativamente

bajos y que promueven la eliminación de carcinógenos endógenos o ambientales. Así, estos compuestos sirven como activadores transcripcionales para la expresión de GST, NQO1, hemo oxigenasa 1 (HO1), entre otras enzimas antioxidantes y de fase 2, así como las enzimas que participan en la síntesis de glutatión reducido (GSH), a través de la unión del factor nuclear relacionado con el eritroide 2 tipo 2 (Nrf2) al elemento de respuesta antioxidante/electrófilo (ARE/EpRE), el cual es fundamental en la regulación del sistema de defensa celular y que se ha descrito como un objetivo importante para lograr la quimioprevención (Owuor & Kong, 2002; Egger *et al.*, 2008).

En general, estos estudios sugieren que los polifenoles de la avena, entre los que destacan las AVAs, podrían contribuir a la actividad anticancerígena, antioxidante y antiinflamatoria de la avena en un modelo *in vivo* de cáncer de colon.

2.2.3.3 Papel de la germinación en el incremento del contenido de compuestos fenólicos de la avena

En general, el proceso de germinación aumenta el valor nutricional de los granos (Tian *et al.*, 2010). Mattila y colaboradores (2005) sugirieron que la germinación puede ser un método valioso para aumentar el contenido de AVAs en avena. Varios estudios han demostrado un aumento de aproximadamente 20% en el contenido de AVAs en estos granos después del proceso de germinación. Este incremento ocurre principalmente por la activación de la enzima hidroxiantranilato N-hidroxicinamoil transferasa implicada en la síntesis de AVAs durante la germinación (Boz, 2015).

Dentro del grupo de trabajo, y como primera etapa de este proyecto global, se realizó la germinación de la semilla de avena cruda (*Avena sativa* L.) variedad Turquesa, donada por INIFAP Celaya, bajo las condiciones de temperatura de 25 °C y 60 % de humedad relativa (HR) en la oscuridad durante 5 días, en base a estudios previos en el laboratorio. Una vez realizada la germinación, el germinado de avena se trituró, homogenizó y caracterizó en términos de fibra soluble e insoluble (%) mediante el kit Megazyme β -glucan assay mixed linkage marca

megazyme (Wicklow, Irlanda) (McCleary & Codd, 1991), contenido de compuestos fenólicos (Singleton & Rossi, 1965) y antinutricios (ácido fítico por el método de Latta & Eskin, 1980), y la composición proximal (por los métodos de la AOAC).

La Tabla 1 muestra los resultados derivados de la primera parte de este proyecto (datos no publicados de Rosas-Pérez, 2018), donde se confirma que la germinación mejora algunas características nutracéuticas de la avena, particularmente el contenido de compuestos fenólicos, pero disminuye el porcentaje de fibra soluble e insoluble.

Tabla 1. Contenido de CFT, fibra insoluble, fibra soluble, fibra total, ácido fítico y composición proximal en avena variedad Turquesa y GA (25 °C/60% HR)

Muestra	CFT ¹	Fibra insoluble ²	Fibra soluble ²	Fibra total ²	Ácido fítico ²
Semilla de avena	0.64 ± 0.01 ^a	55.04 ± 1.89 ^a	18.49 ± 0.74 ^a	73.53 ± 2.51 ^a	0.44 ± 0.00 ^a
GA	2.79 ± 0.06 ^b	30.87 ± 4.23 ^b	2.28 ± 0.52 ^b	33.15 ± 4.65 ^b	0.04 ± 0.00 ^b
	Proteína ²	Carbohidratos ³	Grasa ²	Cenizas ²	Humedad ²
Semilla de avena	8.83 ± 0.23 ^a	73.37 ± 1.1 ^a	4.41 ± 0.20 ^a	3.99 ± 0.30 ^a	9.4 ± 0.7 ^a
GA	10.05 ± 0.04 ^b	71.08 ± 0.7 ^b	5.55 ± 0.01 ^b	3.62 ± 0.10 ^b	9.7 ± 0.2 ^a

Los resultados se reportan como la media ± DE. Los resultados se expresan en base seca (BS), excepto para la humedad. ¹ expresado como mg EAG/g. ² expresado como porcentaje (%), ³ calculado por diferencia. Diferente letra indica diferencia estadística según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). EAG: Equivalentes de ácido gálico, CFT: Compuestos fenólicos totales, GA: Germinado de avena.

Por lo que resultó de interés para este proyecto evaluar la actividad anticarcinogénica tanto del germinado de avena (GA) como de su extracto alto en compuestos fenólicos-AVAs (AVAs) y explorar la contribución de la fracción fenólica en esta actividad biológica con la finalidad de proponer, a al menos uno de ellos,

como una alternativa nutracéutica para la prevención del CCR, esto bajo el entendimiento de que “nutracéutico” fue un término acuñado en 1989 por Stephen DeFelice (Brower, 1998) para definir a un alimento (o parte de un alimento) que proporciona beneficios a la salud, incluida la prevención o protección contra enfermedades crónicas – no transmisibles como el cáncer (Varzakas *et al.*, 2016).

Dirección General de Bibliotecas UAG

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto quimioprotector de germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVAs en un modelo *in vivo* de CCR.

Objetivos específicos:

Evaluar el efecto quimioprotector de germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVAs sobre el desarrollo de CCR mediante análisis histopatológico del tejido colónico.

Determinar la capacidad del germinado de avena y del extracto fenólico alto en AVAs para disminuir la actividad de la enzima bacteriana β -glucuronidasa y el pH colónico, cecal y fecal en un modelo *in vivo* de CCR.

Determinar la capacidad del germinado de avena y del extracto fenólico alto en AVAs para inducir los sistemas antioxidantes en un modelo *in vivo* de CCR.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Químicos

El carcinógeno azoximetano (AOM) y el dextrano sulfato sódico (DSS), así como los reactivos para las determinaciones enzimáticas y no enzimáticas tales como: albúmina bovina (BSA), dicumarol, flavín-adenin nicotinamida (FAD), glucosa-6-fosfato (G6P), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *S. cerevisiae* (G6PD), azul de tetrazolium (MTT), 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), Tween 20, 5,5'-ditiol-2-ácido nitrobenzoico (DTNB), ácido 5-sulfosalicílico (SSA) y glutatión reducido (GSH) se adquirieron de la marca Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Nicotín-adenín-difosfato (NADP) se adquirió de la marca Roche (Mannheim, Alemania).

La determinación de proteína se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA) con un kit de trabajo de la marca Pierce Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA).

El sustrato β -glucurónido-fenolftaleína para el ensayo de la actividad de la enzima β -glucuronidasa se adquirió de la marca Sigma Aldrich (St. Louis, MI, EUA).

Los solventes (acetonitrilo y etanol) y los reactivos para la preparación de soluciones amortiguadoras fueron de la marca JT Baker (Edo. de México).

4.1.2 Biológicos

Semilla de avena (Avena sativa L.)

La semilla de avena fue donada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Celaya, Guanajuato.

Animales

Para este proyecto se emplearon 36 ratones macho de la cepa CD-1 de aproximadamente 4 semanas de edad, los cuales fueron adquiridos en el bioterio de la UNAM Campus Juriquilla, Querétaro.

4.2 Métodos

El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Química de la UAQ. Previamente, dentro del equipo de trabajo, y como parte de la primera etapa del proyecto, se realizó la germinación de la semilla de avena en la oscuridad durante 5 días a 25°C y 60% humedad relativa (HR). Una vez realizada la germinación, el germinado se trituró en un molino mecánico y el tamaño de partícula se homogenizó con un tamiz de número de malla 80. A la harina obtenida se le determinó el porcentaje de fibra soluble e insoluble mediante el kit Megazyme β -glucan assay mixed linkage marca megazyme (Wicklow, Irlanda) (McCleary & Codd, 1991), contenido de compuestos fenólicos (Singleton & Rossi, 1965) y antinutricios (ácido fítico por el método de Latta & Eskin, 1980), y la composición proximal (por los métodos de la AOAC); humedad (método 925.10), grasa (método 920.85), cenizas (método 923.03) y proteína (método 920.87) (datos no publicados de Rosas-Pérez, 2018).

4.2.1 Preparación del extracto fenólico alto en AVAs

El extracto fenólico alto en AVAs que se administró al modelo animal de CCR se preparó de la siguiente manera: se utilizaron 2 g de harina homogenizada de germinado de avena. Las extracciones se realizaron con 40 mL de metanol:agua 50:50 (v/v) acidificado (pH 2) y en agitación durante 1 h a 1000 g. Posteriormente, los extractos se centrifugaron a 3000 g por 10 min y se recuperó el sobrenadante; al pellet resultante se le adicionaron 40 mL de acetona (70:30) y se agitó durante 1 h a 1000 g para después volver a centrifugar a 3000 g por 10 min. El sobrenadante obtenido se mezcló con el primer sobrenadante y se concentró por rotaevaporación

durante 24 h para eliminar los solventes (Rodríguez-González *et al.*, 2018). El extracto fenólico se almacenó a -20 °C, condición en la que permaneció hasta su uso.

4.2.2 Cuantificación de compuestos fenólicos por UPLC-PDA

Se inyectó 1 µL de muestra a un sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (ACQUITY UPLC), equipado con un Auto-Sampler (Waters ACQUITY FTN) y un detector (Waters Acquity PDA) con lectura desde los 250 nm hasta 560 nm. Se usó como fase móvil (A) agua 7.5 mM ácido fórmico, y fase móvil (B) acetonitrilo. Los gradientes de inyección fueron los siguientes en la proporción (A/B), (97/3) en el minuto 0, (91/9) en el minuto 1.23, (84/16) en el minuto 3.82, (50/50) en el minuto 11.40, (97/3) en el minuto 13.34 y (97/3) en el minuto 15.00, con un tiempo de corrida de 16.00 min por cada inyección. Para la cuantificación de los compuestos fenólicos, flavonoides y AVAs presentes en el extracto se utilizaron estándares comerciales (marca Sigma, Aldrich) (ver Anexo 8.1) y los resultados se reportaron como mg del compuesto/100 g de germinado de avena.

4.2.3 Modelo animal de CCR

El presente proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) (No. de Dictamen CBQ18/069). En este modelo se emplearon 36 ratones macho de la cepa CD-1, con 4 semanas de edad y con un peso de 25 a 36 g, los cuales fueron adquiridos en el bioterio de la UNAM Campus Juriquilla. Los ratones se alojaron en grupos de 2 a 3 animales por jaula (dimensiones: 187 cm de ancho y 18 cm de alto) bajo condiciones controladas de humedad y temperatura ($50 \pm 10\%$ HR, 23 ± 2 °C) con ciclos de 12 h luz/oscuridad. Las jaulas de acero inoxidable permitían la entrada de luz y aire y se encontraban ubicadas en las instalaciones de la Facultad de Química de la UAQ. La limpieza de éstas se realizó de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999. Durante la fase experimental, los animales tuvieron acceso a alimento y agua *ad libitum*. El peso de los animales se registró semanalmente.

Después de 2 semanas de adaptación, los tratamientos (germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVAs) se administraron diariamente mediante canulación (vía intragástrica) (Figura 5). Para lo anterior, los animales se dividieron aleatoriamente de la siguiente manera:

Grupo 1: Sano (n=10), alimentado con dieta estándar y a quienes se les administró 20 μ L de solución salina grado farmacológico (vehículo).

Grupo 2: Control positivo (AOM + DSS) (n=10), alimentado con dieta estándar y dosificados con 20 μ L de solución salina grado farmacológico.

Grupo 3: AVAs (AVAs + AOM + DSS) (n=8), quienes recibieron 0.084 mg totales de extracto fenólico alto en AVAs por día (equivalentes en fenoles totales).

Grupo 4: GA (GA + AOM + DSS) (n=8), tratados con 30 mg de germinado de avena por día (equivalentes a 0.084 mg de extracto fenólico alto en AVAs).

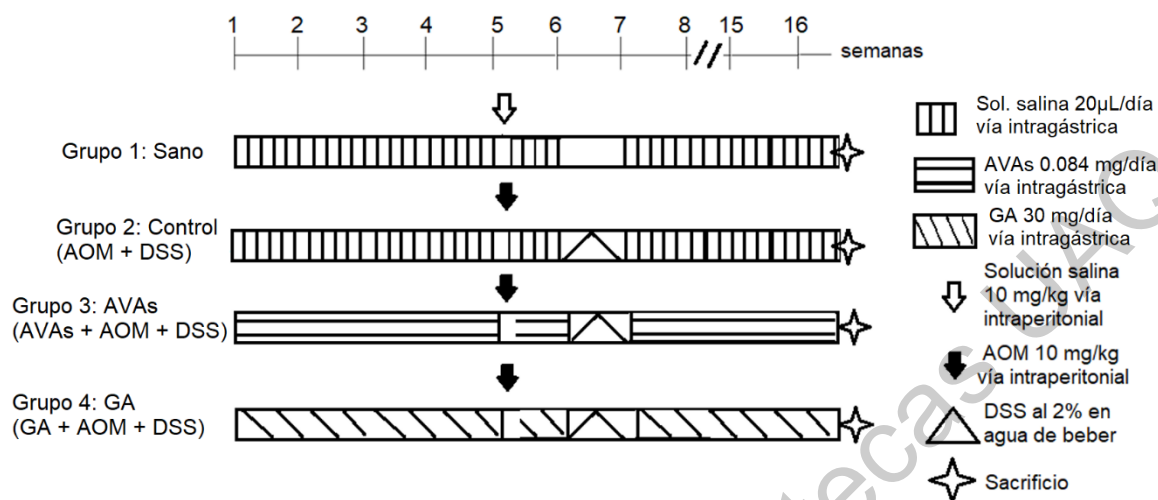


Figura 5. Diagrama de los grupos experimentales del modelo *in vivo* de CCR. AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico, AVAs: Extracto fenólico alto en AVAs, GA: Germinado de avena.

4.2.3.1 Inducción de cáncer de colon con AOM/DSS

Los tratamientos (o en su defecto, la solución salina) se dosificaron durante 2 semanas continuas al inicio del experimento. Posterior a éstas, se llevó a cabo la inducción de la carcinogénesis con el compuesto azoximetano (AOM, marca Sigma-Aldrich), mediante inyección intraperitoneal (10 mg/kg). Al grupo sano se le administró vía intragástrica solución salina grado farmacológico a la misma dosis. El día posterior a la inducción, los animales no recibieron tratamiento alguno; después de este día de descanso, se retomó la dosificación de tratamientos GA y AVAs por 5 días más. Inmediatamente después se administró dextrano sulfato sódico (DSS, marca Sigma-Aldrich), como promotor de la inflamación, al 2% p/v en el agua de beber por 7 días (Tanaka, 2009; De Robertis *et al.*, 2011). Transcurrido ese periodo de tiempo, los tratamientos GA y AVAs continuaron dosificándose de manera normal hasta un día antes del sacrificio.

4.2.3.2 Toma de muestras de heces

Se tomaron muestras de heces al final de la semana 15 para poder determinar el pH y la actividad de β -GA. Para ello, se alojó a los animales en jaulas metabólicas

metálicas (dimensiones: 187 cm de ancho y 18 cm de alto) en grupos de 2 animales por jaula bajo condiciones controladas de humedad y temperatura ($50 \pm 10\%$ HR, 23 ± 2 °C) con ciclos de 12 h luz/oscuridad durante 24 h. Las muestras de heces quedaron atrapadas en la malla, se recuperaron en tubos de polipropileno estériles de 15 mL y se almacenaron a -70 °C; condición en la que permanecieron hasta su análisis. Durante la recolección de muestras, los animales tuvieron acceso a alimento y agua *ad libitum*.

4.2.3.3 Sacrificio de animales y obtención de muestras

Al término de la semana dieciséis, los ratones se sacrificaron por decapitación de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999; actividad que fue realizada por el M. en C. Alfredo Rodríguez Cruz, quien cuenta con amplia experiencia en el sacrificio de animales de laboratorio mediante esta técnica física.

Durante el sacrificio se recolectaron, de cada animal, sangre periférica, los órganos de interés (hígado, colon y ciego); así como los contenidos colónico y cecal. Los órganos se removieron, se enjuagaron con solución salina grado farmacológico y se congelaron en nitrógeno líquido. Todas las muestras recolectadas se almacenaron a -70 °C, condición en la que permanecieron hasta su análisis.

