

**Efecto anticancerígeno del
almidón modificado de banano
(Musa cavendish AAA) en ratas
con 1,2-dimetilhidrazina**

**Anticancer effect of modified
banana (Musa cavendish AAA)
starch in rats with 1.2-
dimethylhydrazine**

OR 2706

Efecto anticancerígeno del almidón modificado de banano (*Musa acuminata* AAA 'Cavendish') en ratas tratadas con 1,2-dimetilhidrazina

Anticancer effect of modified banana (Musa acuminata AAA 'Cavendish') starch in rats treated with 1,2-dimethylhydrazine

David Betancur-Ancona¹, Luis Chel-Guerrero¹, Arturo Castellanos-Ruelas¹, Valentino Muktar Sandoval-Peraza¹, Rafael Francisco Colin-Flores², Jorge Luis Ble-Castillo³, Isela Esther Juárez-Rojop³, Juan José Acevedo-Fernández⁴, Patricia Quintana-Owen⁵ y Viridiana Olvera-Hernández³

¹Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. ³División Académica de Ciencias de la Salud. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. ⁴Departamento de Fisiología y Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México. ⁵Departamento de Física Aplicada. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Mérida, Yucatán. México

Recepción: 23/05/2019

Aceptación: 06/11/2019

Correspondencia: Viridiana Olvera Hernández. División Académica de Ciencias de la Salud. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. México

e-mail: viryolvera11@gmail.com

Agradecimientos: Se agradece al "Programa para el desarrollo profesional docente (PRODEP-SEP)" por proporcionar la beca de doctorado para el autor para correspondencia.

RESUMEN

Introducción: el almidón resistente (AR) no se digiere completamente en el intestino humano sino que se fermenta en colon; disminuye el pH intestinal, ya que se producen ácidos grasos de cadena corta, interviniendo de manera benéfica en el tratamiento preventivo y curativo del cáncer de colon rectal. La pirodextrinización y la hidrólisis enzimática son modificaciones del almidón nativo (AN) que pueden incrementar la cantidad de AR.

Objetivo: el objetivo de este proyecto fue evaluar los efectos del almidón nativo de *Musa* AAA 'Cavendish' y de los almidones modificados química y enzimáticamente sobre diversos marcadores tumorales en ratas.

Métodos: se realizaron modificaciones (química y enzimática) del AN del banano *Musa* AAA 'Cavendish' y se evaluaron en ratas tratadas con 1,2-DMH. Se utilizaron 25 ratas Wistar macho divididas en cinco grupos experimentales: CP, CN, AN, PI y MER. Durante 4 semanas recibieron la dieta experimental asignada a cada grupo. Los grupos CP, AN, PI y MER recibieron 2 inyecciones s.c. (subcutáneas) semanales de 1,2-DMH (40 mg/kg) (semanas 3 y 4). En las heces se evaluaron el pH, la enzima β -glucuronidasa y los ácidos grasos de cadena corta, y se realizó un estudio histopatológico del ciego y el colon para detectar lesiones microscópicas.

Resultados: la actividad de β -glucuronidasa disminuyó ($p < 0,05$) para los grupos AN, PI y MER en comparación con el CP. La mayor proporción de ácido butírico se observó en el AN ($p < 0,05$) frente al CN. El 60% de

las enteritis fueron de grado severo en el CP, mientras que en los grupos experimentales lo fueron el 40%.

Conclusiones: los gránulos de almidón nativo resistieron la pirodextrinización pero el tratamiento con α -amilasa rompió la estructura del gránulo de pirodextrina. De acuerdo a los tratamientos suministrados a las ratas, conforme mayor es la cantidad de AR presente en la dieta (AN), las células neoplásicas no avanzan más allá de la membrana basal, sugiriendo un posible efecto protector o anticancerígeno celular.

Palabras clave: Almidón resistente. Butirato. Maltodextrina resistente. Pirodextrinización.

ABSTRACT

Introduction: resistant starch (RS) is not completely digested in the human intestine but is fermented in the colon; intestinal pH decreases as short-chain fatty acids are produced. This is beneficial for health, and for preventing and treating rectal colon cancer. Pirodextrinization and enzymatic hydrolysis are modifications to native starch (NS) that may increase the amount of RS.

Objective: the objective of this project was to evaluate the effects of *Musa* AAA 'Cavendish' native and both chemically and enzymatically modified starches on tumor markers in rats.

Methods: modifications (chemical and enzymatic) were made to *Musa* 'Cavendish' NS, and were evaluated in rats with 1,2-DMH. Male Wistar rats (25 rats) were used, divided into five experimental groups: PC, NC, NS, PI, and ERM. During 4 weeks they received the experimental diet assigned to each group. The PC, NS, PI and ERM groups received 2 weekly s.c. (subcutaneous) injections of 1,2-DMH (40 mg/kg) (third and fourth week). In feces, pH, β -glucuronidase enzyme, and short-chain fatty acids were evaluated, and a histopathological study was performed of the intestine to detect microscopic lesions.

Results: the activity of β -glucuronidase decreased ($p < 0.05$) for NS, PI and ERM vs. PC. The highest proportion of butyric acid was observed in the NS ($p < 0.05$) vs. NC group. Sixty percent of enteritides were severe in grade in the PC group, and 40% in the experimental groups.

Conclusions: native starch granules resisted pyrodextrinization, but treatment with α -amylase broke the structure of the pyrodextrin granule. According to the treatments given to the rats, as the amount of RS present in the diet increases (NS), the neoplastic cells do not advance beyond the basement membrane, suggesting a possible cell-protective or anticancer effect.