Inmediatamente después de la obtención de sangre, ésta se procesó para lisar los eritrocitos y separarlos del plasma. Brevemente, una vez guillotinado el animal, se recolectó la sangre en tubos microtainer EDTA y se mezcló por inversión para evitar la formación de coágulos. Inmediatamente, la muestra se colocó en hielo y se centrifugó a 1370 g por 10 min a 4 °C. El plasma se separó, se recolectó en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL y se almacenó a -4 °C; una vez concluido el sacrificio se llevó a -70 °C. Los eritrocitos se lisaron de la siguiente manera: se agregó 1 volumen de agua destilada (1:1) a la muestra y se llevó a agitación en Vortex por 10 s e inmediatamente después se centrifugó a 4000 g por 15 min a 4 °C. El contenido se almacenó en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL y se almacenó a -70 °C.

Los desechos biológicos como cadáveres, sangre y objetos pulso cortantes utilizados durante el sacrificio se colocaron en una bolsa amarilla con la leyenda “Material biológico de desecho” el cual fue desechado de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

4.2.4 Análisis macroscópico de las lesiones colónicas

Durante el sacrificio se llevó a cabo la clasificación macroscópica y cuantificación de las lesiones encontradas en el colon de los animales de acuerdo con el criterio de Astler & Collier (1954). Las lesiones macroscópicas colónicas pueden definirse de la siguiente manera (Figura 6):

- Tumores sésiles (A): Protuberancias sobre la superficie de la mucosa con un diámetro mayor que el de su unión a la mucosa y muy cercanos a la misma.
- Tumores pedunculados (B): Pólipos con tallo claramente visible.
- Tumores exofíticos (C): Tumores usualmente polipoides que sobresalen hacia la luz; presentan margen elevado con una cavidad central y una masa subyacente lobulada.
- Tumores endofíticos (D): Tumores en forma de meseta o ulcerativos con tendencia ligera o nula a abultar hacia la luz. Por lo regular son tumores constrictivos.
- Placas (E): Lesiones con una superficie relativamente plana, ligeramente por encima del nivel de la mucosa.

Para la identificación de las lesiones, el colon completo (sección proximal y distal) se removió, se enjuagó con solución salina grado farmacológico, se abrió longitudinalmente y se buscaron las lesiones colónicas antes mencionadas.

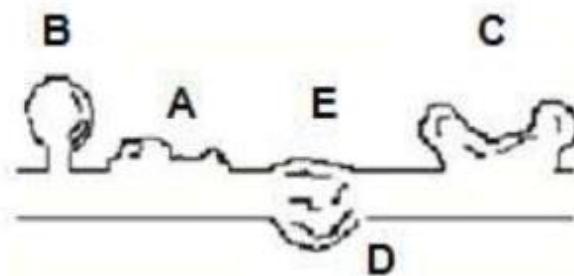


Figura 6.Clasificación de tumores (Astler & Coller, 1954).

4.2.5 Análisis histopatológico

Una vez identificadas, las lesiones macroscópicas se retiraron y la mitad de las muestras de colon se fijaron en una solución de formaldehído al 10%, se realizaron 3 cortes por tejido para una posterior inmersión en parafina, microdissección y tinción con hematoxilina-eosina (H&E). Finalmente, los tejidos se observaron en un microscopio Olympus PX40, tomando 5 fotos a 100x y 5 a 300x para evaluar el grado de displasia y así poder clasificar a las muestras en tejido normal, displasia y adenocarcinoma. Para el grado de displasia, la evaluación se realizó siguiendo la escala establecida por Riddell y colaboradores (1983), clasificando la displasia como displasia de bajo grado, alto grado y adenocarcinomas. La otra mitad de las muestras de colon se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70 °C, condición en la que permanecieron hasta su análisis.

El análisis histopatológico estuvo a cargo del Dr. Marco Alonso Gallegos Corona, profesor investigador a cargo del laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina de la UAQ. Una segunda evaluación histopatológica estuvo a cargo de la Dra. Ericka de los Ríos de la UNAM, campus Juriquilla, Querétaro.

4.2.6 Análisis de pH

Los contenidos cecales, colónico y muestras de heces se suspendieron en agua HPLC en una relación 1:5 (p/v), se homogenizaron con ayuda de un Vortex y se determinó su pH usando un potenciómetro (Nakanishi *et al.*, 2003).

4.2.7 Determinación de la actividad de la enzima β -glucuronidasa (β -GA)

La actividad de la enzima bacteriana β -glucuronidasa (β -GA) se determinó en contenido cecal, colónico y muestras de heces de acuerdo con lo descrito por Fishman y colaboradores (1948). Se homogenizó 0.05 g de muestra en agua HPLC (relación 1:5 p/v), usando un pistilo. Posteriormente, la muestra se sometió a sonicación en un baño ultrasónico durante 3 min a 4 °C y se centrifugó a 500 g por 15 min. Se recolectó el sobrenadante y se determinó la actividad enzimática. Para la reacción se colocó en tubos de polipropileno estériles de 15 mL, 0.8 mL de PBS 0.002 M, 0.1 mL del sustrato β -glucurónido-fenolftaleína 1 mM y 0.1 mL del sobrenadante cecal, colónico o fecal. La reacción se incubó por 1 h a 37 °C y se detuvo con 2.5 mL de glicina alcalina y 1.5 mL de agua HPLC. Una vez detenida la reacción, 300 μ L de cada muestra se transfirió a placas de 96 pozos. Las muestras se leyeron inmediatamente por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm en el lector de microplacas modelo Varioskan Flash (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Posteriormente, se calculó la cantidad de fenolftaleína liberada mediante una curva estándar de fenolftaleína (ver Anexo 8.2).

4.2.8 Determinación de los sistemas de defensa antioxidante

4.2.8.1 Cuantificación de proteína en eritrocitos

Para poder expresar los resultados de la cuantificación de glutatión reducido (GSH) en eritrocitos lisados era necesario conocer la concentración de proteína en las muestras. Para ello, el contenido de proteína se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), cuantificado con el kit de BCA (Pierce, Thermo Scientific), empleando albúmina bovina como estándar (2 mg/mL). Se realizó una dilución 1:50 de los eritrocitos lisados con agua destilada. Posteriormente, se

colocaron 50 μL de eritrocitos diluidos en placas de 96 pozos (tres pozos por muestra) y se agregaron 250 μL de la solución de trabajo para la determinación de proteína (ver Anexo 8.3) en cada pozo. La placa se incubó 30 min a 37 °C. Finalmente, las muestras se leyeron en un lector de microplacas modelo Varioskan Flash (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) a una longitud de onda de 562 nm.

4.2.8.2 Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH)

La concentración de GSH se determinó en eritrocitos lisados por el método de Ellman (1985), basado en la habilidad del grupo SH para reducir ácido 5,5'-ditiobis dinitro benzoico (DTNB) a ácido 5-thio-2-nitrobenzoico (TNB). Los niveles de GSH en las muestras se calcularon extrapolando la absorbancia de las muestras en una curva de calibración realizada previamente y los resultados se expresaron en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. Para la realización de la curva estándar de GSH, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: solución amortiguadora Tris-EDTA (TRIS 0.2 M, EDTA, 0.02 M; pH 8.2), solución de trabajo de GSH 0.6 mM, metanol y solución de DTNB 2.46 mM (ver Anexo 8.4). La reacción se inició con la adición de este último reactivo y se incubó por 5 min a temperatura ambiente y protegido de la luz. Las muestras se leyeron inmediatamente por espectrofotometría a una longitud de onda de 412 nm a 25 °C en el lector de microplacas modelo Varioskan Flash (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

Antes de llevar a cabo el ensayo de GSH en eritrocitos lisados, se precipitó previamente la proteína con el siguiente procedimiento: en un tubo Eppendorf se adicionaron 100 μL de eritrocitos lisados y 100 μL de ácido sulfosalicílico (SSA) (5%) (ver Anexo 8.4). Se dejaron reposar por 30 min a 4 °C y luego se centrifugaron a 8500 g por 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf. De este nuevo tubo se tomaron 50 μL para colocarse en placas de 96 pozos (tres pozos por muestra) y se adicionaron 150 μL de solución amortiguadora Tris-EDTA, 80 μL de metanol y 20 μL de DTNB 2.46 mM, se

incubaron 5 min y se leyeron inmediatamente con las mismas condiciones utilizadas en la curva estándar.

4.2.8.3 Preparación de homogenados citosólicos

Para la determinación de GST y NQO1 se emplearon homogenados citosólicos de hígado y colon, los cuales se prepararon de la siguiente manera: se pesaron 0.1 g de hígado y 0.15 g de colon descongelados en hielo y se colocaron en tubos eppendorf con 0.4 mL/0.6 mL (hígado/colon) de solución amortiguadora Tris-sacarosa (ver Anexo 8.5). Las muestras se homogenizaron con un pistilo hasta que no fue visible ningún grumo de tejido y se centrifugaron a 8,750 g durante 20 min a 4 °C (Andreas Hettich GMBH & Co. KG, Alemania). Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 100,000 g durante 60 min a 4 °C en una ultracentrífuga (Beckman, EUA). Se recuperó el citosol con una pipeta Pasteur y se alicuotó en tubos Eppendorf de 1 mL para su posterior almacenamiento a -70 °C para la determinación de la actividad de GST y NQO1.

4.2.8.4 Cuantificación de proteínas en los homogenados citosólicos

El contenido de proteína se determinó mediante el método del ácido bicinonónico (BCA), cuantificado con el kit de BCA (Pierce, Thermo Scientific), empleando albúmina bovina como estándar (2 mg/mL). Se realizaron dos diluciones diferentes de los citosoles (1:80 para los homogenados de hígado y 1:20 para los de colon) con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.5. Posteriormente, se colocaron 50 µL de citosol diluido en placas de 96 pozos (tres pozos por muestra) y se agregaron 250 µL de la solución de trabajo para la determinación de proteína (ver Anexo 8.3) en cada pozo. La placa se incubó 30 min a 37 °C. Finalmente, las muestras se leyeron en un lector de microplacas modelo Varioskan Flash (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) a una longitud de onda de 562 nm.

4.2.8.5 Determinación de la actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST)

Este método se basa en la reacción catalizada por esta enzima entre GSH y el sustrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), el cual tiene un amplio intervalo para detectar las diferentes isoenzimas de GSTs. Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de CDNB-GSH conjugado por minuto (Habig *et al.*, 1974).

Se realizaron diluciones apropiadas de los homogenados citosólicos de hígado y colon (para muestras de hígado se empleó una dilución 1:40 para grupos sano y control, y una dilución 1:80 para ambos grupos con tratamiento, para muestras de colon, se utilizó una dilución 1:2 para todos los grupos). Se colocaron 50 μ L de homogenados citosólicos diluidos en placas de 96 pozos (tres pozos por muestra), se agregaron 100 μ L de una solución de trabajo de GSH 3 mM y en seguida se adicionaron 150 μ L de la solución de trabajo CDNB 2 mM en cada pozo, evitando la formación de burbujas (ver Anexo 8.6). La formación del conjugado CDNB-GSH por la enzima GST se monitoreó inmediatamente por espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm a 25 °C en un periodo de 2 min de reacción en el lector de microplacas modelo Varioskan Flash (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), obteniéndose lecturas cada 20 segundos. La actividad de GST se expresó en nmol de producto formado por mg de proteína por min.

4.2.8.6 Determinación de la actividad de quinona oxidoreductasa (NQO1)

La formación de 6-fosfogluconolactona mediante la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa genera poder reductor (NADPH), el cual es utilizado por la enzima NQO1 para reducir el compuesto tetrazolium (MTT), dando como resultado un precipitado azul-café, el cual puede medirse a través de espectrofotometría a 610 nm después de 5 min de reacción (Prochaska *et al.*, 1992).

Se realizó una dilución 1:10 para los homogenados citosólicos de hígado, y una dilución 1:4 para los de colon. Se tomaron 50 μ L de homogenado citosólico diluido por pozo y se colocaron en placas de 96 pozos (tres pozos por muestra). Se agregaron 200 μ L de solución amortiguadora de trabajo TRIS 0.025 M, pH 7.4, a la que previamente se le adicionaron los cofactores y la menadiona (ver Anexo 8.7). La reacción se detuvo a los 5 min con 50 μ L de una solución amortiguadora de fosfatos 0.025 mM, que contenía 2 μ L de dicumarol preparado en NaOH 0.1 N a una concentración de 20 mg/mL. La placa se leyó a los 5 min por espectrofotometría a una longitud de onda de 610 nm a 25 °C en el lector de microplacas modelo Varioskan Flash (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Los resultados se expresaron en nmol de producto formado por mg de proteína por min.

4.2.9 Análisis estadístico

Los resultados se reportaron como la media \pm la desviación estándar (DE), excepto para los resultados de las determinaciones del modelo *in vivo*, los cuales se expresaron como la media \pm error estándar (EE). Se empleó la prueba de χ^2 para determinar las diferencias en la incidencia de adenocarcinomas y grado de displasia en el modelo *in vivo*. La evaluación estadística de la actividad de β -GA, pH y mecanismos de defensa antioxidante se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguida de una comparación de medias por la prueba de Tukey (para comparar todos los grupos) ($\alpha = 0.05$). La correlación de Pearson se empleó para determinar la asociación entre los diversos parámetros evaluados ($\alpha = 0.05$). Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico JMP versión 11.0.0.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Cuantificación de compuestos fenólicos por UPLC-PDA

Los compuestos fenólicos son productos secundarios del metabolismo de las plantas y se caracterizan estructuralmente por la presencia de al menos un anillo aromático que tiene uno o más grupos hidroxilo (Bei *et al.*, 2017). En este estudio, se realizó un perfil fitoquímico del GA suministrado al modelo animal para cuantificar los polifenoles presentes en dicha matriz alimentaria. Los resultados del perfil fitoquímico se muestran en la Tabla 2.

Dieciséis compuestos diferentes fueron identificados (1 flavonoide, 11 ácidos fenólicos y 4 AVAs). Los ácidos salicílico y shikímico se encontraron en mayor proporción en la variedad de avena Turquesa. Multari y colaboradores (2018) evaluaron 8 variedades diferentes de avena y reportaron que todas ellas difieren en sus perfiles fenólicos, teniendo en común únicamente 4 ácidos fenólicos: ferúlico, *o*-cumárico, *p*-cumárico y siríngico; siendo los mayoritarios el ácido fenólico y *p*-cumárico. La variedad Turquesa coincide con los compuestos fenólicos encontrados por Multari y colaboradores; sin embargo, difiere en los ácidos fenólicos más abundantes. Esto se debe a que en los cereales la concentración de los compuestos fenólicos está fuertemente influenciada por el tipo de grano, la variedad, la parte del grano analizada, entre otros (Gangopadhyay *et al.*, 2015).

En los últimos años, los germinados han cobrado relevancia como alimentos funcionales debido a que aportan una calidad nutritiva superior y beneficios a la salud en comparación con las semillas normales (Aborus *et al.*, 2018). De esta manera, los germinados ofrecen además de vitaminas, minerales y aminoácidos, una cantidad relevante de antioxidantes (fenoles y flavonoides) contribuyendo a mejorar la salud humana (Vale *et al.*, 2015).

Tabla 2. Contenido de compuestos fenólicos libres presentes en el GA cuantificados mediante UPLC-PDA

Compuesto	RT	Concentración
FLAVONOIDES		
Miricetina	12.7	0.80 ± 0.80
ÁCIDOS FENÓLICOS		
Ácido quínico	2.6	0.53 ± 0.46
Ácido shikimico	2.6	2.13 ± 0.92
Ácido 4-O-cafeoilquínico	8.0	1.33 ± 0.46
Ácido 4-hidroxibenzoico	8.2	0.80 ± 0.00
Ácido siríngico	8.9	0.27 ± 0.36
Ácido <i>p</i> -cumárico	9.9	0.27 ± 0.46
Ácido cafeico	9.9	0.80 ± 0.00
Ácido ferúlico	10.4	0.27 ± 0.36
Ácido benzoico	11.5	0.53 ± 0.46
Ácido salicílico	11.6	2.13 ± 0.92
Ácido trans-cinámico	13.4	1.60 ± 0.80
AVENANTRAMIDAS		
AVA-A (2p)	6.38	2.62 ± 0.01
AVA-B (2f)	7.65	2.59 ± 0.02
AVA-C (2c)	6.62	2.61 ± 0.02
AVA- 2fd	7.36	2.73 ± 0.01

Los resultados se reportan como la media ± DE. Los resultados se expresan como mg equivalente de cada compuesto/ g de muestra. RT: Tiempo de retención calculado en min.

Aborus y colaboradores (2018) germinaron y analizaron el perfil fitoquímico de dos variedades de avena (Golozrni y Jadar), encontrando 9 ácidos fenólicos y 7 flavonoides; pese a que no podemos comparar sus resultados con los obtenidos en este estudio por tratarse de variedades diferentes, sí podemos decir que existen ácidos fenólicos en común entre las tres variedades (cumárico, cafeico, ferúlico,

siríngico e hidroxibenzoico), aunque la concentración varía drásticamente entre ellas; situación similar a lo que ocurre con el flavonoide en común para las tres, la miricetina.

En lo que respecta al contenido de AVAs, se cuantificaron las tres AVAs más abundantes en la avena (A, B, C) y la AVA-2fd, encontrando que todas ellas oscilan en una concentración que va de los 2.59 – 2.73 mg/100 g de GA. De Bruijn y colaboradores (2019) reportaron que el contenido de AVAs en semillas de avena se incrementó 25 veces por efecto de la germinación. Sin embargo, ellos encontraron que las 3 AVAs más abundantes (A, B, C) representaban menos del 20% del contenido total de AVAs, por lo que recomiendan no descuidar cualquiera de estas tres fracciones, de lo contrario, el resultado de la cuantificación total podría estar subestimando el contenido total de AVAs.

5.2 Efecto quimioprotector de germinado de avena y su extracto fenólico sobre el desarrollo de cáncer de colon

La evidencia científica de las propiedades bioactivas de los fenoles de la avena, entre los que se incluyen a las AVAs, apuntan a que éstas son promisorias en el estudio de estrategias de prevención y tratamiento del cáncer. Por lo anterior, este proyecto se centró en evaluar el efecto quimioprotector de germinado de avena (GA) y su extracto fenólico (AVAs) en un modelo animal de CCR.

5.2.1 Ganancia de peso y sobrevivencia

Durante el periodo experimental de 16 semanas se registró semanalmente el peso corporal de los animales (Figura 7). El peso promedio inicial del grupo sano y control AOM + DSS fue de 30.6 ± 1.01 y 30.0 ± 0.76 g, respectivamente; mientras que, el peso de los grupos AVAs y GA fue de 28.8 ± 1.03 y 28.9 ± 0.88 , respectivamente. Al finalizar las 16 semanas de experimentación, el grupo sano y control AOM + DSS alcanzaron un peso promedio de 39.8 ± 1.01 y 41.8 ± 0.79 g, respectivamente; mientras que, los grupos tratados AVAs y GA pesaron en promedio 40.1 ± 1.10 y

38.9 ± 1.03 g, respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticas significativas en el peso final entre los grupos experimentales ($\alpha = 0.05$) (Figura 7). Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones experimentales, el agente inductor y promotor de la carcinogénesis (AOM + DSS), así como los tratamientos con GA y AVAs, no ocasionaron efectos adversos relacionados con la absorción de nutrientes y el crecimiento o desarrollo de los animales de experimentación. Sin embargo, observamos molestias anales en algunos ratones a partir de la semana 14 de inducción con AOM/DSS. En el grupo control AOM + DSS, 4 animales presentaron sangrado rectal y 5 animales desarrollaron prolapso anal; mientras que, sólo 2 animales del grupo AVAs y 3 del grupo GA desarrollaron sangrado anal, y uno de cada grupo, prolapso anal. Además, se observaron heces con sangre desde la semana 15 en el grupo control AOM + DSS. Así mismo, las heces a partir de esta semana comenzaron a perder consistencia, particularmente en el grupo control AOM + DSS se presentó de manera más frecuente (datos no mostrados). Los animales con estas condiciones fueron asignados en jaulas de forma individual y evaluados por un veterinario de manera rutinaria.

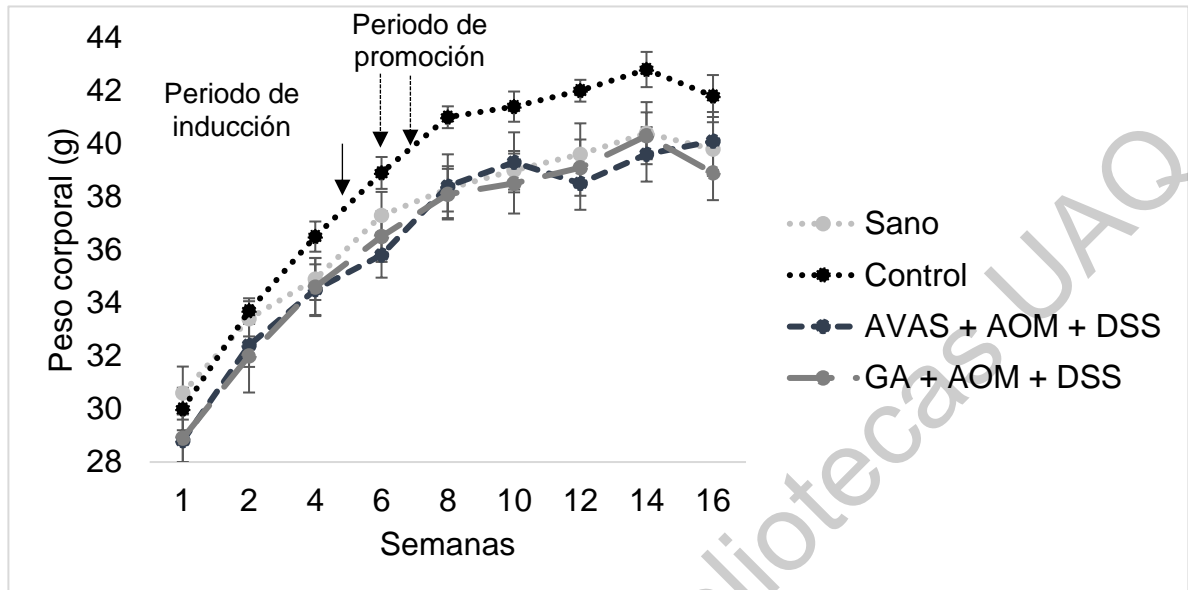


Figura 7. Peso de ratones tratados con GA (30 mg/día) y AVAs (0.084 mg/día) e inducidos con AOM + DSS. AVAS: Extracto fenólico alto en avenantramidas, GA: Germinado de avena, AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico. Los resultados se expresan como la media \pm EE (n=10 para sano y control, n=8 para AVAs y GA).

Respecto a la sobrevivencia de los animales en estudio, el grupo sano y el control AOM + DSS presentaron una tasa de sobrevivencia del 100%; mientras que, los grupos tratados con germinado de avena y su extracto presentaron un 89% de sobrevivencia con la muerte de un animal en cada grupo, los cuales, de acuerdo con la autopsia realizada por el médico veterinario, murieron por causas ajenas al cáncer (datos no mostrados).

5.2.2 Evaluación macroscópica del colon en ratones con cáncer de colon

Las lesiones encontradas en el colon de cada uno de los animales se clasificaron de forma macroscópica. Dentro de esta clasificación se encuentran las lesiones tempranas, denominadas placas, y las lesiones más avanzadas, denominadas pólipos o tumores. Estos últimos se definen como una protuberancia de células que sobresalen hacia el lumen intestinal, se caracterizan por tener una división celular aumentada y pueden ser lesiones benignas y asintomáticas o evolucionar a lesiones

malignas (Tanaka, 2012). En la Figura 8 se muestran dos imágenes representativas de ambos tipos de lesiones halladas durante el sacrificio de los animales.

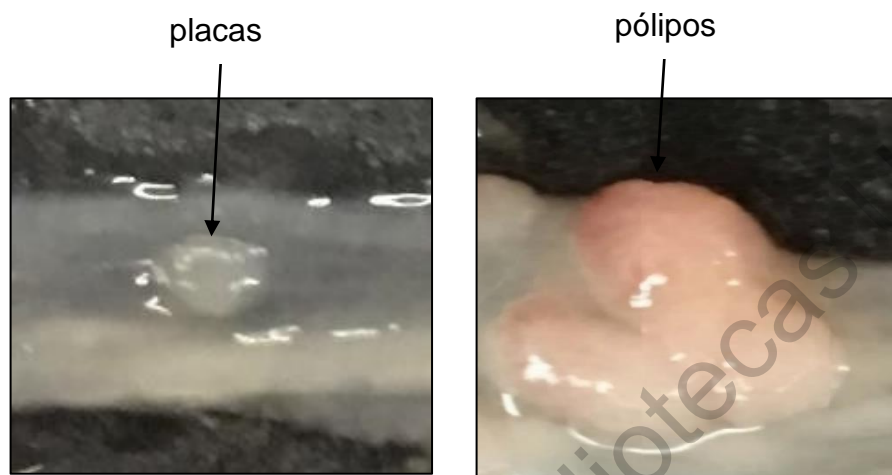


Figura 8. Clasificación macroscópica encontrada en ratones inducidos con AOM (10 mg/kg) y promovidos con DSS (2%) al finalizar el período experimental.

En la Tabla 3 se muestran los resultados derivados del recuento de placas encontradas en los animales del modelo experimental. El grupo sano presentó una incidencia de placas del 10%; esto debido a la susceptibilidad de la cepa para desarrollar espontáneamente este tipo de lesiones (Astler & Coller 1954). Por su parte, los grupos tratados con GA y AVA presentaron la mayor incidencia de estas lesiones (100%) en comparación con el grupo control (60%). De acuerdo con el análisis de χ^2 ($\alpha = 0.05$), el grupo significativamente diferente fue el sano. Sin embargo, los animales tratados con GA y AVAs se comportaron de acuerdo con lo esperado, ya que una placa es una lesión temprana de daño en la mucosa colónica que no se considera maligna (Astler & Coller 1954; Tanaka, 2009).

Otros parámetros que se evaluaron fueron el número promedio de placas que indica el número total de placas encontradas entre el número de ratones del grupo y la multiplicidad que representa el número total de placas en el grupo entre el número de ratones que presentaron dichas lesiones; este último es un indicador de la agresividad de la enfermedad y de la efectividad de los tratamientos. Tanto el

número promedio de placas como el valor de multiplicidad fue 1.7 veces mayor en los grupos tratados con germinado de avena y su extracto en comparación con el grupo control. Es importante recalcar, que si bien, los animales de los grupos con tratamiento mostraron un promedio mayor de placas en comparación con el grupo control, esta tendencia no resulta desfavorable ya que una placa es una lesión temprana benigna, que no ha evolucionado a pólipo adenomatoso (el cual se considera precursor del CCR) (Astler & Coller 1954; Tanaka, 2009; Dulal & Keku, 2014).

Tabla 3. Porcentaje de incidencia, número promedio y multiplicidad de placas en ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA y AVAs

Grupo	Total de ratones	Número de placas	Incidencia* (%)	Promedio de placas por ratón**	Multiplicidad [§]
Sano	10	1	10.0*	0.10 ± 0.10	1.00
Control	10	10	60.0	1.00 ± 0.30	1.67
AVAs + AOM + DSS	8	17	100.0	2.13 ± 0.30	2.13
GA + AOM + DSS	8	17	100.0	2.13 ± 0.61	2.13

*Incidencia: la relación del número de animales con placas entre el número total de ratones en el grupo. **Promedio: la relación del número total de placas entre el número total de ratones en el grupo ± error estándar. §Multiplicidad: la relación del número total de placas entre el número de animales con placas. AVAs: Extracto fenólico alto en avenantramidas, GA: Germinado de avena, AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico. *Indica diferencia estadística significativa de acuerdo con la prueba de χ^2 ($\alpha = 0.05$).

La Tabla 4 muestra los resultados del conteo de pólipos o tumores encontrados en los animales de los diferentes grupos. Se observaron lesiones pedunculadas, sésiles, exofíticas y endofíticas en el colon proximal y distal (Astler & Coller, 1954). Como era de esperarse en el grupo sano no se presentó incidencia de pólipos; mientras que, el grupo control AOM + DSS presentó un aumento del 80% en la incidencia de estas lesiones comparándolo con el grupo sano. En el grupo control AOM + DSS se identificaron en mayor proporción los pólipos sésiles, seguido de los pedunculados. Se considera que los primeros poseen mayor malignidad debido a que tienen una base de implantación amplia, sin tallo, sobre la superficie de la

mucosa, por lo que la degeneración de las células llega antes a la base. Los segundos presentan un tallo de implantación visible, lo que representa una menor malignidad porque el daño a las células tarda en llegar a la base de sujeción (Tanaka, 2012).

Tabla 4. Porcentaje de incidencia, número promedio y multiplicidad de pólipos en ratones inducidos con AOM +DSS y tratados con GA y AVAs

Grupo	Total de ratones	Número de pólipos	Incidencia* (%)	Promedio de pólipos por ratón**	Multiplicidad [§]
Sano	10	0	0.0*	0.00 ± 0.00	0.00
Control	10	42	80.0	4.20 ± 1.01	5.25
AVAs + AOM + DSS	8	5	50.0	0.63 ± 0.26	1.25
GA + AOM + DSS	8	3	37.5	0.38 ± 0.18	1.00

*Incidencia: la relación del número de animales con pólipos entre el número total de ratones en el grupo. **Promedio: la relación del número total de pólipos entre el número total de ratones en el grupo. §Multiplicidad: la relación del número total de pólipos entre el número de animales con pólipos. AVAs: Extracto fenólico alto en avenantramidas (0.084 mg/día), GA: Germinado de avena (30 mg/día), AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico. *Indica diferencia estadística significativa de acuerdo con la prueba de χ^2 ($\alpha = 0.05$).

Los grupos tratados con GA y AVAs mostraron una incidencia del 30 al 42.5% menor en comparación con el grupo control, respectivamente. En el caso del grupo GA, todos los pólipos cuantificados fueron pedunculados. El grupo AVAs presentó estas mismas lesiones y un pólipo sésil. De acuerdo con el análisis de χ^2 ($\alpha = 0.05$), el grupo significativamente diferente fue el sano. Sin embargo, aunque los grupos con tratamiento no resultaron ser estadísticamente diferentes en comparación con el grupo control (AOM + DSS), la aplicación de los tratamientos disminuyó el número de animales que desarrollaron pólipos.

En resumen, los resultados obtenidos en el conteo de placas y pólipos o tumores sugieren que los fitoquímicos presentes en ambos tratamientos (GA y su extracto fenólico alto en AVAs) podrían estar bloqueando, inhibiendo o retardando el proceso de carcinogénesis, en particular durante la etapa de promoción a transformación

que es donde las lesiones tempranas (placas) evolucionan a lesiones neoplásicas que pueden ser malignas (cancerígenas), probablemente a través de alguno de los siguientes mecanismos evaluados *in vitro*: inhibición de los efectos genotóxicos, aumento de la actividad antioxidante y antiinflamatoria, inhibición de proteasas y la proliferación celular, y modulación de la apoptosis (Neergheen *et al.*, 2010).

Dentro de este análisis macroscópico se analizó también la distribución de las lesiones (placas y pólipos) en el colon. Se encontraron ambos tipos de lesiones tanto en la zona proximal como en la zona distal del colon, siendo esta última la que presentó un mayor número de placas (de 0 a 17) y pólipos (de 0 a 42), mientras que en la zona proximal ambas lesiones se presentaron en menor cantidad (de 0 a 1) (Tablas 5 y 6). Esta distribución de lesiones concuerda con lo reportado por diversos autores (Perše & Cerar, 2010; Tanaka, 2012), quienes reportan que animales inducidos con AOM presentan por lo general un mayor número de pólipos y tumores en la zona distal en comparación con la zona proximal del colon. Esto podría deberse a que la densidad de las lesiones preneoplásicas aumenta progresivamente; es decir, es más alta en el colon medio y distal que en el proximal, lo que concuerda con la ubicación predominante de los adenomas y adenocarcinomas del colon (Park *et al.*, 1997).