Keywords: Resistant starch. Butyrate. Resistant maltodextrin. Pyrodextrinization.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de colon rectal (CCR) es uno de los tumores gastrointestinales más comunes. A nivel mundial, es el segundo tipo de cáncer que se presenta en mujeres y el tercero en hombres (1). En los últimos años, el tratamiento preventivo y curativo de los pacientes con cáncer de colon ha mejorado y se han llevado a cabo diversos protocolos que incluyen fármacos y cambios en el estilo de vida, incluida la dieta (2). El almidón resistente (AR), al ser parcialmente digerido, se fermenta en el colon, por lo que disminuye el pH intestinal, ya que se producen ácidos grasos de cadena corta (AGCC), lo cual es beneficioso para la salud del colon y para la prevención y el tratamiento del CCR. Además, actúa como fibra soluble, por lo que su consumo se asocia a generar niveles bajos de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre, influyendo de manera benéfica en el tratamiento de padecimientos tales como la obesidad, las

enfermedades cardiovasculares y la diabetes (3). Se obtiene almidón de los cereales, los frutos, los tubérculos y las raíces. Aunque el almidón se utiliza ampliamente en la industria alimentaria, en su forma nativa presenta limitaciones para su procesamiento, por lo que se modifica mediante métodos físicos, químicos y enzimáticos que provocan cambios estructurales y en sus propiedades fisicoquímicas y funcionales (4). La aplicación secuencial de los procesos de pirodextrinización e hidrólisis enzimática a los almidones nativos produce maltodextrinas que son resistentes, debido a que contienen enlaces atípicos α (1,4), α (1,6), β (1,2) y β (1,3), y levoglucosanos, que se generan durante la pirodextrinización. Estos productos presentan baja viscosidad, alta solubilidad y actúan como AR. Se utilizan para preparar jugos, leches, sopas, fórmulas enterales y bebidas carbonatadas (5). Tomando en cuenta estudios previos sobre los efectos beneficiosos de la ingesta de AR y las ventajas potenciales que ofrece aplicar de manera secuencial los procesos de pirodextrinización e hidrólisis enzimática, en el presente trabajo se evaluó el efecto anticancerígeno ocasionado por el consumo de almidón nativo de banano (*Musa acuminata* AAA 'Cavendish') y de su almidón modificado química y enzimáticamente en ratas tratadas con 1,2-dimetilhidrazina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Compuestos químicos

Se utilizaron reactivos químicos de grado analítico (J. T. Baker; Phillipsburg, NJ, EE. UU.) y las enzimas se adquirieron a Sigma Co. (St. Louis, MO, EE. UU.). Para determinar el AR se utilizó un kit de Megazyme (K-RSTAR 05/2008 Megazyme[®] International Ireland Limited 2008). De Sigma Co. (St. Louis, MO, EE. UU.) se utilizó la 1,2-dimetilhidrazina (DMH) para llevar a cabo la inducción del cáncer en el colon. De la misma marca se utilizaron los estándares de ácidos de grado cromatográfico

para la evaluación de los AGCC, y los gases fueron provistos por Grupo Infra®.

Material biológico

El banano verde fue recolectado en Teapa, Tabasco, México. La producción, manejo y cuidado de las ratas se realizó en la Unidad de Producción, Cuidado y Experimentación Animal (UPCEA), ubicada en la División Académica de Ciencias de la Salud (DACs) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), bajo condiciones medioambientales controladas de temperatura (21 ± 1 °C) y humedad relativa (55%), ciclos de 12 h de luz y oscuridad, y acceso a agua purificada (AP) y alimento a libre demanda (dieta convencional proporcionada por Harlan Teklad para roedores con 18% de proteína) durante la fase experimental. Se utilizaron 25 ratas macho destetadas, variedad Sprague Dawley, con peso de 80 a 90 g y cuatro semanas de edad (6).

Dietas experimentales

La extracción de almidón nativo (AN) de banano (*M. AAA 'Cavendish'*), así como las modificaciones de pirodextrinización e hidrólisis enzimática se realizaron bajo condiciones previamente publicadas (7).

Extracción de almidón

Los bananos fueron pelados, lavados (agua a 40 °C con 0,3% de ácido cítrico), molidos y tamizados (malla n.º 100). El sedimento fue separado y secado en una estufa de aire a 50 °C durante 24 h.

Almidón modificado: pirodextrinización e hidrólisis enzimática

Para llevar a cabo la pirodextrinización se utilizó una proporción de almidón:ácido (ácido clorhídrico 2,2 M) de 160:1 (p/v). El ácido fue dispersado sobre el almidón para llevar a cabo la reacción y se dejó a

temperatura ambiente por 16 h. Posteriormente se colocó en un horno de convección por 1 h a 90 °C.

Para realizar la hidrólisis enzimática, la pirodextrina se suspendió en una solución al 30% (p/v), ajustada a pH 6. La mezcla se colocó en un baño de agua con agitación constante a 95 °C. Para llevar a cabo la hidrólisis se utilizó un 0.01% de la enzima α -amilasa EC. 3.2.1.1 (Sigma A-3306, 4000 unidades/ml) durante 10 min.

El AN, la pirodextrina y la maltodextrina resistente se molieron, tamizaron (malla n.º 100) y almacenaron.

Determinación del almidón resistente

Tanto el AN como la pirodextrina y la maltodextrina que se utilizaron se evaluaron de acuerdo con la técnica descrita en el kit para el análisis del almidón resistente que provee Megazyme (K-RSTAR 05/2008 de Megazyme[©] International Ireland Limited 2008), el cual ha sido aceptado y avalado por los métodos oficiales de la AOAC International (2002.02) y la AACC International (32-40.01). Las muestras se incubaron con agitación (Ovan, OL30-ME, España) con α -amilasa pancreática y amiloglucosidasa durante 16 h a 37 °C. El AR se recuperó tras centrifugar la muestra a 1500 x g en una centrífuga (Science Med, DM0412, Finlandia) y se disolvió en KOH 2 M en un baño con agitación (Ovan, OL30-ME, España). La solución se neutralizó con búfer de acetato y el almidón se hidrolizó cuantitativamente en glucosa por acción enzimática de la amiloglucosidasa. La D-glucosa se cuantificó con un reactivo de glucosa-oxidasa/peroxidasa (Spinreact, España), obteniéndose la cantidad de AR presente en la muestra. El cálculo del almidón resistente se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ AR} = (\text{absorbancia de la muestra}) \left(\frac{F}{W} \right) (90)$$

Donde:

F (factor) = concentración del estándar/absorbancia del estándar = 100/absorbancia del estándar (correspondiente a 100 μg de D-glucosa).