Tabla 5. Distribución por zona de placas en ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA y AVAs

Grupo	Total	Zona proximal	Zona distal
Sano	1	100% (1)	0% (0)
Control	10	0% (0)	100% (10)
AVAs + AOM + DSS	17	0% (0)	100% (17)
GA + AOM + DSS	17	6% (1)	94% (16)

AVAs: Extracto fenólico alto en avenantramidas (0.084 mg/día), GA: Germinado de avena (30 mg/día), AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico. Valores entre paréntesis indican cantidad total de placas.

Tabla 6. Distribución por zona de pólipos en ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA y AVAs

Grupo	Total	Zona proximal	Zona distal
Sano	0	0% (0)	0% (0)
Control	42	0% (0)	100% (42)
AVAs + AOM + DSS	5	20% (1)	80% (4)
GA + AOM + DSS	3	0% (0)	100% (3)

AVAs: Extracto fenólico alto en avenantramidas (0.084 mg/día), GA: Germinado de avena (30 mg/día), AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico. Valores entre paréntesis indican cantidad total de pólipos.

5.2.3 Evaluación histopatológica del colon de ratones inducidos con AOM/DSS y tratados con germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVAs

Las imágenes representativas de la evaluación del tejido colónico distal, previamente teñido con hematoxilina-eosina (H&E), se muestran en las Figuras 9 y 10.

En un colon sano se puede observar la estructura tubular característica de las fosas cripticas o criptas de Lieberkühn, además, se aprecian en mayor cantidad las células caliciformes, encargadas de la secreción de mucinas (Kasdagly *et al.*, 2014). El núcleo se dispone en la base celular al quedar desplazado por las vacuolas de moco que ocupan el citoplasma (Figura 9A). En un tejido con adenocarcinoma existe pérdida total de la estructura normal de las criptas, núcleos alargados y estratificados, tal y como lo representa la Figura 9B del grupo control AOM + DSS. Estos cambios estructurales permiten evaluar el efecto de diversas intervenciones terapéuticas. Por ejemplo, el grupo tratado con el extracto fenólico alto en AVAs presentó alteraciones en la arquitectura de las criptas, núcleos más grandes y estratificados y disminución del número de células caliciformes (Figura 10A), similares a las del grupo control AOM + DSS; mientras que, en el grupo tratado con germinado de avena se observó la estructura conservada de las criptas, aunque existió disminución de las células productoras de moco, estratificación y aumento del tamaño de los núcleos (Figura 10B).

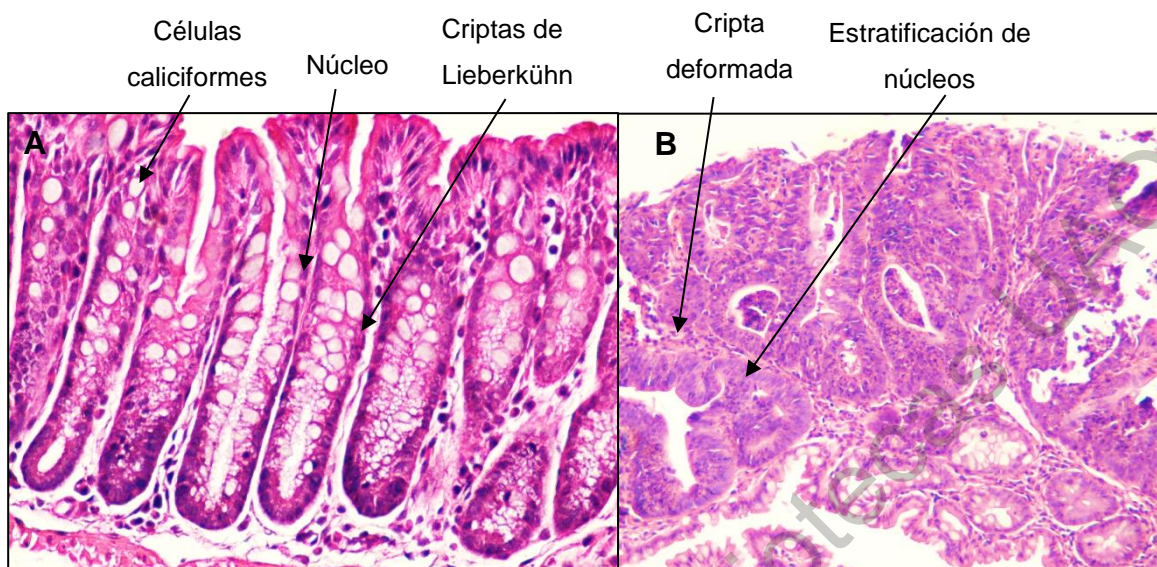


Figura 9. Corte histopatológico transversal de colon distal: A) Grupo sano (300x), B) Grupo control (AOM + DSS) (100x). AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico.

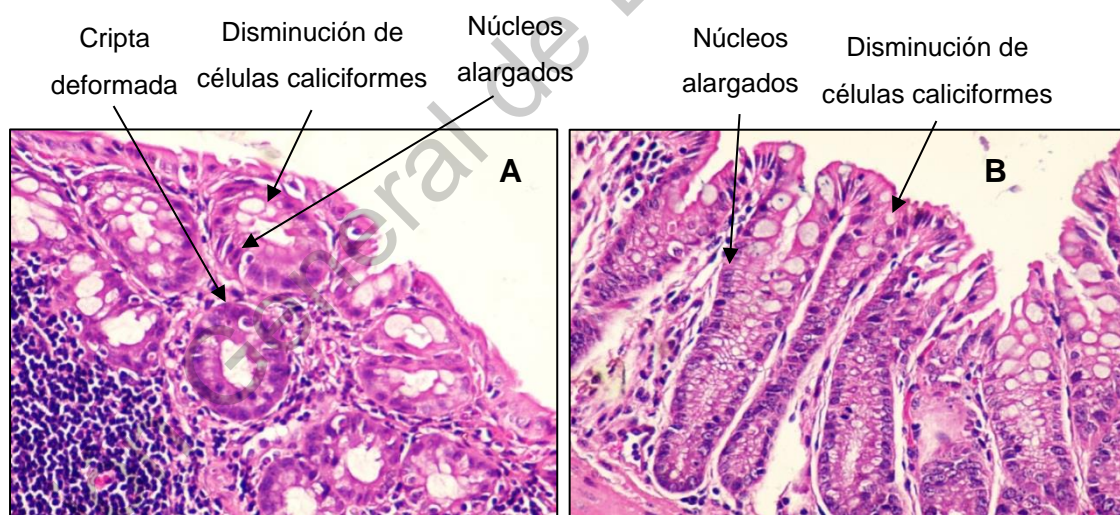


Figura 10. Corte histopatológico transversal de colon distal: A) Grupo AVAs (AVAs + AOM + DSS) (300x), B) Grupo GA (GA + AOM + DSS) (300x). AVA: Extracto fenólico alto en avenantramidas, GA: Germinado de avena, AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico.

Posteriormente, en el presente estudio se realizó el análisis de incidencia de los adenocarcinomas encontrados en los diferentes grupos experimentales (Tabla 7). Como era de esperarse, ninguno de los animales del grupo sano presentó

adenocarcinomas. Por el contrario, el grupo control AOM + DSS presentó la mayor incidencia de adenocarcinomas (80%), seguido del grupo tratado con el extracto fenólico alto en AVAs (50%). El grupo tratado con GA presentó la menor incidencia de adenocarcinomas (38%), y aunque estadísticamente no hubo diferencia significativa, biológicamente es relevante debido a que representa una disminución del 52.5% en la incidencia de adenocarcinomas.

Tabla 7. Incidencia de adenocarcinomas encontrados en tejido colónico de ratones inducidos con AOM + DSS analizado mediante histopatología

Grupo	Total de animales	Incidencia de adenocarcinomas
Sano	10	0.0 % (0)*
Control	10	80.0 % (8)
AVAs + AOM + DSS	8	50.0 % (4)
GA + AOM + DSS	8	38.0 % (3)

AVAs: Extracto fenólico alto en avenantramidas (0,084 mg/día), GA: Germinado de avena (30 mg/día), AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico. *Indica diferencia estadística significativa de acuerdo con la prueba de χ^2 ($\alpha = 0.05$). Valores entre paréntesis indican número de animales con adenocarcinomas.

El germinado de avena es una fuente alimenticia mucho más completa que su extracto fenólico, debido a que proporciona compuestos fenólicos, entre los que destacan las AVAs, y particularmente fibra soluble e insoluble (Tabla 1) y compuestos fenólicos asociados a ésta, que en conjunto podrían estar proporcionando una mayor protección contra el cáncer. Si bien, la germinación disminuyó los contenidos de fibra soluble e insoluble (en un 88% y 44%, respectivamente), los contenidos residuales en el germinado podrían contribuir al efecto quimioprotector observado en nuestros resultados. Además, durante varios años se ha sugerido que el efecto protector de los cereales contra enfermedades no transmisibles, como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y el cáncer, se debe en parte a la presencia de compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos, que están unidos y trabajan sinérgicamente con las fibras dietéticas (Abuajah *et al.*, 2015; Padayachee *et al.*, 2017).

Estudios publicados destacan el efecto del tipo y la cantidad de fibra en el cáncer de colon (Reddy *et al.*, 1992; Shen *et al.*, 2016). Algunas investigaciones destacan un mayor efecto protector de las fibras solubles, ya que éstas promueven el crecimiento de bacterias ácido-lácticas encargadas de fermentar la fibra, lo que incrementa la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC): lactato, butirato, acetato y propionato, de los cuales se ha demostrado que el acetato, propionato y butirato sirven como fuente de energía para el epitelio colónico (Hijová *et al.*, 2012; Bultman, 2014; Shen *et al.*, 2016). Sin embargo, otros estudios rechazan esta teoría pues sustentan que este efecto benéfico se llevaría a cabo únicamente en el ciego, lugar donde se sintetizan los AGCC, y afirman que las fibras insolubles son las que tienen mayor efecto protector ya que suavizan el contenido fecal por su alta capacidad de retención de agua, acortan el tiempo de tránsito intestinal promoviendo el acarreamiento de sustancias carcinogénicas, ajustando así la función intestinal y manteniendo la salud del colon (Yapo y Koffi, 2008).

En recientes estudios se ha comprobado que matrices alimentarias, como cereales integrales y granos enteros, disminuyen el riesgo de padecer cáncer de colon por presentar fibra dietaria, almidón resistente, oligosacáridos, vitaminas, minerales y fitoquímicos con propiedades biológicas (Aune *et al.*, 2011; Ben *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2016).

5.2.4 Efecto del germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVAs sobre el pH en el contenido cecal, colónico y fecal

El pH colónico se ha relacionado con la incidencia de desarrollo de tumores en el colon (Thornton, 1981; Samelson *et al.*, 1985; Nagengast *et al.*, 1995). La Tabla 8 muestra los resultados obtenidos en este parámetro fisiológico que se determinó en contenido cecal y colónico recuperado el día del sacrificio y en muestras de heces recolectadas al final de la semana 15 del modelo experimental. En este estudio se encontró una correlación positiva entre el valor de pH fecal y la incidencia de pólipos ($r = 0.95$, $\alpha = 0.05$). Si bien no se encontró diferencia estadística en los valores de pH cecal, colónico y fecal entre el grupo control AOM + DSS y los grupos tratados

con GA y AVAs ($\alpha = 0.05$), los valores de pH colónico y fecal más elevados se presentaron en el grupo control AOM + DSS; mientras que, los valores de pH cecal, colónico y fecal del grupo tratado con GA fueron más bajos en comparación con el grupo control AOM + DSS. Esto coincide con lo reportado por Busambwa y colaboradores (2015), quienes evaluaron el efecto quimioprotector de germinados de lenteja (*Lens culinaris*) y garbanzo (*Pisum sativum*) amarillo y verde, encontrando que el valor de pH cecal fue mayor en el grupo control AOM + DSS (7.81) que en todos sus tratamientos germinados (7.51, 7.31, 6.93, respectivamente), atribuyendo este efecto benéfico a la fibra soluble de los germinados. Otros autores han establecido que una fuente de fibra proveniente de la dieta puede mejorar factores fisiológicos como la composición de la microbiota intestinal, el pH y la disponibilidad de sustratos (Nuñez-Cuellar *et al.*, 2018), contribuyendo así al efecto quimioprotector de estas fuentes naturales.

El aumento del pH del colon y la actividad de la enzima β -GA está relacionado con la carcinogénesis de colon específica de la DMH y su metabolito AOM, así como en presencia del promotor DSS (Samelson *et al.*, 1985; Perše y Cerar, 2010; Cuellar-Nuñez *et al.*, 2018). Si bien se desconoce el mecanismo por el cual un pH más bajo protege contra esta patología, varios estudios relacionan un pH ácido con la disminución del desarrollo de cáncer y este efecto se ha relacionado con la inhibición de la transformación bacteriana de los ácidos biliares primarios a secundarios (Nagengast *et al.*, 1995; Campbell *et al.* 1997; Zhao *et al.*, 2011). Los ácidos biliares primarios que no son absorbidos en el íleon (intestino delgado) son deshidroxilados en el intestino grueso por la microbiota colónica, esto producirá ácidos biliares secundarios (ácido desoxicólico y litocólico) que pueden actuar como promotores de la tumorigénesis debido a sus efectos mutagénicos en la mucosa colónica (Nagengast *et al.*, 1995). Sin embargo, en un ambiente ácido (o menos alcalino), el metabolismo bacteriano (deshidroxilación) de las sales biliares puede reducirse (Thornton, 1981).

Tabla 8. Valores de pH en contenido cecal, colónico y muestras de heces en ratones tratados con GA y AVAs e inducidos con AOM + DSS.

Grupo	pH		
	Cecal	Colónico	Fecal
Sano	7.12 ± 0.04 ^b	7.22 ± 0.07 ^a	7.22 ± 0.13 ^b
Control	7.29 ± 0.04 ^{ab}	7.33 ± 0.04 ^a	7.77 ± 0.12 ^a
AVAs + AOM + DSS	7.46 ± 0.05 ^a	7.31 ± 0.10 ^a	7.67 ± 0.11 ^a
GA + AOM + DSS	7.13 ± 0.07 ^b	7.09 ± 0.12 ^a	7.62 ± 0.22 ^a

AVAs: Extracto fenólico alto en avenantramidas (0.084 mg/día), GA: Germinado de avena (30 mg/día), AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico. Los resultados se expresan como la media ± EE (n=10 para sano y control, n=8 para AVAs y GA en contenido cecal y colónico; n=4 para sano y control, n=3 para AVAs y GA (en pool de muestras) para contenido fecal). Diferente letra indica diferencia estadística según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

5.2.5 Efecto del germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVA sobre la actividad de β -glucuronidasa (β -GA) en el contenido cecal, colónico y fecal

Como se mencionó previamente, la actividad de la enzima β -GA se ha relacionado con el efecto carcinogénico del compuesto AOM en presencia del promotor DSS (Cuellar-Nuñez *et al.*, 2018). Por lo anterior, se evaluó la actividad de la enzima bacteriana β -GA en contenido cecal y colónico recuperado durante el sacrificio de los animales, así como en muestras de heces recolectadas al final de la semana 15. El efecto de los tratamientos con germinado de avena y su extracto fenólico sobre la actividad de esta enzima se presenta en la Figura 11.

El grupo control AOM +DSS presentó un incremento del 44, 76 y 31% en la actividad de β -GA en el contenido cecal, colónico y fecal, respectivamente, en comparación con el grupo sano, lo que coincide con lo reportado por Cuellar-Nuñez y colaboradores (2018). El tratamiento con el extracto fenólico AVAs redujo significativamente ($\alpha = 0.05$) la actividad de esta enzima bacteriana en el contenido cecal y colónico (26% y 12%, respectivamente). Por su parte, el tratamiento con germinado de avena mostró un mayor efecto al disminuir significativamente ($\alpha = 0.05$) la actividad de β -GA en un 22, 27 y 57% en el contenido cecal, colónico y fecal, respectivamente.

Este comportamiento coincide con lo reportado por Nakanishi y colaboradores (2003), quienes observaron una disminución significativa en la actividad de β -GA en el contenido cecal y colónico en un modelo animal inducido con AOM y suplementado con almidón alto en amilosa y una cepa comercial de *C. butyricum*. Por el contrario, la administración de un germinado de cebada (*Hordeum vulgare*) (GC) no disminuyó la actividad de β -GA en contenido cecal respecto al grupo control AOM, lo que se atribuyó a que la concentración del metabolito tóxico MAM a nivel del colon no cambió en ambos grupos; por lo tanto, el efecto preventivo del GC sobre la incidencia de desarrollo de lesiones preneoplásicas no fue causada por la disminución en la actividad de β -GA (Kanauchi *et al.*, 2008).

De manera general, en el presente estudio se encontró una correlación positiva entre la actividad de β -GA cecal con el promedio de pólipos y adenocarcinomas ($r = 0.98$, $\alpha = 0.05$), lo que sustenta la teoría de que la actividad de esta enzima está implicada en el desarrollo de cáncer de colon (Cheng *et al.*, 2013), por lo que modularla a través de intervenciones dietarias se confirma como una estrategia eficiente para la prevención de esta patología.

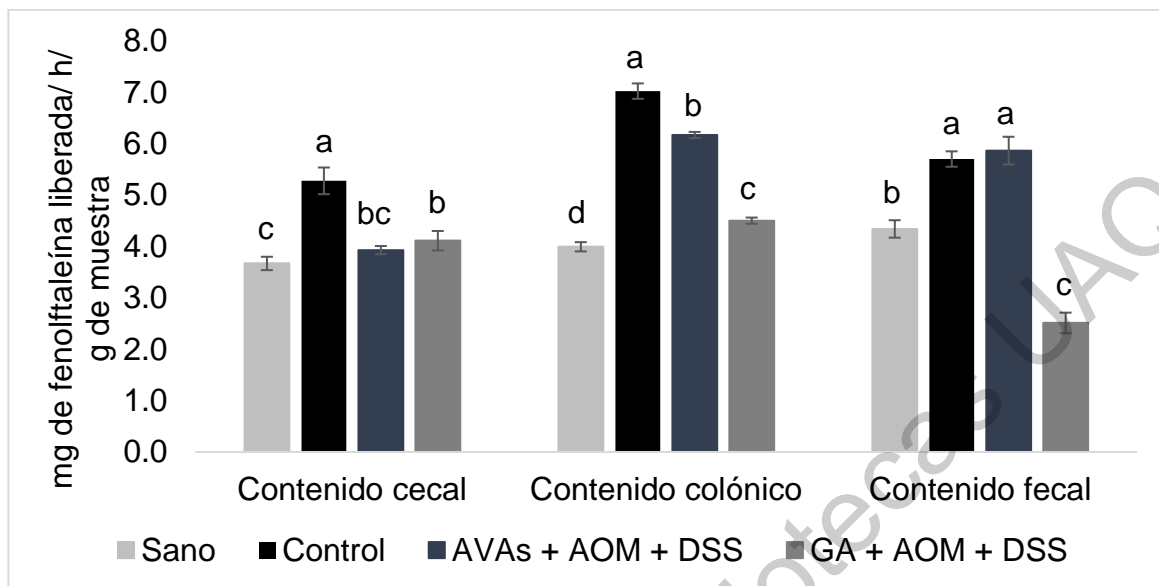


Figura 11. Efecto de los tratamientos GA (30 mg/día) y AVAs (0.084 mg/día) en la actividad de la enzima β -glucuronidasa (β -GA) en muestras de contenido cecal, colónico y fecal de ratones inducidos con AOM + DSS. AVAs: Extracto fenólico alto en avenantramidas, GA: Germinado de avena, AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico. Los resultados se expresan como la media \pm EE (n=10 para sano y control, n=8 para AVAs y GA en contenido cecal y colónico; n=4 para sano y control, n=3 para AVAs y GA (en pool de muestras) para contenido fecal). Diferente letra indica diferencia estadística según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

La β -GA es relevante en la carcinogénesis colónica porque es una enzima que tiene la capacidad de hidrolizar conjugados de glucurónido y, como consecuencia, puede liberar metabolitos carcinogénicos activos al lumen intestinal (Fiala, 1977; Perše & Cerar, 2010). En el caso particular del AOM, éste se metaboliza a metilazoximetanol (MAM) y se conjuga con ácido glucurónico en el hígado. Posteriormente, los conjugados de glucurónido de MAM se excretan en la bilis y, al llegar a colon, pueden desconjugarse y reactivarse por la enzima bacteriana β -glucuronidasa (Pozharisski *et al.*, 1975). Esta desconjugación permite que MAM se absorba en colon y continúe metabolizándose hasta un compuesto carcinógeno reactivo (ión metildiazonio) responsable de la metilación de bases de ADN, lo que traerá como resultado un aumento en las mutaciones de las células epiteliales del colon y la subsecuente formación de tumores en el intestino grueso (Suaeyun *et al.*, 1997; Perše & Cerar, 2010).

Se ha reportado que inhibir o disminuir la β -GA suprime la carcinogénesis inducida por AOM en el colon de ratas y ratones (Takada *et al.*, 1982; Yoshimi *et al.*, 2000). La avena es rica en fibra dietética y puede considerarse como la mejor fuente de β -glucanos (Dodevska *et al.*, 2013), componente activo al que se le ha atribuido los beneficios fisiológicos observados tras la ingesta de avena (Shen *et al.*, 2012). El germinado de avena con el que se trabajó en este proyecto posee un 33% de fibra dietética total (datos no publicados de Rosas-Pérez). La fibra dietética fermentable puede desempeñar un papel prebiótico en el intestino, al promover la proliferación de microorganismos probióticos (Shen *et al.*, 2012). Se ha reportado que la fibra soluble de la avena, destacando los β -glucanos, promueve el aumento de poblaciones benéficas en el intestino grueso como *Bifidobacterias* y *Lactobacilos* (Mitsou *et al.*, 2010; Ji-Lin *et al.*, 2014), capaces de reducir la actividad de las enzimas metabólicas bacterianas como β -glucosidasa, β -GA y ureasa (Roberfroid *et al.*, 2010); además de reducir el número de algunas cepas de *E. coli* y *Clostridium sp.*, comúnmente conocidas por su alta β -GA (Wang y Gibson, 1993). Por su parte, los fenoles presentes en cereales como la avena también contribuyen a mantener un equilibrio entre las poblaciones bacterianas benéficas y las patógenas (homeostasis), lo que ayuda a modular la actividad de β -GA (Feng *et al.*, 2018).

5.2.6 Efecto del germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVAs sobre la concentración de glutatión reducido (GSH) en eritrocitos

La concentración de GSH en eritrocitos lisados el día del sacrificio se evaluó en los diversos grupos del modelo experimental (Tabla 9). El nivel de GSH se incrementó significativamente en los animales inducidos con AOM + DSS en comparación con los animales del grupo sano (100%). Es importante resaltar que el contenido de GSH alcanzó valores casi normales en los grupos tratados con GA y AVAs.

Se ha reportado que un aumento en el estrés oxidativo y/o una disminución de la capacidad antioxidante están implicados en el desarrollo de enfermedades no transmisibles como el cáncer (Das, 2002). De hecho, el AOM es un procarcinógeno que sufre metabolismo oxidativo en el hígado, generando la producción de

electrófilos cancerígenos activos (ion diazonio) que se libera a la circulación y eventualmente conduce a la peroxidación de lípidos en plasma y glóbulos rojos (eritrocitos) (Bobek *et al.*, 2000). Por el contrario, el GSH es la defensa principal contra el estrés oxidativo y su función antioxidante se basa en su capacidad para eliminar los radicales libres, reducir los peróxidos y participar como co-sustrato en la actividad de las enzimas dependientes de GSH (Aquilano *et al.*, 2014). Tal y como lo reporta Matić y colaboradores (2019), una menor concentración de GSH en los grupos tratados con GA y AVAs sugiere que éste pudo haber sido utilizado como un antioxidante para eliminar radicales libres y metabolitos que se conjugan con GSH antes de su excreción para contrarrestar la peroxidación lipídica y normalizar el estrés oxidativo en la circulación sanguínea.

En este estudio se encontró una correlación positiva entre el contenido de GSH en eritrocitos con la media de pólipos y adenocarcinomas ($r = 0.99$ y $r = 0.97$, $\alpha = 0.05$, respectivamente), lo que sugiere que los mecanismos de defensa antioxidantes endógenos están estrechamente relacionados con la incidencia de lesiones tempranas y el desarrollo de adenocarcinomas en cáncer de colon.

Tabla 9. Concentración de GSH en eritrocitos de ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA y AVAs

Grupo	GSH (μM /mg de proteína)
Sano	1.40 ± 0.10^b
Control	2.81 ± 0.43^a
AVAs + AOM + DSS	1.39 ± 0.15^b
GA + AOM + DSS	1.34 ± 0.24^b

AVAs: Extracto fenólico alto en avenantramidas (0.084 mg/día), GA: Germinado de avena (30 mg/día), AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico. Los resultados se expresan como la media \pm EE (n=10 para sano y control, n=8 para AVAs y GA). Diferente letra indica diferencia estadística según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

5.2.7 Efecto del germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVA sobre la actividad de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado

Un mecanismo ampliamente aceptado en la quimioprevención del cáncer por fitoquímicos de la dieta es a través de la inducción de las enzimas de fase 2, también conocidas como enzimas destoxicantes y/o antioxidantes, entre las que se encuentran las enzimas GST y NQO1, a través de la activación de las vías de señalización de Nrf2, un mecanismo altamente aceptado en la prevención del cáncer (Neergheen *et al.*, 2010).

En este estudio nos propusimos evaluar el efecto del GA y su extracto fenólico AVAs sobre la actividad de dichas enzimas. La Figura 12 muestra los resultados obtenidos de la actividad de GST en el hígado de los ratones en estudio, observándose una mayor actividad en el grupo control AOM + DSS, en comparación con el grupo sano (7% más); resultado que puede atribuirse en respuesta al estrés oxidativo generado por el AOM (Fiala, 1977; Bobek *et al.*, 2000; Pool-Zobel *et al.*, 2005). De acuerdo con la prueba de Tukey, no existe diferencia estadística ($\alpha = 0.05$) en la actividad de GST del grupo sano y del grupo tratado con AVAs, lo que sugiere la capacidad de dicho tratamiento en normalizar o restaurar la actividad de esta enzima en hígado. Por su parte, el tratamiento con GA incrementó la actividad de GST en un 15 y 23%, en comparación con el grupo control AOM + DSS y sano, respectivamente.

Es importante mencionar que la inducción de las enzimas GST hepáticas por compuestos bioactivos o sustancias anticancerígenas permite a los animales experimentales tolerar la exposición a carcinógenos (Roebuck *et al.*, 1991; Hayes *et al.*, 1996). Por lo tanto, la inducción de GST mediante compuestos provenientes de la dieta mejora el sistema de defensa de detoxificación y antioxidante del tejido colónico y, como consecuencia, controla o retarda el desarrollo del cáncer, al reducir tanto la exposición a los metabolitos activos de los carcinógenos como al estrés oxidativo derivado de la biotransformación de los mismos que conducen a un daño molecular en las células relacionado con diversas enfermedades degenerativas

asociadas a la exposición a tóxicos o estrés oxidativo, incluido el cáncer (Cerutti, 1985).

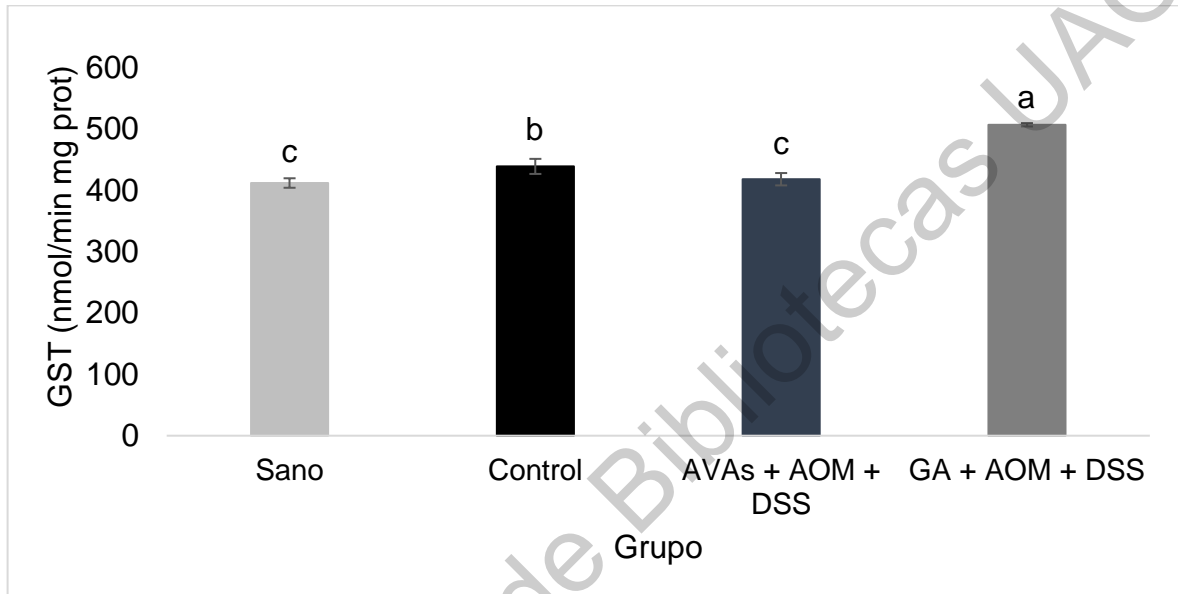


Figura 12. Actividad enzimática de GST en hígado de ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA (30 mg/ día) y AVAs (0.084 mg/ día). AVAs: Extracto fenólico alto en avenantramidas, GA: Germinado de avena, AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico. Los resultados se expresan como la media \pm EE (n=5 para sano y control, n=8 para AVAs y GA). Diferente letra indica diferencia estadística según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Estos resultados sugieren que el consumo de GA, o sus componentes, presentaron una mayor activación de la vía de señalización de Nrf2, en comparación con el tratamiento con AVAs, lo que confirma los efectos antioxidantes, antiproliferativos y antígenotóxicos de los compuestos fenólicos de la avena (Eudes *et al.*, 2011), en sinergia con los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de los β -glucanos (Suchecka *et al.*, 2016), mecanismos importantes para la prevención y el tratamiento del cáncer.

5.2.8 Efecto del germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVAs sobre la actividad de glutatión-S-transferasa (GST) en colon

Los resultados de la actividad de GST en colon se muestran en la Figura 13. Primeramente, se observó que la actividad de esta enzima es menor en el colon de animales sanos en comparación con la actividad hepática, lo cual predispone al colon a los efectos deleteros/genotóxicos del estrés oxidativo (Pool-Zobel *et al.*, 2005).

El grupo control AOM + DSS mostró un incremento del 64% en la actividad de GST en comparación con el grupo sano. Este aumento refleja que, efectivamente, el órgano blanco del AOM es el colon, el cual genera estrés oxidativo en dicho órgano y, por lo tanto, se incrementa la actividad de enzimas de fase 2, como GST y NQO1, como un mecanismo para hacer frente a los efectos del estrés oxidativo generado (Manju *et al.*, 2005), y detoxificar los metabolitos carcinogénicos del AOM (Pool-Zobel *et al.*, 2005; Begleiter *et al.*, 2009).

Si bien el grupo control AOM + DSS mostró la mayor actividad de GST en colon, los animales de los grupos tratados con GA y AVAs mostraron una menor incidencia de lesiones macroscópicas (Tablas 3 y 4) y de adenocarcinomas (Tabla 7) en comparación con aquellos del grupo control.

Como se mencionó previamente, la expresión de sistemas antioxidantes está regulada a nivel transcripcional por el factor de transcripción Nrf2. Sin embargo, la sobreexpresión de Nrf2 y, por lo tanto, la sobreexpresión de los sistemas antioxidantes en etapas avanzadas del CCR es contraproducente (Gonzalez-Donquiles *et al.*, 2017), ya que conduce a la conjugación y excreción de las intervenciones quimioterapéuticas, disminuyendo así su efectividad.