W = peso seco de la muestra analizada = $(100 - \text{humedad})/100$ (100 es el factor para representar el contenido de AR como porcentaje del peso de la muestra).

90 = factor a convertir de D-glucosa libre (según lo determinado) a anhidro-D-glucosa como ocurre en el almidón.

Microscopía electrónica de barrido

El análisis morfológico se realizó en un microscopio electrónico (JEOL, JSM-7610F FESEM, EE. UU.) con resolución de 1 nm, ampliación de 500 X con micrografía de 10,3 mm, acelerador de voltaje de 5 kV y corriente de sonda de hasta 200 nA. Las muestras de AN, pirodextrina y maltodextrina se colocaron sobre papel conductor de carbono y se metalizaron con una aleación de oro-platino durante 1 min con la ayuda de un revestidor giratorio (Quorum, Q150R ES, Reino Unido); posteriormente se analizaron en el microscopio electrónico para determinar los cambios de tamaño, forma y estructura granular por efecto de los tratamientos (8).

Ensayo en animales

El protocolo experimental fue aprobado por la Comisión para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CCUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) (número de aprobación: 006/2015) de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), la Guía Internacional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y las normas federales e institucionales requeridas.

Durante la primera semana del estudio, los animales estuvieron en proceso de adaptación. Posteriormente se dividieron en cinco grupos de cinco animales cada uno y se seleccionaron de manera aleatoria para su inclusión en uno de los siguientes grupos experimentales: CP (control

positivo), CN (control negativo), AN (almidón nativo), PI (pirodextrina) y MER (maltodextrina resistente). Durante 4 semanas, los animales recibieron AP y dieta convencional para roedores con 18% de proteína, ambos a libre demanda. Las ratas de los grupos AN, PI y MER recibieron a través de una sonda gástrica sus correspondientes dietas a una dosis de 2 g/kg de peso corporal (9). Ambos controles (CN y CP) recibieron solamente AP mediante la misma vía de administración y durante el mismo período (cuatro semanas). Para inducir el CCR en las ratas se utilizó el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina. Los grupos CP, AN, PI y MER recibieron 4 inyecciones s.c. (subcutáneas) de 1,2-DMH (40 mg/kg) dos veces a la semana durante las semanas experimentales 3 y 4 (6). El grupo CN recibió por la misma vía una inyección de EDTA con pH 6. La ganancia de peso corporal se monitorizó de manera semanal con una balanza (Ohaus Defender®, Triple Beam, EE. UU.) y el consumo de agua y alimento se registró diariamente.

Pruebas fisiológicas y sacrificio

Al término de las 4 semanas, los animales se sometieron a un ayuno de 12 h para ser sacrificados en una cámara de CO₂ con el fin de extraer el intestino grueso en dos porciones (ciego y colon). Se recolectó el contenido fecal en crioviales de 2 ml con tapa de rosca que se almacenaron en un congelador (Torrey, CHC-80C, México) a -70 °C para su posterior análisis. Las porciones del colon se lavaron con solución fisiológica y se fijaron en formol al 10% para su estudio histopatológico. Para esto se ataron con un hilo en cada extremo y se inyectaron con formol. En las heces se llevaron a cabo las siguientes determinaciones: pH, actividad enzimática de β -glucuronidasa y cuantificación de AGCC por cromatografía de gases (CG).

pH cecal y colónico

Inmediatamente después de la recolección se colocó una pequeña porción de muestra en la punta de una microespátula para disolverla en 5 ml de agua destilada; después se midió el pH de las muestras con un potenciómetro (Hanna® Instruments, HI222102, EE. UU.).

Actividad enzimática de β -glucuronidasa

La actividad enzimática de la β -glucuronidasa se determinó usando el conjugado β -D-glucurónido de fenolftaleína como sustrato (10). La enzima presente en la muestra hidrolizó el conjugado y la fenolftaleína liberada se monitorizó por el cambio de color. El extracto fecal se obtuvo utilizando 0,5 g de muestra (contenido de ciego y de colon por separado) a los cuales se le adicionaron 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0,2 M a pH 7; posteriormente se homogenizó en un vórtex (Ohaus Defender®, VXMNFS, EE. UU.) y se centrifugó en un equipo (Science Med, DM0412, Finlandia) a 25,000 x g durante 20 min a 4 °C, recolectándose el sobrenadante. Para la mezcla de la reacción se tomaron 0,8 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0,02 M, 0,1 ml de β -D-glucurónido de fenolftaleína 1 mM y 0,1 ml del extracto fecal y se colocó todo ello en una incubadora (Ovan, OL30-ME, España) durante 1 h a 37 °C. La reacción de la enzima se detuvo con la adición de 2,5 ml de glicina alcalina, 1 ml de ácido tricloroacético al 5% y 1,5 ml de agua. Después de reposar durante 10 min a temperatura ambiente, la muestra se leyó a 540 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific™, Genesys 10, EE. UU.). La actividad enzimática total de la β -glucuronidasa se expresó en nmol/min por g de contenido fecal empleando la siguiente ecuación:

$$\text{nmol/min/g de contenido} = \frac{\mu\text{g fenolftaleína} * 100}{(\text{PM})(\text{g de muestra})}$$

Donde:

$\mu\text{g fenolftaleína}$ = μg de fenolftaleína liberada.

100 = factor de dilución.

PM = peso molecular de la fenolftaleína.

Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta por cromatografía de gases

Se utilizaron como estándar ácido acético glacial al 99,8%, ácido propiónico el 99,8%, ácido butírico al 99,5% y ácido 2-etilbutírico al 99%. Los gases utilizados fueron helio, hidrógeno y nitrógeno con purezas del 99,998%, 99,999% y 99,998% para CG, además de aire grado cero (Grupo Infra®). El análisis cromatográfico se llevó a cabo usando un cromatógrafo (Agilent®, 7890A GC, EE. UU.) equipado con un detector de ionización de flama (FID) y con una columna capilar (Nukol™, DB-WAX, EE: UU.) de 15 m x 0,53 mm.

La extracción se llevó a cabo suspendiendo 1 g de heces en 5 ml de agua, homogeneizándose posteriormente la suspensión durante 3 min en un vórtex (Ohaus Defender® VXMNFS, EE. UU.). Se ajustó el pH entre 2 y 3 con ácido clorhídrico 5 M y se mantuvo a temperatura ambiente por 10 min con agitación ocasional (11). La suspensión se colocó en una centrifuga (Science Med, DM0412, Finlandia) a 4 °C durante 20 min a 26.000 x g. El sobrenadante se separó y filtró con membranas de 0.45 µm. El ácido 2-etilbutírico se adicionó como estándar interno al sobrenadante filtrado en una concentración final de 2 mM; posteriormente se inyectó en el CG para su análisis. Los AGCC se identificaron en los cromatogramas por sus tiempos de retención. La concentración de cada ácido se obtuvo mediante una curva de calibración por cada ácido, utilizando como señal analítica el área del pico cromatográfico, y se expresó en µmoles/g de contenido de ciego y de colon.

El análisis de la muestra se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones instrumentales: helio como gas acarreador a un flujo de 1 ml/min, hidrógeno, nitrógeno y aire (40 ml/min, 30 ml/min y 450 ml/min, respectivamente). La mezcla hidrógeno/aire se utilizó para la flama y el

nitrógeno se utilizó como gas auxiliar. La temperatura inicial del horno fue de 60 °C, incrementándose a razón de 20 °C/min hasta llegar a los 180 °C y manteniendo 1 min esa temperatura. La temperatura del detector y del inyector fue de 210 °C. El volumen de inyección fue de 0,2 µL (12).

Estudio histopatológico

Las secciones de tejido se fijaron durante 24 h en formalina al 10% con pH de 7,4 en una proporción de una parte de tejido por 10 de fijador. Una vez realizados los cortes primarios se procedió de acuerdo con el método habitual de inclusión en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 5 µm de grosor, desparafinados y teñidos con la tinción de rutina de hematoxilina-eosina (HE) (13) para su posterior observación microscópica en un equipo (Motic Plan Acromatic, BA-200, EE. UU.) con aumentos de 400 y 1000 X.

Registros y morfología de las lesiones microscópicas

Para registrar las lesiones microscópicas de los tejidos se observaron diez campos al azar con 40 X. Se tomaron en cuenta los siguientes criterios: tipo de lesión, componente celular predominante y grado de la lesión, que se clasificó en tres categorías: ligero (lesión que abarca un tercio del tejido), moderado (lesión que incluye dos tercios del tejido) y severo (lesión que compromete la totalidad del tejido) (14). Las fotomicrografías se tomaron con un microscopio (Motic Plan Acromatic, BA-200, EE. UU.) con aumentos de 400 y 1000 X.

Análisis de los resultados

Las variables de respuesta utilizadas para evaluar el efecto producido en las ratas tratadas con 1,2-DMH por la ingesta de AN de *M. AAA* 'Cavendish', y sus modificaciones, fueron las siguientes: pH intestinal, actividad enzimática de β-glucuronidasa, concentración de AGCC y

presencia de displasia. Los resultados se expresaron como media aritmética \pm error estándar de la media. Se realizó un análisis de la varianza de una sola vía para cada uno de los modelos, con un nivel de significación de $p < 0,05$. Para determinar las diferencias entre las medias de los tratamientos se aplicó la prueba de Duncan. Para identificar las lesiones y los tumores en el colon de las ratas, así como el grado de inflamación, se utilizó la estadística descriptiva. Para el análisis del tipo de enteritis y la presencia de displasia se llevó a cabo una prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de significación de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Determinación de almidón resistente en las dietas

El contenido de AR presente en el AN de *M. AAA* 'Cavendish' fue del 70,51%, y después de los tratamientos de pirodextrinización e hidrólisis enzimática fue del 63,84% y 11,04%, respectivamente.

Microscopía electrónica de barrido

Los gránulos del AN (Fig. 1A) presentaron una forma irregular, elongada y, en algunos casos, esferoidal con un tamaño de 11 μm a 71 μm . Se puede observar en la figura 1B la imagen de la pirodextrina seleccionada, en donde algunos gránulos de AN fueron resistentes al tratamiento químico de la pirodextrinización y no mostraron cambio alguno. Esto demuestra que el tratamiento debilitó el gránulo pero, a nivel molecular, este no se hidrolizó totalmente. En la figura 1C se puede observar que, en la MER, la hidrólisis enzimática con α -amilasa provocó un cambio drástico en la pérdida de la estructura granular.

Actividad enzimática de β -glucuronidasa y pH en heces fecales

En la tabla I se muestran los resultados sobre el pH y la actividad enzimática de β -glucuronidasa en heces fecales, tanto de ciego como de colon, de los grupos AN, PI y MER. El tratamiento con AN redujo el pH

tanto en ciego como en colon ($p < 0,05$) con respecto al grupo CP. En el grupo PI se redujo el pH únicamente en el colon ($p < 0,05$) con respecto al CP. La concentración de la enzima β -glucuronidasa tanto en ciego como en colon disminuyó con todos los tratamientos dietéticos con respecto al grupo CP ($p < 0,05$).

Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta en heces fecales

En relación a la producción de AGCC en las ratas tratadas con 1,2-DMH (Tabla I) se observó que el consumo de AN aumentó la concentración de ácido butírico en el colon con respecto al CP ($p < 0,05$), llegando a ser igual que en el CN ($p > 0,05$). Con respecto a los otros tratamientos modificados (PI y MER), el AN fue el tratamiento que produjo mayor concentración de ácido butírico en colon ($p < 0,05$). En el caso del ácido acético, en el ciego, el grupo MER presentó mayor concentración que el grupo CP ($p < 0,05$) y un nivel igual al del grupo CN ($p > 0,05$). En el colon, el grupo AN presentó mayor ($p < 0,05$) concentración de ácido acético con respecto al CP, siendo dicha concentración igual a la del CN ($p > 0,05$). Por último, en la cuantificación del ácido propiónico en el ciego, los tres tratamientos experimentales mostraron mayor producción que el grupo CP ($p < 0,05$). En el colon, la mayor producción de acético se observó en los grupos de los tratamientos con mayor proporción de AR (AN y PI; $p < 0,05$).

Estudio histopatológico: registros y morfología de lesiones microscópicas

De manera general e independientemente del tratamiento, se observó la presencia de enteritis en los animales. La enteritis se categorizó en dos tipos: eosinofílica y linfoplasmocítica. El CN presentó enteritis eosinofílica, que está ligada a síntomas alérgicos sistémicos y elevaciones de la inmunoglobulina E (IgE). Por el contrario, los animales

tratados con 1,2-DMH presentaron reacciones inflamatorias de subagudas a crónicas que sugieren reacciones inmunomediadas como la enteritis linfoplasmocítica, incluidos los tratados con dietas experimentales y el grupo CP, sin haber diferencias entre ellos ($p > 0,05$). Esta inflamación se presentó con o sin displasia adicional en el colon de las ratas.

El grupo AN presentó menor enteritis linfoplasmocítica que el grupo CP ($p < 0,05$), lo que significa que tuvo menor toxicidad. De acuerdo con el grado y el patrón de la enteritis observada en el colon de las ratas, los grupos que consumieron dietas experimentales presentaron menor proporción de severidad (40%) que el CP (60%), siendo el patrón difuso el que predominó. En lo referente al estudio microscópico, de manera general no se observaron cambios patológicos aparentes en el CN. Las vellosidades intestinales presentaron en el borde células poliédricas acilíndricas, principalmente enterocitos, y algunas vacuoladas en el citoplasma y con núcleo excéntrico, que son las células productoras de moco o globosas. En el centro de las vellosidades había células estromales y de tipo linfoide residente.

En la figura 2 se presenta la fotomicrografía de un corte de colon de rata del grupo CP en donde se observa un carcinoma *in situ* en la punta de la vellosidad, la cual exhibe cambios displásicos de los enterocitos como son: pérdida de la relación núcleo-citoplasma, pleomorfismo nuclear, núcleos hipercromáticos con nucléolos prominentes y algunas mitosis atípicas.

En cuanto a la incidencia de displasia por efecto de la ingesta de AN de *M. AAA 'Cavendish'* y sus productos modificados, se observó que en el CP hubo evidencia de lesiones (displasia) en el 80% de los casos, con células neoplásicas sin rebasar la membrana basal (carcinoma *in situ*). El grupo tratado con AN presentó la menor proporción de displasia (20%; $p < 0,05$) con respecto al CP, incluso menor que la de los grupos que consumieron PI y MER ($p < 0,05$).

En el presente estudio se observa que, conforme mayor es la cantidad de AR presente en la dieta (70,51% para AN, 63,84% para PI y 11,04% para MER), las células neoplásicas no avanzan más allá de la membrana basal. A este respecto, en la figura 3 se observa el corte del colon de una rata del grupo MER con presencia de carcinoma *in situ* exofítico, siendo el tratamiento con MER el que menor cantidad de AR presentó.

DISCUSIÓN

Aparentemente, el proceso de pirodextrinización del AN de *M. AAA* 'Cavendish' no provocó un efecto considerable, al no incrementar el contenido de AR. Sin embargo, los resultados de los cambios a nivel molecular se evidencian en la microscopía electrónica de barrido, donde se puede observar que el tratamiento de pirodextrinización debilitó el gránulo, que no obstante no resultó totalmente hidrolizado. Está reportado que el gránulo de esta variedad presenta crestas y una capa superficial espesa que puede impedir la acción de agentes químicos externos como sería el caso del HCl en la pirodextrinización; sin embargo, su superficie es suave y densa, lo que lo hace más susceptible a la modificación enzimática (4). Esto sugiere que la MER fue hidrolizada por la α -amilasa durante su proceso de hidrólisis y no por el tratamiento de pirodextrinización.

Resultados similares se reportaron previamente con el AN de *M. AAA* 'Cavendish' al realizar una hidrólisis con HCl (2,2 M), produciéndose una disminución del AR y un aumento del almidón de digestión lenta (ADL). El almidón fue resistente al tratamiento y a la pérdida de su estructura granular, formando residuos que podían contener material amorfo, lo que pudo provocar el incremento del ADL y la reducción del AR posterior al tratamiento de hidrólisis ácida (15). Este mismo comportamiento pudo haber ocurrido en el presente estudio ya que, posteriormente al proceso de pirodextrinización, la cantidad de AR disminuyó y, aunque el contenido de AR por efecto de las modificaciones (química y enzimática)

no fue mayor que el que presentó el AN, la presencia de AR en los productos modificados hace suponer que la formación de enlaces atípicos durante la pirodextrinización se realizó en muy poca cantidad, con la posibilidad de que se incrementara la cantidad de ADL.