De acuerdo con la prueba de Tukey, no se observó diferencia estadística ($\alpha = 0.05$) en la actividad de GST en el colon del grupo sano y de ambos grupos con tratamiento (GA y AVAs). Este resultado es relevante ya que la normalización en la actividad de dicha enzima sugiere que ambos tratamientos podrían estar neutralizando los efectos del estrés oxidativo a nivel de colon generados

inicialmente por el metabolismo oxidativo del AOM e inflamación inducida con DSS y, posteriormente, por la inflamación persistente en este modelo de enfermedad (Fiala, 1977; Sohn *et al.*, 1991; Tanaka, 2009). En cuanto al análisis de correlación de Pearson, se observó una correlación positiva ($r = 0.98$, $\alpha = 0.05$) entre la actividad de GST en colon con el promedio de pólipos, así como con la media de adenocarcinomas ($r = 0.97$, $\alpha = 0.05$), lo que sustenta la idea de que la modulación de esta enzima en colon contribuye a disminuir el desarrollo de lesiones tempranas y adenocarcinomas (Neerghen *et al.*, 2010).

Aunado a lo anterior, los macronutrientes, micronutrientes y otros compuestos químicos presentes en los cereales pueden tener la capacidad de inhibir la tumorigénesis a través de diversos mecanismos (Surh, 2003). Además, Busambwa y colaboradores (2015) argumentan que la germinación de las semillas mejora dramáticamente la calidad de los nutrientes, contribuyendo a la reducción o prevención del daño a macromoléculas, disminuyendo la incidencia de cáncer.

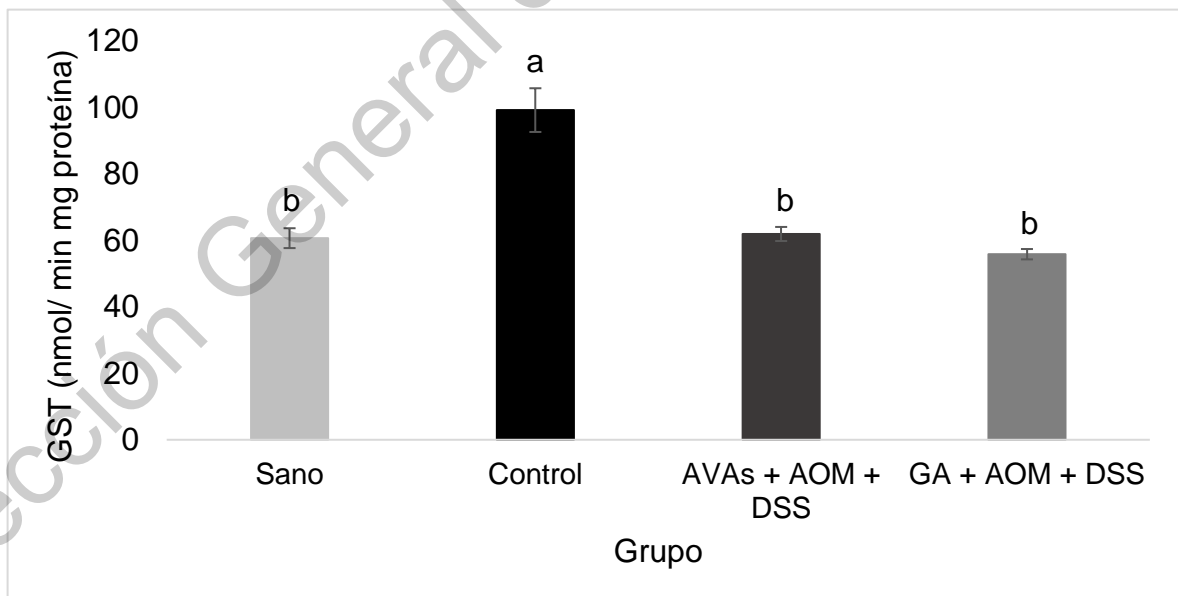


Figura 13. Actividad enzimática de GST en colon de ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA (30 mg/día) y AVAs (0.084 mg/día). AVAs: Extracto fenólico alto en avenantramidas, GA: Germinado de avena, AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico. Los resultados se expresan como la media \pm EE ($n=5$ para sano y control, $n=8$ para AVAs y GA). Diferente letra indica diferencia estadística según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

5.2.9 Efecto del germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVA sobre la actividad de quinona óxidoreductasa (NQO1) en hígado

Otra enzima importante en la inhibición del cáncer de colon en diferentes etapas de la tumorigénesis es la enzima quinona óxidoreductasa (NQO1). En la Figura 14 se muestran los resultados de la actividad de esta enzima evaluada en el hígado de los animales en estudio.

El grupo control AOM + DSS mostró un incremento del 7% en la actividad de esta enzima en comparación con el grupo sano; este mismo aumento se observó con la enzima GST en dicho órgano. Esto, como ya se mencionó, puede deberse a que el hígado está respondiendo al estrés oxidativo generado por el metabolismo del AOM (Fiala, 1977; Sohn *et al.*, 1991; Pool-Zobel *et al.*, 2005).

En lo que respecta a los grupos con tratamiento, se presentó el mismo comportamiento observado con GST. El tratamiento con AVAs normalizó o restauró la actividad de NQO1 a sus niveles basales; mientras que, el tratamiento con GA incrementó un 52% su actividad en comparación con el grupo control. Aunado a lo anterior, el grupo tratado con GA mostró una menor incidencia de adenocarcinomas en comparación con el grupo control, lo que apunta a que NQO1 puede inhibir la carcinogénesis colónica en etapas posteriores a la iniciación a través de la regulación transcripcional de NQO1 por el factor Nrf2 (Begleiter *et al.*, 2009).

Varios estudios han demostrado que la enzima NQO1 puede estabilizar al gene supresor de tumores p53 e incrementar la apoptosis en células humanas de cáncer de colon (Asher *et al.*, 2001) y células de ratón (Long *et al.*, 2002); esto podría mejorarse mediante la inducción de NQO1 a través de compuestos provenientes de la dieta, como los fitoquímicos (Rao *et al.*, 1993). Además, se observó una correlación positiva ($r = 0.98$, $\alpha = 0.05$) entre las actividades hepáticas de GST y NQO1, lo que sugiere que ambos tratamientos logran tener el mismo efecto sobre ambas enzimas hepáticas en este modelo animal.

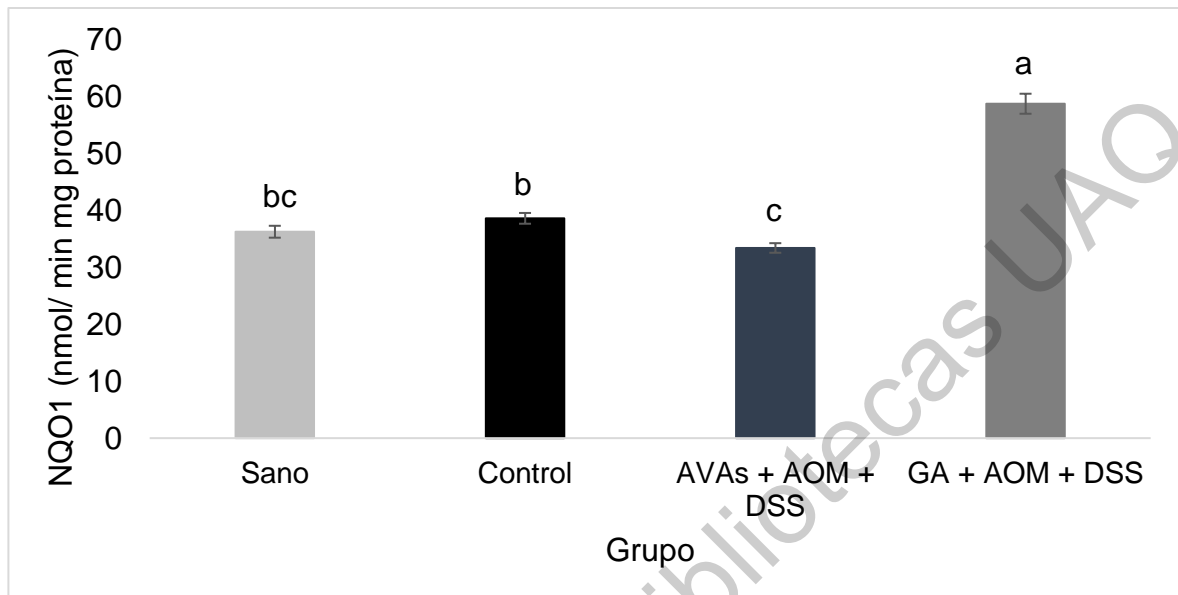


Figura 14. Actividad enzimática de NQO1 en hígado de ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA (30 mg/día) y AVAs (0.084 mg/día). AVAs: Extracto fenólico alto en avenantramidas, GA: Germinado de avena, AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico. Los resultados se expresan como la media \pm EE (n=5 para sano y control, n=8 para AVAs y GA). Diferente letra indica diferencia estadística según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

5.2.10 Efecto del germinado de avena y su extracto fenólico alto en AVAs sobre la actividad de quinona óxidorreductasa (NQO1) en colon

La actividad de NQO1 en colon presentó un comportamiento similar a lo observado con GST en dicho órgano. La Figura 15 muestra los resultados hallados en la actividad de NQO1 en el colon de los animales en estudio.

El grupo control AOM + DSS presentó la mayor actividad de esta enzima, la cual aumentó un 62% en comparación con el grupo control. Tal como ya se discutió anteriormente, NQO1 incrementa su actividad en colon para atacar al estrés oxidativo generado (Manju *et al.*, 2005), y detoxificar los metabolitos carcinogénicos del AOM (Pool-Zobel *et al.*, 2005; Begleiter *et al.*, 2009).

Por su parte, ambos tratamientos (GA y AVAs) lograron normalizar los niveles de NQO1, siendo el grupo tratado con GA estadísticamente diferente al grupo sano y

enfermo de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). En el germinado de avena, al igual que en su extracto fenólico, están presentes compuestos fenólicos de la avena que han demostrado tener propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Russell *et al.*, 2008; Meydani 2009; Rose 2014).

En los cereales, la mayoría de dichos compuestos se encuentran unidos a componentes de la fibra dietética que impiden su absorción en el tracto gastrointestinal (GI) superior (Zhao & Moghadasian, 2008). Sin embargo, esterases bacterianas en el tracto GI inferior pueden liberar de sus conjugados de fibra dietética a una parte de estos compuestos, con lo que se biotransforman rápidamente, generando metabolitos con una actividad biológica importante. Aunque las esterases bacterianas liberan una porción considerable de compuestos fenólicos conjugados, otros permanecen no disponibles biológicamente. Sin embargo, la presencia física de altas concentraciones de compuestos fenólicos ligados en el tracto GI puede impartir varios beneficios.

Si bien el cuerpo tiene mecanismos de defensa naturales contra la oxidación de los radicales libres, el lumen del tracto GI no está protegido en la misma medida. Además, en algunas circunstancias, como durante la inflamación, los neutrófilos producen radicales libres (por ejemplo, HNO_3) que pueden provocar estrés oxidativo en la mucosa, peroxidación de lípidos de la membrana y daño tisular (Damiani *et al.*, 2007; Naito *et al.*, 2007). La presencia de antioxidantes ligados en el lumen intestinal, como los de los granos enteros, pueden proteger el epitelio intestinal del daño de los radicales libres (Vitaglione *et al.*, 2008). Esto está respaldado por estudios que demuestran que la presencia física de ácido ferúlico en el lumen GI, administrado a través de un enema, reduce la inflamación en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Dong *et al.*, 2003).

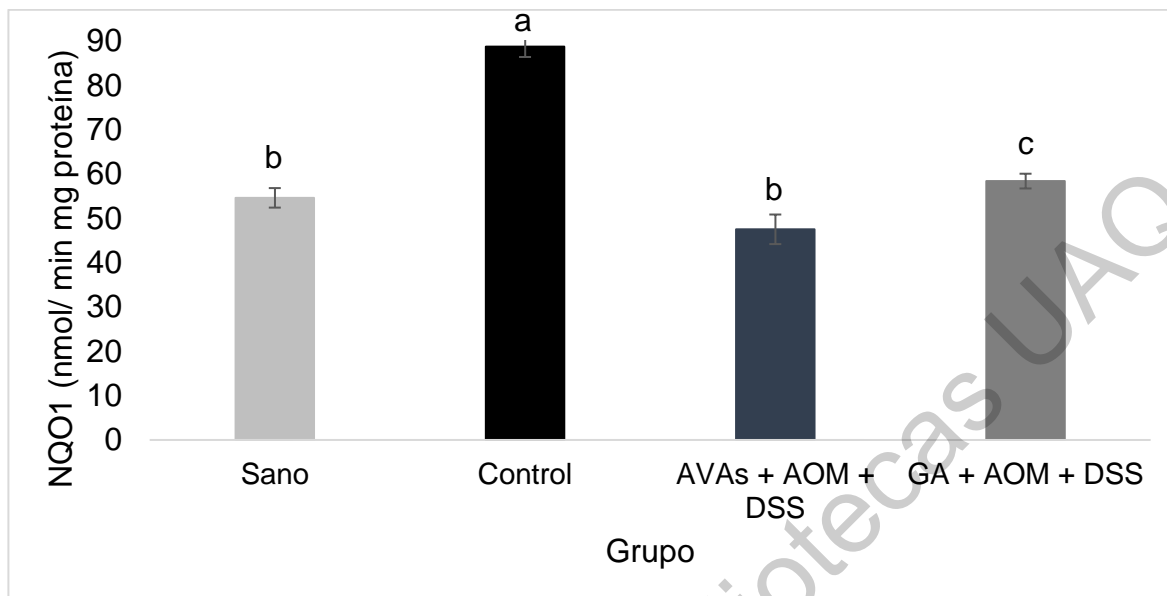


Figura 15. Actividad enzimática de NQO1 en colon de ratones inducidos con AOM + DSS y tratados con GA (30 mg/día) y AVAs (0.084 mg/día). AVAs: Extracto fenólico alto en avenantramidas, GA: Germinado de avena, AOM: Azoximetano, DSS: Dextrano sulfato sódico. Los resultados se expresan como la media \pm EE (n=5 para sano y control, n=8 para AVAs y GA). Diferente letra indica diferencia estadística según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

En este estudio se encontró una correlación positiva entre la actividad de GST y NQO1 en colon con el contenido de GSH en eritrocitos ($r = 0.99$ y $r = 0.96$, $\alpha = 0.05$, respectivamente), lo que sugiere que los mecanismos de defensa antioxidantes endógenos se activan en conjunto y trabajan de manera sinérgica para ofrecer una protección global frente al daño causado por sustancias tóxicas (Bhattacharyya *et al.*, 2014).

A manera de resumen, podemos concluir que ambos tratamientos normalizan la actividad de las enzimas GST y NQO1 en colon, lo que sugiere que ambos podrían estar neutralizando los efectos del estrés oxidativo a nivel de colon generados inicialmente por el metabolismo oxidativo del AOM e inflamación inducida con DSS y, posteriormente, por la inflamación persistente en este modelo de enfermedad.

En hígado, el efecto de los tratamientos fue similar para ambas enzimas GST y NQO1; el tratamiento con AVAs normalizó la actividad de GST, mientras que el GA indujo su actividad. Estos resultados sugieren que el GA es más eficiente para

activar la vía de señalización de Nrf2, en comparación con el tratamiento con AVAs, lo que confirma que los compuestos fenólicos de la avena junto con los β -glucanos pueden estar actuando de manera sinérgica, lo que sugiere que el GA ofrezca una mayor protección para la prevención y el tratamiento del cáncer (Eudes *et al.*, 2011; Suchecka *et al.*, 2016).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VI. CONCLUSIONES

El consumo de GA y su extracto fenólico alto en AVAs protegen contra el desarrollo de adenocarcinomas en ratones inducidos con AOM/DSS. El mayor efecto protector y biológicamente significativo se observó con el consumo de GA (reducción del 52.5% con GA en comparación del 37.5% con AVAs); esto sugiere que otros componentes bioactivos, además de los compuestos fenólicos, podrían estar involucrados en el mecanismo de quimioprotección contra el cáncer de colon, tal podría ser el caso de la fibra dietética del GA y/o de los compuestos fenólicos asociados a ésta.