El efecto observado en los animales por la ingesta de los diferentes tratamientos muestra una disminución del pH y de la actividad enzimática de β -glucuronidasa, así como una mayor proporción de ácido butírico registrada en las heces de los animales que consumieron AN de *M. AAA 'Cavendish'*. Es posible considerar la posibilidad de que el AN fuera el tratamiento con la cantidad suficiente de AR para funcionar como fuente de carbono de las bacterias colónicas, lo que permitió la fermentación para producir AGCC (16), específicamente butírico, lo cual pudo haber favorecido la proliferación de las células integrantes de la mucosa sana a nivel del colon, contribuyendo a la reducción del pH intestinal (17). Se ha reportado que el consumo de AR produce un 41% de ácido acético, un 21% de ácido propiónico y un 38% ácido butírico (18). En el presente estudio, los animales que consumieron AN presentaron tanto en ciego como en colon un 43% de ácido butírico. Cabe mencionar que, aunque ciertos sustratos, como el AR, aparentemente presentan un efecto butirogénico en el colon, no se sabe en qué medida estimulan directamente la producción de este AGCC (19). Con respecto al estudio histopatológico, la enteritis eosinofílica del CN fue de curso benigno, caracterizada por infiltración de eosinófilos en cualquiera de las capas del tracto gastrointestinal, con o sin hipereosinofilia sanguínea; su presencia está ligada a síntomas alérgicos sistémicos y elevaciones de la inmunoglobulina E (IgE). Esto sugiere una posible etiología en relación con reacciones alérgicas de origen alimentario (20). Sin embargo, todos los animales a los que se les aplicó 1,2-DMH presentaron reacciones inflamatorias de subagudas a crónicas, lo que sugiere una inflamación intestinal idiopática caracterizada por infiltración linfoplasmocítica del tracto gastrointestinal. Se ha reportado

que esta infiltración puede variar ampliamente el estado de gravedad, ya que llega a estar acompañada de hiperplasia de células productoras de mucosa y atrofia o fibrosis, en donde el progresivo estadio puede incluso desencadenar la presencia de adenocarcinomas (21). El hecho de que los animales que consumieron AN hayan presentado menor enteritis linfoplasmocítica sugiere la presencia de menor toxicidad, lo que hace suponer que este efecto fue por la cantidad de AR presente en su dieta. El aumento del flujo sanguíneo colónico por la producción de ácido butírico contribuye a la disminución de la enfermedad inflamatoria intestinal, que es una condición de alto riesgo para el desarrollo de CCR (22). Esto coincide con los resultados de la presente investigación, ya que el AN produjo mayor cantidad de este ácido y, a la vez, disminuyó la toxicidad en los animales que consumieron esta dieta.

Es importante indicar que una limitante del presente estudio radicó en no tener los medios para evaluar el contenido de las fosas de las criptas aberrantes (FCA) en el colon de los animales. Sin embargo, otros estudios en ratas Wistar en los que se utilizó la misma dosis de 1,2-DMH empleada en el presente estudio han reportado la presencia de FCA, clásicas en el desarrollo temprano del CCR (6,23). Además, la evidencia de lesiones (displasia) en el 80% de los casos, con células neoplásicas sin rebasar la membrana basal (carcinoma *in situ*), sugieren un efecto carcinogénico (24).

En este estudio se observó que, conforme mayor es la cantidad de AR presente en la dieta (70,51% para AN, 63,84% para PI y 11,04% para MER), las células neoplásicas no avanzan más allá de la membrana basal, lo que sugiere que la cantidad de AR presente en la dieta es directamente proporcional al posible efecto protector o anticancerígeno celular. Los mecanismos precisos por los cuales el AR inhibe o promueve las lesiones preneoplásicas del colon no se conocen completamente. En general, el efecto anticancerígeno se ha atribuido principalmente a la fermentación de los AGCC lumbinales, particularmente el ácido butírico,

que inhibe la proliferación celular, induce la diferenciación y mejora la apoptosis en las células del CCR.



BIBLIOGRAFÍA

1. López NE, Weiss AC, Robles J, Fanta P, Ramamoorthy SL. A systematic review of clinically available gene expression profiling assays for stage II colorectal cancer: Initial steps toward genetic staging. *Am J Surg* 2016;212:700-14. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2016.06.019
2. Burness CB, Duggan ST. Trifluridine/Tipiracil:A review in metastatic colorectal cancer. *Drugs* 2016;76:1393-402. DOI: 10.1007/s40265-016-0633-9
3. Ma Z, Boye JI. Research advances on structural characterization of resistant starch and its structure-physiological function relationship: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018; 3;58(7):1059-83. DOI: 10.1080/10408398.2016.1230537
4. Ling LH, Osman EM, Fernandez JB, Reilly PJ. Physical properties of starch from Cavendish banana fruit. *Starch-Stärke* 1982;34(6):184-8. DOI: 10.1002/star.19820340603
5. Toraya-Avilés R, Segura-Campos M, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. Effects of pyroconversion and enzymatic hydrolysis on indigestible starch content and physicochemical properties of cassava (*Manihot esculenta*) starch. *Starch-Stärke* 2016;68:1-9. DOI: 10.1002/star.201600267
6. Prado-Silva L, Azevedo L, Oliveira JAC, Moreira APM, Schmiele M, Changd YK, et al. Sesame and resistant starch reduce the colon carcinogenesis and oxidative stress in 1,2-dimethylhydrazine-induced cancer in Wistar rats. *Food Res Int* 2014;62:609-17. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.04.027
7. Olvera-Hernández V, Betancur-Ancona D, Chel-Guerrero LA, Ble-Castillo JL, Castellanos-Ruelas AF. Morphological and Physicochemical Changes in Great Dwarf Banana (*Musa Cavendish AAA*) Starch Modified by Pyrodextrinization and Enzymatic Hydrolysis. *Starch-Stärke* 2017;70:1-9. DOI: 10.1002/star.201700122

8. Ottenhof MA, Farhat IA. The effect of gluten on the retrogradation of wheat starch. *J Cereal Sci* 2004;40(3):269-74. DOI: 10.1016/j.jcs.2004.07.002
9. Ying Z, Shaohua M, Deyi C, Xiping Z, Huaibo Y. Structure characterization and hypoglycemic effects of dual modified resistant starch from indica rice starch. *Carbohydr Polym* 2014;15(103):81-6. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.12.020
10. Jenab M, Thompson LU. The influence of flaxseed and lignans on colon carcinogenesis and beta-glucuronidase activity. *Carcinogenesis* 1996;17(6):1343-8. DOI: 10.1093/carcin/17.6.1343
11. Tochio T, Kitaura Y, Nakamura S, Sugawa C, Takahashi M. An alteration in the cecal microbiota composition by feeding of 1-kestose results in a marked increase in the cecal butyrate content in rats. *Plos One* 2016;18(11). DOI: 10.1371/journal.pone.0166850
12. Yuan H, Chen Y, Zhang H, Jiang S, Zhou Q, Gu G. Improved bioproduction of short-chain fatty acids (SCFAs) from excess sludge under alkaline conditions. *Environ Sci Technol* 2006;40(6):2025-9. DOI: 10.1021/es052252b
13. Shwter AN, Abdullah NA, Alshawsh MA, Alsalahi A, Hajrezaei M, Almaqrami AA, et al. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci by *Gynura procumbens* in rats. *J Ethnopharmacol* 2014;151(3):1194-201. DOI: 10.1016/j.jep.2013.12.044
14. Olvi LG, González ML, Santini E. Diagnóstico histopatológico de tumores de tejidos blandos. *Rev Hosp Niños B Aires* 2011;53(242):94-101.
15. Espinosa-Solís V, Jay-Lin J, Bello-Pérez LA. Physicochemical characteristics of starches from unripe fruits of mango and banana. *Starch-Stärke* 2009;61(5):291-9. DOI: 10.1002/star.200800103
16. Keenan MJ, Zhou J, McCutcheon KL, Raggio AM, Bateman HG, Todd E, et al. Effects of resistant starch, a non-digestible fermentable fiber,

- on reducing body fat. *Obesity* 2006;14(9):1523-34. DOI: 10.1038/oby.2006.176
17. Mentschel J, Claus R. Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and a shift to the stem cell compartment. *Metabolism* 2003;52(11):1400-5. DOI: 10.1016/S0026-0495(03)00318-4
 18. Sharma A, Yadav BS, Ritika. Resistant starch: Physiological roles and food applications. *Food Rev Int* 2008;24(2):193-234. DOI: 10.1080/87559120801926237
 19. Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 2002;217(2):133-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11467.x
 20. Lucendo AJ, Arias A. Eosinophilic gastroenteritis: an update. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;6(5):591-601. DOI: 10.1586/egh.12.42
 21. Washabau R, Day MJ. *Canine and feline gastroenterology*. USA, St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; 2013. pp. 606-50.
 22. Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol* 2013;35(2):229-44. DOI: 10.1007/s00281-012-0352-6
 23. Dias MC, Vieiralves NF, Gomes MI, Salvadori DM, Rodrigues MA, Barbisan LF. Effects of lycopene, synbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol* 2010;48,772-80. DOI: 10.1016/j.fct.2009.12.003
 24. Withrow SJ, Vail DM, Page R. *Small animal clinical oncology*. 5th edition, USA, St. Louis: Saunders; 2013. pp. 345-7.

Tabla I. Efecto del almidón nativo de *M. acuminata* AAA 'Cavendish' pirodextrinizado e hidrolizado enzimáticamente sobre diversos parámetros fecales de ratas tratadas con 1,2-dimetilhidrazina

Parámetros	CN	CP	AN	PI	ME
pH en ciego	6,15	6,87	6,67	6,75	6,81
	± 0,10 ^a	± 0,07 ^b	± 0,16 ^c	± 0,10 ^b	± 0,24 ^b
pH en colon	6,41	6,90	6,72	6,77	6,91
	± 0,02 ^a	± 0,02 ^b	± 0,09 ^c	± 0,04 ^c	± 0,19 ^b
β-glucuronidas a (nmol/min/g)					
Ciego	2,98	4,03	3,65	3,63	3,59
	± 0,01 ^a	± 0,28 ^b	± 0,04 ^c	± 0,09 ^c	± 0,02 ^c
Colon	3,03	3,58	3,29	3,32	3,46
	± 0,05 ^a	± 0,05 ^b	± 0,34 ^c	± 0,14 ^c	± 0,01 ^c
Ácido butírico (μmol es/g)					
Ciego	21,0	14,3	15,3	14,0	14,2
	2 ± 0,40 ^a	4 ± 0,65 ^b	0 ± 0,02 ^b	5 ± 0,74 ^b	8 ± 0,93 ^b
Colon	11,1	7,2	10,7	8,62	5,40
	3 ± 0,82 ^a	± 0,37 ^b	5 ± 0,36 ^a	± 0,13 ^b	± 0,05 ^b
Ácido acético (μmol es/g)					
Ciego	17,3	14,4	14,8	14,7	16,8
	4 ± 0,54 ^a	1 ± 0,24 ^b	3 ± 0,42 ^b	7 ± 0,04 ^b	5 ± 0,31 ^a
Colon	13,8	11,4	13,6	12,5	11,0
	5 ± 0,39 ^a	1 ± 0,13 ^b	9 ± 0,13 ^a	2 ± 0,49 ^b	0 ± 0,16 ^{b, c}

propiónico
(μmol
es/g)

Ciego	9,79	7,26	8,70	8,15	8,82
	$\pm 0,37^a$	$\pm 0,17^b$	$\pm 0,46^c$	$\pm 0,07^c$	$\pm 0,40^{a,c}$
Colon	8,90	6,51	7,61	7,02	6,45
	$\pm 0,38^a$	$\pm 0,18^b$	$\pm 0,20^c$	$\pm 0,36^c$	$\pm 0,31^b$

Promedio \pm error estándar de la media (n = 5). ^{a-c} Las letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). CN: control negativo; CP: control positivo; AN: almidón nativo; PI: pirodextrina; MER: maltodextrina resistente.