El germinado de avena disminuyó significativamente la actividad de la enzima β -GA en el contenido cecal, colónico y fecal. Además, se observó una correlación positiva entre la actividad de β -GA cecal con el promedio de pólipos y adenocarcinomas, lo que sugiere que, en este modelo animal, el avance y desarrollo de lesiones malignas (adenocarcinomas) puede estar fuertemente influenciado por esta enzima; debido a que una menor actividad de β -GA puede disminuir la reactivación del procarcinógeno en el colon (MAM) y, por lo tanto, menor es el daño ocasionado a las células.

El efecto quimioprotector de GA y AVAs está mediado por la normalización de las enzimas GST y NQO1 en colon, lo que permite neutralizar el EO generado por el AOM en dicho órgano, detoxificar los metabolitos carcinogénicos de éste y mantener el equilibrio redox en el colon. Mientras que, la inducción de ambas enzimas en hígado por el consumo de GA contribuye a una mayor conjugación y detoxificación de los metabolitos del carcinógeno AOM y, aunado a su efecto inhibitorio sobre β -GA en el colon, al mayor efecto quimioprotector de GA contra el desarrollo de adenocarcinomas.

VII. REFERENCIAS

- Aborus, N. E., Šaponjac, V. T., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Hidalgo, A., Vulić, J., & Šeregelj, V. (2018). Sprouted and Freeze-Dried Wheat and Oat Seeds—Phytochemical Profile and *in vitro* Biological Activities. *Chemistry & Biodiversity*, 15(8), e1800119.
- Abuajah, C. I., Ogbonna, A. C., & Osuji, C. M. (2015). Functional components and medicinal properties of food: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2522-2529.
- Aquilano, K., Baldelli, S., & Ciriolo, M. R. (2014). Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in pharmacology*, 5, 196.
- Asher, G., Lotem, J., Cohen, B., Sachs, L., & Shaul, Y. (2001). Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3), 1188-1193.
- Astler, V. B., & Coller, F. A. (1954). The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Annals of Surgery*, 139(6), 846-852.
- Aune, D., Chan, D. S., Lau, R., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., & Norat, T. (2011). Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ*, 343, d6617.
- Begleiter, A., Sivananthan, K., Lefas, G. M., Maksymiuk, A. W., & Bird, R. P. (2009). Inhibition of colon carcinogenesis by post-initiation induction of NQO1 in Sprague-Dawley rats. *Oncology reports*, 21(6), 1559-1565.
- Bei, Q., Liu, Y., Wang, L., Chen, G., & Wu, Z. (2017). Improving free, conjugated, and bound phenolic fractions in fermented oats (*Avena sativa* L.) with *Monascus anka* and their antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 32, 185-194.
- Ben, Q., Sun, Y., Chai, R., Qian, A., Xu, B., & Yuan, Y. (2014). Dietary fiber intake reduces risk for colorectal adenoma: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 146(3), 689-699.
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., & Crowe, S. E. (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological reviews*, 94(2), 329-354.

- Biel, W., Bobko, K., & Maciorowski, R. (2009). Chemical composition and nutritive value of husked and naked oats grain. *Journal of Cereal Science*, 49(3), 413-418.
- Bingham, S. A. (1990). Mechanisms and experimental and epidemiological evidence relating dietary fibre (non-starch polysaccharides) and starch to protection against large bowel cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, 49(2), 153-171.
- Bobek, P., Galbavý, Š., & Mariassyova, M. (2000). The effect of red beet (*Beta vulgaris* var. *rubra*) fiber on alimentary hypercholesterolemia and chemically induced colon carcinogenesis in rats. *Food/Nahrung*, 44(3), 184-187.
- Boivin, G. P., Washington, K., Yang, K., Ward, J. M., Pretlow, T. P., Russell, R., & Pitot, H. C. (2003). Pathology of mouse models of intestinal cancer: Consensus report and recommendations. *Gastroenterology*, 124(3), 762-777.
- Boz, H. (2015). Phenolic amides (avenanthramides) in oats- A review. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(5), 399-404.
- Brennan, C. S., & Cleary, L. J. (2005). The potential use of cereal (1→3, 1→4)-β-D-glucans as functional food ingredients. *Journal of Cereal Science*, 42(1), 1-13.
- Brower, V. (1998). Nutraceuticals: poised for a healthy slice of the healthcare market? *Nature Biotechnology*, 16(8), 728.
- Bruneau, A., Baylatry, M. T., Joly, A. C., & Sokol, H. (2018). Le microbiote intestinal: quels impacts sur la carcinogénèse et le traitement du cancer colorectal? *Bulletin du Cancer*, 105(1), 70-80.
- Bultman, S. J. (2014). Molecular pathways: gene–environment interactions regulating dietary fiber induction of proliferation and apoptosis via butyrate for cancer prevention. *Clinical Cancer Research*, 20(4), 799-803.
- Busambwa, K., Verghse, M., Cebert, R. M., Dalrymple, L., Allen, J., Boateng, J., ... & Walker, L. T. (2015). Lentils, Green and Yellow Split-Peas (Sprouted and Non-Sprouted) on Azoxymethane-Induced Colon Carcinogenesis. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 10(2), 36-48.
- Calvo, A. (Ed.). (2015). *Biología celular biomédica*. Pamplona, España: Elsevier.

- Campbell, J. M., Fahey Jr, G. C., & Wolf, B. W. (1997). Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *The Journal of Nutrition*, 127(1), 130-136.
- Cerutti, P. A. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, 227(4685), 375-381.
- Cheng, C. M., Chen, F. M., Lu, Y. L., Tzou, S. C., Wang, J. Y., Kao, C. H., Liao, K. W, Cheng, T. C., Chuang, C. H., Chen, B. M., Roffler, S., & Cheng, T. L. (2013). Expression of β -glucuronidase on the surface of bacteria enhances activation of glucuronide prodrugs. *Cancer Gene Therapy*, 20(5), 276–281.
- Collins, F. W. (1989). Oat phenolics: avenanthramides, novel substituted N-cinnamoylanthranilate alkaloids from oat groats and hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(1), 60-66.
- Corpet, D. E., & Taché, S. (2002). Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. *Nutrition and Cancer*, 43(1), 1-21.
- Cuellar-Nuñez, M. L., Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Gallegos-Corona, M. A., De Mejía, E. G., & Loarca-Piña, G. (2018). Physicochemical and nutraceutical properties of moringa (*Moringa oleifera*) leaves and their effects in an *in vivo* AOM/DSS-induced colorectal carcinogenesis model. *Food Research International*, 105, 159-168.
- Damiani, C. R., Benetton, C. A., Stoffel, C., Bardini, K. C., Cardoso, V. H., Di Giunta, G., Pinho, R. A., Dal-Pizzol F., & Streck, E. L. (2007). Oxidative stress and metabolism in animal model of colitis induced by dextran sulfate sodium. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22(11), 1846-1851.
- Das, U. N. (2002). A radical approach to cancer. *Medical Science Monitor*, 8(4), RA79-92.
- De Bruijn, W. J., van Dinteren, S., Gruppen, H., & Vincken, J. P. (2019). Mass spectrometric characterisation of avenanthramides and enhancing their production by germination of oat (*Avena sativa*). *Food Chemistry*, 277, 682-690.
- 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*, 10.

- Delker, D. A., McKnight III, S. J., & Rosenberg, D. W. (1998). The role of alcohol dehydrogenase in the metabolism of the colon carcinogen methylazoxymethanol. *Toxicological Sciences*, 45(1), 66-71.
- Dimberg, L. H., Gissén, C., & Nilsson, J. (2005). Phenolic compounds in oat grains (*Avena sativa* L.) grown in conventional and organic systems. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 34(4), 331-337.
- Dodevska, M. S., Djordjevic, B. I., Sobajic, S. S., Miletic, I. D., Djordjevic, P. B., & Dimitrijevic-Sreckovic, V. S. (2013). Characterisation of dietary fibre components in cereals and legumes used in Serbian diet. *Food Chemistry*, 141(3), 1624-1629.
- Dong, W. G., Liu, S. P., Yu, B. P., Wu, D. F., Luo, H. S., & Yu, J. P. (2003). Ameliorative effects of sodium ferulate on experimental colitis and their mechanisms in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 9(11), 2533.
- Dulal, S., & Keku, T. O. (2014). Gut microbiome and colorectal adenomas. *Cancer Journal*, 20(3), 225.
- Eggler, A. L., Gay, K. A., & Mesecar, A. D. (2008). Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(S1), S84-S94.
- Ellman, G. (1985). Determination of glutathione. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 82, 70-79.
- Eudes, A., Baidoo, E. E., Yang, F., Burd, H., Hadi, M. Z., Collins, F. W., Loqué, D. (2011). Production of tranilast [N-(3',4'-dimethoxycinnamoyl)-anthranilic acid] and its analogs in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), 989-1000.
- Eudes, A., Juminaga, D., Baidoo, E. E., Collins, F. W., Keasling, J. D., & Loqué, D. (2014). Production of hydroxycinnamoyl anthranilates from glucose in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 62.
- FEN, Fundación Española de la Nutrición. (2017). Datos actuales sobre las propiedades nutricionales de la avena. <https://www.fen.org.es>. (2018, agosto 15).
- Feng, Q., Chen, W. D., & Wang, Y. D. (2018). Gut microbiota: an integral moderator in health and disease. *Frontiers in Microbiology*, 9, 151.

- Fiala, E. S. (1977). Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1, 2-dimethylhydrazine and azoxymethane. *Cancer*, 40(S5), 2436-2445.
- Fishman, W. H., Springer, B., & Brunetti, R. (1948). Application of an improved glucuronidase assay method to the study of human blood β -glucuronidase. *Journal of Biological Chemistry*, 173(2), 449-456.
- Gangopadhyay, N., Hossain, M. B., Rai, D. K., & Brunton, N. P. (2015). A review of extraction and analysis of bioactives in oat and barley and scope for use of novel food processing technologies. *Molecules*, 20(6), 10884-10909.
- Gonzalez-Donquiles, C., Alonso-Molero, J., Fernandez-Villa, T., Vilorio-Marqués, L., Molina, A. J., & Martín, V. (2017). The NRF2 transcription factor plays a dual role in colorectal cancer: A systematic review. *PLoS One*, 12(5), e0177549.
- Guo, W., Nie, L., Wu, D., Wise, M. L., Collins, F. W., Meydani, S. N., & Meydani, M. (2010). Avenanthramides inhibit proliferation of human colon cancer cell lines *in vitro*. *Nutrition and Cancer*, 62(8), 1007-1016.
- Gyuraszova, M., Kovalcikova, A., & Gardlik, R. (2017). Association between oxidative status and the composition of intestinal microbiota along the gastrointestinal tract. *Medical Hypotheses*, 103, 81-85.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Hayes, J. D., McLeod, R., Ellis, E. M., Pulford, D. J., Ireland, L. S., McLellan, L. I., Judah, D. J., Manson, M. M., & Neal, G. E. (1996). Regulation of glutathione S-transferases and aldehyde reductase by chemoprotectors: studies of mechanisms responsible for inducible resistance to aflatoxin B1. IARC Scientific Publications, (139), 175-187.
- Hijová, E., Bomba, A., Bertková, I., Strojný, L., Szabadosová, V., & Šoltésová, A. (2012). Prebiotics and bioactive natural substances induce changes of composition and metabolic activities of the colonic microflora in cancerous rats. *Acta Biochimica Polonica*, 59(2).
- INIFAP, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (2013). Variedades de Avena Grano-Forraje para siembras de temporal en México. <http://biblioteca.inifap.gob.mx>. (2018, agosto 5).

- Instituto Nacional de Salud Pública. (2015). Cáncer de colon y recto. <https://www.insp.mx>. (2018, mayo 27).
- Ji, L. L., Lay, D., Chung, E., Fu, Y., & Peterson, D. M. (2003). Effects of avenanthramides on oxidant generation and antioxidant enzyme activity in exercised rats. *Nutrition Research*, 23(11), 1579-1590.
- Ji-Lin, D., Ying-ying, Z., Lin, L., Rui-ling, S., & Hong, L. (2014). Effect of oat soluble and insoluble beta-glucan on lipid metabolism and intestinal Lactobacillus in high-fat diet-induced obese mice. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2, 510-516.
- Kanauchi, O., Mitsuyama, K., Andoh, A., & Iwanaga, T. (2008). Modulation of intestinal environment by prebiotic germinated barley foodstuff prevents chemo-induced colonic carcinogenesis in rats. *Oncology Reports*, 20(4), 793-801.
- Kasdagly, M., Radhakrishnan, S., Reddivari, L., Veeramachaneni, D. R., & Vanamala, J. (2014). Colon carcinogenesis: influence of Western diet-induced obesity and targeting stem cells using dietary bioactive compounds. *Nutrition*, 30(11-12), 1242-1256.
- Kim, Y. I. (2000). AGA technical review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Gastroenterology*, 118(6), 1235-1257.
- Koenig, R. T., Dickman, J. R., Wise, M. L., & Ji, L. L. (2011). Avenanthramides are bioavailable and accumulate in hepatic, cardiac, and skeletal muscle tissue following oral gavage in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6438-6443.
- Kováčová, M., & Malinová, E. (2007). Ferulic and coumaric acids, total phenolic compounds and their correlation in selected oat genotypes. *Czech Journal of Food Sciences*, 25(6), 325.
- Latta, M., & Eskin, M. (1980). A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(6), 1313-1315.
- Liu, B., Lin, Q., Yang, T., Zeng, L., Shi, L., Chen, Y., & Luo, F. (2015). Oat β -glucan ameliorates dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis in mice. *Food & Function*, 6(11), 3454-3463.
- Long, D. J., Gaikwad, A., Multani, A., Pathak, S., Montgomery, C. A., Gonzalez, F. J., & Jaiswal, A. K. (2002). Disruption of the NAD (P) H: quinone

oxidoreductase 1 (NQO1) gene in mice causes myelogenous hyperplasia. *Cancer Research*, 62(11), 3030-3036.

Mälkki, Y., & Virtanen, E. (2001). Gastrointestinal effects of oat bran and oat gum: a review. *LWT-Food Science and Technology*, 34(6), 337-347.

Manju, V., Balasubramaniyan, V., & Nalini, N. (2005). Rat colonic lipid peroxidation and antioxidant status: the effects of dietary luteolin on 1, 2-dimethylhydrazine challenge. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10(3), 535.

Matić, M. M., Paunović, M. G., Milošević, M. D., Ognjanović, B. I., & Saičić, Z. S. (2019). Hematoprotective effects and antioxidant properties of β -glucan and vitamin C against acetaminophen-induced toxicity: an experimental study in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 1-8.

Mattila, P., Pihlava, J. M., & Hellström, J. (2005). Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8290-8295.

McCleary, B. V., & Codd, R. (1991). Measurement of (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucan in barley and oats: A streamlined enzymic procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55(2), 303-312.

Meira, L. B., Bugni, J. M., Green, S. L., Lee, C. W., Pang, B., Borenshtein, D., & Schauer, D. B. (2008). DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(7), 2516-2525.

Meydani, M. (2009). Potential health benefits of avenanthramides of oats. *Nutrition Reviews*, 67(12), 731-735.

Mitsou, E. K., Panopoulou, N., Turunen, K., Spiliotis, V., & Kyriacou, A. (2010). Prebiotic potential of barley derived β -glucan at low intake levels: A randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical study. *Food Research International*, 43(4), 1086-1092.

Multari, S., Pihlava, J. M., Ollenu-Chuasam, P., Hietaniemi, V., Yang, B., & Suomela, J. P. (2018). Identification and quantification of avenanthramides and free and bound phenolic acids in eight cultivars of husked oat (*Avena sativa* L) from Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(11), 2900-2908.