Nutrición
Hospitalaria

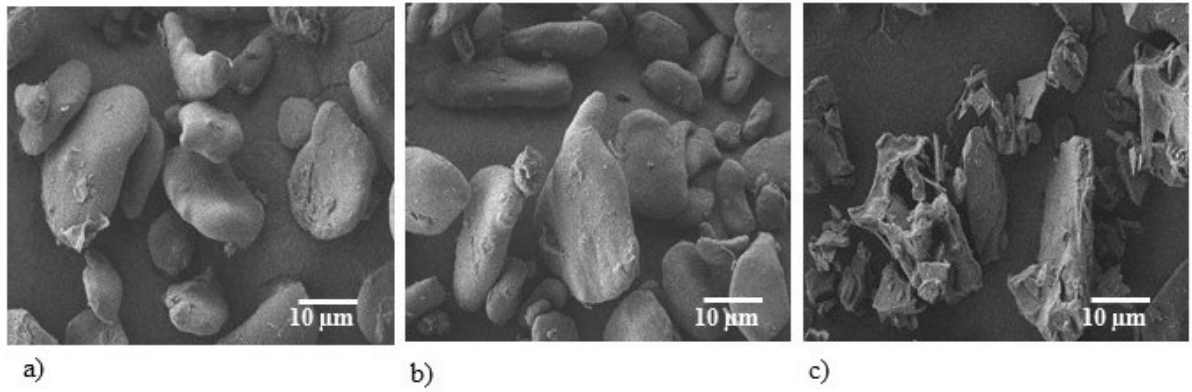


Fig. 1. Micrografía del almidón de *M. acuminata* AAA 'Cavendish': nativo (A); con pirodextrina (B) y con maltodextrina resistente (C).

Nutrición
Hospitalaria

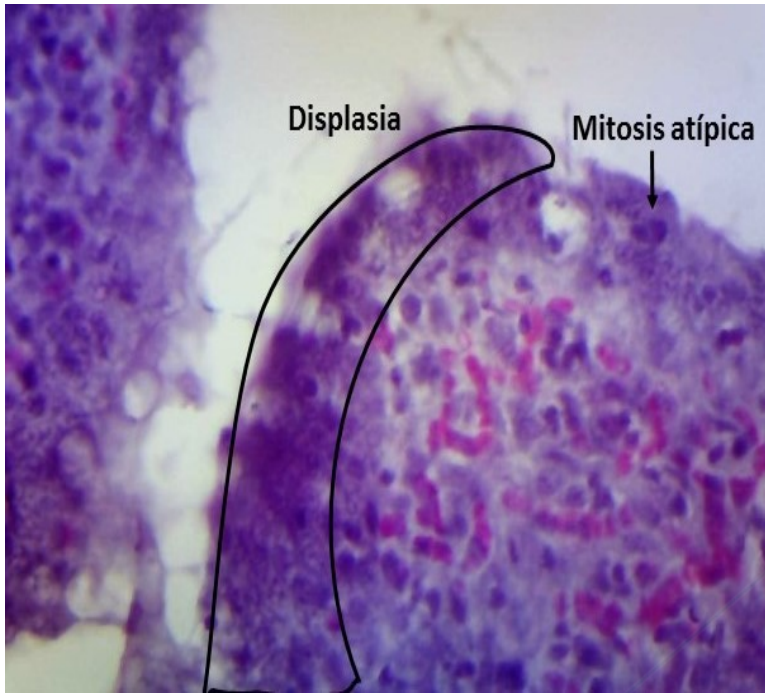


Fig. 2. Corte del colon de una rata del grupo de control positivo. Fotomicrografía tomada con la técnica de tinción habitual de hematoxilina-eosina (HE) (1000 X).

Nutrición
Hospitalaria

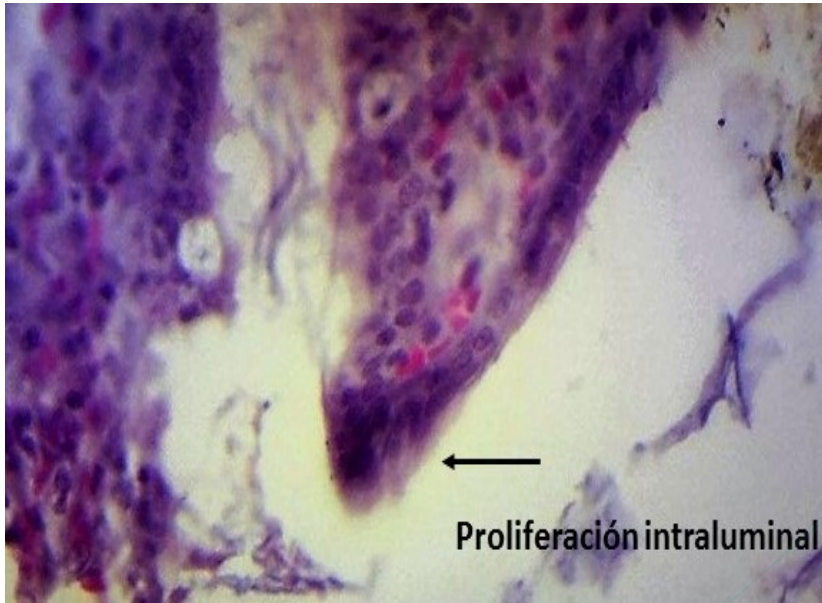


Fig. 3. Corte del colon de una rata con ingesta de maltodextrina resistente. Fotomicrografía tomada con la técnica de tinción habitual de hematoxilina-eosina (HE) (1000 X).

Nutrición
Hospitalaria