- Nagengast, F. M., Grubben, M. J. A. L., & Van Munster, I. P. (1995). Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *European Journal of Cancer*, 31(7-8), 1067-1070.
- Naito, Y., Takagi, T., & Yoshikawa, T. (2007). Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 41(1), 18-26.
- Nakanishi, S., Kataoka, K., Kuwahara, T., & Ohnishi, Y. (2003). Effects of high amylose maize starch and *Clostridium butyricum* on metabolism in colonic microbiota and formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Microbiology and Immunology*, 47(12), 951-958.
- Neergheen, V. S., Bahorun, T., Taylor, E. W., Jen, L. S., & Aruoma, O. I. (2010). Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology*, 278(2), 229-241.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. www.senasica.gob.mx. (2018, junio 16)
- NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. www.salud.gob.mx. (2018, junio 16)
- Owuor, E. D., & Kong, A. N. T. (2002). Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochemical pharmacology*, 64(5-6), 765-770.
- Padayachee, A., Day, L., Howell, K., & Gidley, M. J. (2017). Complexity and health functionality of plant cell wall fibers from fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(1), 59-81.
- Park, H. S., Goodlad, R. A., & Wright, N. A. (1997). The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. *Cancer Research*, 57(20), 4507-4510.
- Perše, M., & Cerar, A. (2010). Morphological and molecular alterations in 1, 2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- Peterson, D. M., Hahn, M. J., & Emmons, C. L. (2002). Oat avenanthramides exhibit antioxidant activities *in vitro*. *Food Chemistry*, 79(4), 473-478.

- Pool-Zobel, B., Veeriah, S., & Böhmer, F. D. (2005). Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens—focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591(1-2), 74-92.
- Pozharisski, K. M., Kapustin, Y. M., Likhachev, A. J., & Shaposhnikov, J. D. (1975). The mechanism of carcinogenic action of 1, 2-dimethylhydrazine (DMH) in rats. *International Journal of Cancer*, 15(4), 673-683.
- Prochaska, H. J., Santamaria, A. B., & Talalay, P. (1992). Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(6), 2394-2398.
- Queenan, K. M., Stewart, M. L., Smith, K. N., Thomas, W., Fulcher, R. G., & Slavin, J. L. (2007). Concentrated oat β -glucan, a fermentable fiber, lowers serum cholesterol in hypercholesterolemic adults in a randomized controlled trial. *Nutrition Journal*, 6(1), 6.
- Rao, C. V., Rivenson, A., Katiwalla, M., Kelloff, G. J., & Reddy, B. S. (1993). Chemopreventive effect of oltipraz during different stages of experimental colon carcinogenesis induced by azoxymethane in male F344 rats. *Cancer Research*, 53(11), 2502-2506.
- Reddy, B. S., Engle, A., Simi, B., & Goldman, M. (1992). Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. *Gastroenterology*, 102(5), 1475-1482.
- Ren, J. L., Pan, J. S., Lu, Y. P., Sun, P., & Han, J. (2009). Inflammatory signaling and cellular senescence. *Cellular Signalling*, 21(3), 378-383.
- Riddell, R. H., Goldman, H., Ransohoff, D. F., Appelman, H. D., Fenoglio, C. M., Haggitt, R. C., Ahren, C., Correa, P., Hamilton, S. R., & Morson, B. C. (1983). Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Human Pathology*, 14(11), 931-968.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M., & Léotoing, L. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104(S2), S1-S63.
- Rodríguez-González, S., Pérez-Ramírez, I. F., Castaño-Tostado, E., Amaya-Llano, S., Rodríguez-García, M. E., & Reynoso-Camacho, R. (2018). Improvement

of physico-chemical 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.

- Roebuck, B. D., Liu, Y. L., Rogers, A. E., Groopman, J. D., & Kensler, T. W. (1991). Protection against aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats by 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1, 2-dithiole-3-thione (oltipraz): predictive role for short-term molecular dosimetry. *Cancer Research*, 51(20), 5501-5506.
- Rose, D. J. (2014). Impact of whole grains on the gut microbiota: the next frontier for oats? *British Journal of Nutrition*, 112(S2), S44-S49.
- Russell, W. R., Scobbie, L., Chesson, A., Richardson, A. J., Stewart, C. S., Duncan, S. H., Drew, J. E., & Duthie, G. G. (2008). Anti-inflammatory implications of the microbial transformation of dietary phenolic compounds. *Nutrition and Cancer*, 60(5), 636-642.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2018). Atlas agroalimentario 2012 - 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIP). <https://nube.siap.gob.mx>. (2018, agosto 15).
- Saha, P., San Yeoh, B., Singh, R., Chandrasekar, B., Vemula, P. K., Haribabu, B., Vijay-Kumar, M., & Jala, V. R. (2016). Gut microbiota conversion of dietary ellagic acid into bioactive phytochemical urolithin a inhibits heme peroxidases. *PloS one*, 11(6), e0156811.
- Samelson, S. L., Nelson, R. L., & Nyhus, L. M. (1985). Protective role of faecal pH in experimental colon carcinogenesis. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 78(3), 230-233.
- Sang, S., & Chu, Y. (2017). Whole grain oats, more than just a fiber: Role of unique phytochemicals. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(7), 1600715.
- Shen, R. L., Dang, X. Y., Dong, J. L., & Hu, X. Z. (2012). Effects of oat β -glucan and barley β -glucan on fecal characteristics, intestinal microflora, and intestinal bacterial metabolites in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(45), 11301-11308.
- Shen, R. L., Wang, Z., Dong, J. L., Xiang, Q. S., & Liu, Y. Q. (2016). Effects of oat soluble and insoluble β -glucan on 1, 2-dimethylhydrazine-induced early colon carcinogenesis in mice. *Food and Agricultural Immunology*, 27(5), 657-666.

- Shukla, S. D., Budden, K. F., Neal, R., & Hansbro, P. M. (2017). Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. *Clinical & Translational Immunology*, 6(3), e133.
- Singh, R., De, S., & Belkheir, A. (2013). *Avena sativa* (Oat), a potential nutraceutical and therapeutic agent: an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(2), 126-144.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- 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.
- Suaeyun, R., Kinouchi, T., Arimochi, H., Vinitketkumnun, U., & Ohnishi, Y. (1997). Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus Stapf*) on formation of azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon. *Carcinogenesis*, 18(5), 949-955.
- Suchecka, D., Harasym, J., Wilczak, J., & Gromadzka-Ostrowska, J. (2016). Hepato- and gastro-protective activity of purified oat 1–3, 1–4-β-d-glucans of different molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 1177-1185.
- Sun, G. Y., Xu, J., Jensen, M. D., Yu, S., Wood, W. G., González, F. A., & Weisman, G. A. (2005). Phospholipase A2 in astrocytes: Responses to oxidative stress, inflammation, and G protein-coupled receptor agonists. *Molecular Neurobiology*, 31(1-3), 027-042.
- Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 768.
- Takada, H., Hirooka, T., Hiramatsu, Y., & Yamamoto, M. (1982). Effect of β-glucuronidase inhibitor on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in rats. *Cancer Research*, 42(1), 331-334.
- Tanaka, T. (2009). Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis*, 8(1), 5.
- Tanaka, T. (2012). Development of an inflammation-associated colorectal cancer model and its application for research on carcinogenesis and chemoprevention. *International Journal of Inflammation*, 2012.

- Thornton, J. R. (1981). High colonic pH promotes colorectal cancer. *The Lancet*, 317(8229), 1081-1083.
- Tian, B., Xie, B., Shi, J., Wu, J., Cai, Y., Xu, T., Xue, S., & Deng, Q. (2010). Physicochemical changes of oat seeds during germination. *Food Chemistry*, 119(3), 1195-1200.
- Tsan, M. F., & Gao, B. (2004). Endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(3), 514-519.
- Vale, A. P., Santos, J., Brito, N. V., Fernandes, D., Rosa, E., & Oliveira, M. B. P. (2015). Evaluating the impact of sprouting conditions on the glucosinolate content of Brassica oleracea sprouts. *Phytochemistry*, 115, 252-260.
- Varzakas, T., Zakyntinos, G., & Verpoort, F. (2016). Plant food residues as a source of nutraceuticals and functional foods. *Foods*, 5(4), 88.
- Velayos, F. S., & Sandborn, W. J. (2007). Positioning biologic therapy for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Current gastroenterology reports*, 9(6), 521-527.
- Vilela, E. G., da Gama Torres, H. O., Martins, F. P., de Abreu Ferrari, M. D. L., Andrade, M. M., & da Cunha, A. S. (2012). Evaluation of inflammatory activity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 18(9), 872.
- Villaseñor, H. E., Espitia, R. E., Huerta, E. J., Osorio, A. L., & López, H. J. (2009). Turquesa, nueva variedad de avena para la producción de grano y forraje en México. *Agricultura Técnica en México*, 35(4), 487-492.
- Vitaglione, P., Napolitano, A., & Fogliano, V. (2008). Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends in Food Science & Technology*, 19(9), 451-463.
- Wang, P., Chen, H., Zhu, Y., McBride, J., Fu, J., & Sang, S. (2014). Oat avenanthramide-C (2c) is biotransformed by mice and the human microbiota into bioactive metabolites. *The Journal of Nutrition*, 145(2), 239-245.
- Wang, X., & Gibson, G. R. (1993). Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(4), 373-380.
- Yang, J., Ou, B., Wise, M. L., & Chu, Y. (2014). *In vitro* total antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of three common oat-derived avenanthramides. *Food Chemistry*, 160, 338-345.

- Yapo, B. M., & Koffi, K. L. (2008). Dietary Fiber Components in Yellow Passion Fruit Rind - A Potential Fiber Source. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5880-5883.
- Yoshimi, N., Walaszek, Z., Mori, H., Hanausek, M., Szemraj, J., & Slaga, T. J. (2000). Inhibition of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by potassium hydrogen D-glucarate. *International Journal of Oncology*, 16(1), 43-51.
- Zhao, Y., Hasjim, J., Li, L., Jane, J. L., Hendrich, S., & Birt, D. F. (2011). Inhibition of azoxymethane-induced preneoplastic lesions in the rat colon by a cooked stearic acid complexed high-amylose cornstarch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9700-9708.
- Zhao, Z., & Moghadasian, M. H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, 109(4), 691-702.

VIII. ANEXOS

8.1 Estándares para la cuantificación de compuestos fenólicos libres

Tabla A1. Estándares para la cuantificación mediante UPLC-PDA de compuestos fenólicos libres presentes en el GA

Estándar comercial	Marca
Luteolina	Sigma Aldrich
Quercetina	Sigma Aldrich
Miricetina	Sigma Aldrich
Mangiferina	Sigma Aldrich
Quercetina Glucurónido	Sigma Aldrich
Rutina	Sigma Aldrich
Neohesperidina	Sigma Aldrich
Apigenina	Sigma Aldrich
Acacetina	Sigma Aldrich
Kaempferol	Sigma Aldrich
Eriodictiol	Sigma Aldrich
Catequina	Sigma Aldrich
Naringenina	Sigma Aldrich
Floretina	Sigma Aldrich
Epicatequina	Sigma Aldrich
Ácido benzoico	Sigma Aldrich
Ácido 4-hidroxibenzoico	Sigma Aldrich
Ácido trans-cinámico	Sigma Aldrich

Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	Sigma Aldrich
2,4,6-trihidroxibenzaldehído	Sigma Aldrich
Ácido protocatecoico	Sigma Aldrich
Ácido p-Coumarico	Sigma Aldrich
Ácido vanílico	Sigma Aldrich
Ácido gálico	Sigma Aldrich
Ácido shikímico	Sigma Aldrich
Ácido cafeico	Sigma Aldrich
Ácido quínico	Sigma Aldrich
Ácido ferúlico	Sigma Aldrich
Ácido siríngico	Sigma Aldrich
Ácido caftarico	Sigma Aldrich
Ácido 4-O-cafeoilquínico	Sigma Aldrich
Ácido clorogénico	Sigma Aldrich
Ácido rosmarínico	Sigma Aldrich
Ácido 3,4-O/ 4,5-O-dicafeoilquínico	Sigma Aldrich
Ácido salicílico	Sigma Aldrich
Ácido elágico	Sigma Aldrich
Avenantramida-A (2p)	Sigma Aldrich

8.2 Reactivos para β -glucuronidasa

Reactivos para la elaboración de la curva de calibración de fenolftaleína

- a) PBS 0.02 M
- b) Glicina alcalina
- c) Fenolftaleína (260 mg/mL)

Tabla A2. Curva de calibración de fenolftaleína

Tubo	Solución stock de fenolftaleína (μ L)	PBS (μ L)	Glicina alcalina (μ L)	Agua (μ L)
1	0	50.0	125	125
2	5.77	44.2	125	125
3	11.5	38.5	125	125
4	17.3	32.5	125	125
5	23.1	26.9	125	125

8.3 Reactivos para la cuantificación de proteína

a) Solución de trabajo para la determinación de proteína

La solución de trabajo se prepara con los reactivos A y B que vienen en el kit, en una relación 50:1 v/v, respectivamente. Por ejemplo: 8 mL del reactivo A + 160 μ L del reactivo B.

8.4 Reactivos para la determinación de glutatión reducido (GSH)

a) Solución amortiguadora Tris-EDTA pH 8.2 (100 mL)

Pesar 0.744 g de EDTA y 3.52 g de Tris, diluir ambos en agua destilada, ajustar el pH a 8.2 y aforar a 100 mL.

b) Solución de trabajo de GSH 0.6 mM (para la curva estándar)

Pesar 1.843 mg de GSH y aforar a 10 mL con la solución amortiguadora Tris-EDTA pH 8.2.

c) Solución de DTNB 2.46 mM

Pesar 24.3 mg y aforar a 25 mL con metanol para obtener una concentración 2.46 mM.

d) Ácido sulfosalicílico (SSA) al 5% (para precipitar la proteína de las muestras)

Pesar 2.5 mg de SSA en 50 mL de agua destilada

8.5 Reactivos para la preparación de homogenados citosólicos

a) Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y pH 6.5 (para la dilución de citosoles y las soluciones de trabajo de GSH y CDNB)

Para preparar 200 mL de solución amortiguadora de fosfatos:

68.5 mL ó 1.89 g de NaH_2PO_4 (0.2M)

31.5 mL ó 0.895 g de Na_2HPO_4 (0.2M)

Aforar a 200 mL con agua destilada y ajustar el pH a 6.5 (antes de aforar).

b) Solución amortiguadora Tris-Sacarosa, que para 1 L contiene:

7.9 g de Tris-HCl

2.1 g de MgCl_2

1.9 g de KCl

85.6 g de sacarosa ultra pura

Aforar con 1000 mL H_2O destilada, ajustar el pH a 7.0 (antes de aforar).

Por cada 0.5 g de tejido se agregaron 4 volúmenes de solución amortiguadora.

8.6 Reactivos para la determinación de glutatión-S-transferasa (GST)

Soluciones amortiguadoras GSH y CDNB:

- a) Stock de GSH 150 mM: 6.15 mg en 1.0 mL de H₂O. (Prepararse el día de su uso)
- b) Stock de CDNB 60 mM: 4.04 mg en 1.0 mL de etanol. (Prepararse el día de su uso).

A partir de estos stocks se prepararon las soluciones que se agregaron a la microplaca.

c) Solución de trabajo de GSH 3 mM: 140 μ L del stock de GSH + 6.86 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M

d) Solución de trabajo de CDNB 2 mM: 300 μ L del stock de CDNB + 8.7 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M.

8.7 Reactivos para la determinación de quinona óxidorreductasa (NQO1)

a) Solución amortiguadora de trabajo TRIS 0.025M, pH 7.4

Para preparar 500 mL de solución amortiguadora de trabajo, se pesan:

1.97 g Tris-HCl

333 mg BSA (albúmina bovina)

3.3 mL de Tween 20 al 1.5%

Disolver en 500 mL de H₂O destilada

Esterilizar la solución amortiguadora a través de filtración (poro de 0.22 micras) y almacenar a temperatura ambiente (si no se esteriliza almacenar a temperatura de refrigeración por no más de 7 días).

Los cofactores que se adicionan en fresco a 15 mL de solución amortiguadora de trabajo (para una placa), son:

10 μ L de FAD (6.2 mg/mL)

9 μ L de NADP (38.3 mg/mL)

100 μ L de G6P (42.3 mg/mL)

30 unidades de G6PD

4.5 mg de MTT

Inmediatamente después de agregar los cofactores se adicionan 15 μ L de menadiona en acetonitrilo (8.6 mg/mL) a cada 15 mL de solución amortiguadora de trabajo TRIS 0.025 M, pH 7.4.

b) Solución bloqueadora de dicumarol

Para cada pozo de la microplaca se adicionan 50 μ L de una solución amortiguadora de fosfatos 0.025 mM (se puede preparar a partir de la solución de fosfatos 0.1 M empleada en la dilución de citosoles), que debe contener 2 μ L de dicumarol preparado en NaOH 0.1 N a una concentración de 20 mg/mL.