



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**Programa Institucional de Maestría en Ciencias
Biológicas**

FACULTAD QUIMICO FARMACOBIOLOGÍA

**EFFECTO DEL CONSUMO DE FIBRA DIETÉTICA EN LA
EXPRESIÓN CUANTITATIVA DE RECEPTORES DE BUTIRATO EN
COLON DE RATAS**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

LUCILA YAZMÍN CORTE OSORIO

Directores de tesis

D.C. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES

D.C. RAFAEL ORTIZ ALVARADO

Morelia Michoacán, Agosto 2010

Agradecimientos:

A Dios, por bendecirme a lo largo de este proyecto.

A mi esposo, por ser la persona que me hizo sonreír en los momentos más difíciles.

A mis padres, por su apoyo incondicional y por creer en mí.

A mi hermano, por ser parte de mi vida.

A Almis, por ser mi hermana y amiga.

A Perla, por inspirarme.

A mis suegros y cuñados, por dejarme ser parte de sus vidas.

Al doctor Héctor Martínez, por su confianza, apoyo y por facilitarme el recorrido a través de esta experiencia

Al doctor Rafa Ortiz no sólo por confiar en mí, sino por haberme fomentado confianza en mí misma.

A mis amigos: Susana, Edith, Leslie, Luis y Arim, ustedes contribuyeron a alivianar mis días.

Al doctor Sosa, por haberme animado a ser mejor.

Al doctor Rosalío, por sus valiosas aportaciones.

Al doctor Jesús Ramírez, por haber estado siempre pendiente de mi trabajo.

CONTENIDO

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT.....	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
4.	ANTECEDENTES.....	5
4.1	Nopal.....	6
4.2	Butirato.....	9
4.3	Receptores de Butirato	14
5.	JUSTIFICACIÓN.....	16
6.	HIPÓTESIS.....	17
7.	OBJETIVOS	18
7.1	General.....	18
7.2	Específicos.....	18
8.	METODOLOGÍA	19
8.1	Caracterización de la Fuente de Fibra Dietética	19
8.2	Distribución de los Animales de Experimentación.....	20
8.3	Formulación de las Dietas.....	20
8.4	Disección de Intestino Grueso.....	22
8.5	Extracción de RNA.....	22
8.6	RT-PCR.....	22
8.7	RT-PCR en tiempo real	23
9.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
9.1	Resultados	25
9.2	Discusión.....	35
10.	CONCLUSIÓN.....	38
11.	referencias bibliográficas	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la celulosa	7
Figura 2. Estructura de la pared celular de un vegetal	7
Figura 3. Estructura de la lignina	8
Figura 4. Estructura de una pectina.	8
Figura 5. Rutas metabólicas que utilizan las bacterias del colon	10
Figura 6. Ruta metabólica que siguen los colonocitos	11
Figura 7. Proceso de secado solar de nopal	19
Figura 8. Secuencia de RNAm de los genes GPR43 y GPR41	24
Figura 9. Expresión de β -actina	26
Figura 10. Valores de CP de β -actina	27
Figura 11. Expresión de GPR43	28
Figura 12. Expresión de GPR41	30
Figura 13. Niveles de expresión de GPR43	32
Figura 14. Niveles de expresión de GPR41	33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Bacterias sacarolíticas colónicas	9
Cuadro 2. Fórmula de la dieta para roedores experimentales.....	21
Cuadro 3. Número de ascensión, secuencia de oligonucleótidos y tamaño de producto de amplificación de los genes GPR43, GPR41 y β -actina.....	23
Cuadro 4. Cuadro comparativo de las determinaciones realizadas al nopal sometido a dos procesos de secado	25

1. RESUMEN

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) acetato, propionato y butirato, son los principales productos de fermentación de la fibra dietética (FD) en el intestino grueso. De ellos, el butirato ha sido recientemente estudiado por su relevancia como factor trófico indispensable para el mantenimiento de las funciones del colon y por su relación con la protección en el cáncer colorrectal. Esto se atribuye principalmente a la capacidad de butirato de regular la expresión de genes por mecanismos como la inhibición de la enzima histona deacetilasa. Por otro lado, investigaciones recientes reportan que los receptores de AGCC GPR41 y GPR43 están involucrados en el proceso de transducción de señales intracelulares una vez que se unen a ligandos como el butirato para generar los diferentes tipos de respuesta, que se traducen como efectos fisiológicos del butirato en los colonocitos. Este trabajo tiene como objetivo determinar si el consumo de FD proveniente de nopal (con una proporción de fibra soluble-insoluble de 40-60) tiene influencia directa sobre la expresión cuantitativa de los receptores específicos de butirato GPR43 y GPR41. Para ello, se utilizaron ratas Wistar como modelos de experimentación y se sometieron a cuatro diferentes dietas, las cuales se formularon variando el contenido de FD de la siguiente manera: Dieta 0, A, B y C conteniendo 0, 5, 15 y 25% de FD, respectivamente. Los resultados arrojados por este estudio demostraron un aumento significativo de la expresión relativa de GPR43 cuando se suministró a las ratas una dieta conteniendo 5% de FD proveniente de nopal, usando como gen de referencia β -actina, así como una tendencia de GPR41 de aumentar su expresión en las mismas condiciones. Se estima que los resultados de esta investigación aportarán nuevos datos a los estudios que determinan la relación de la dieta con la salud intestinal, con el fin de ampliar el conocimiento sobre los efectos del ácido butírico en las funciones colónicas.

2. ABSTRACT

Short chain fatty acids (SCFA) acetate, propionate and butyrate are the major anions produced by the bacterial fermentation of dietary fiber in colon. Butyrate has been recently studied because is important to maintain colonic functions and because it has been related with a protective effect in colorectal cancer, which is mainly explained by its potential to regulate gene expression by inhibiting enzyme histone deacetylase (HDAC). Recent investigations shown that SCFA receptors GPR41 and GPR43 are involved in signal transduction mechanisms once they bind to ligands such as butyrate to generate different physiological effects in colonocytes. The aim of this work was to determine if dietary fiber consumption from nopal (*Opuntia ficus l.*, containing a ratio of soluble-insoluble fiber 40/60, has a direct influence on the quantitative expression of butyrate-specific receptors GPR41 and GPR43. Wistar rats were fed with four different diets formulated at different concentrations of dietary fiber as follows: Diet 0, A, B and C, containing 0, 5, 15 and 25% of dietary fiber from *opuntia*, respectively. The results of this investigation showed a tendency to increase in the expression of GPR43 (93.1%) and GPR41 (102.1%) when rats were fed with a 5% fiber diet, using β -actin as a reference gene. The results of this investigation will contribute to determinate the relation of diet with intestinal health for the purpose of expanding the knowledge of butyric acid on colonic functions.

3. INTRODUCCIÓN

La alimentación es sin duda un factor fundamental en el mantenimiento de la salud de los seres vivos, por esta razón, la comunidad científica actual se ha dado a la tarea de investigar en este campo para generar nuevos conocimientos en torno al tipo de alimentación de la sociedad y mejorar así la calidad de vida. Este trabajo enfoca su estudio en la FD y los metabolitos resultantes de su ingesta, así como los beneficios que este alimento aporta a la salud y bienestar de los individuos que lo consumen. La FD es la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado humano con una completa o parcial fermentación en el intestino grueso (Anon, 2001) por parte de la microflora que lo habita, la cual es extensa y diversa, reportándose 10^{12} bacterias/g materia húmeda (Cummings & MacFarlane, 1991), así que no es de extrañarse que la actividad de esta población tenga un impacto significativo en la salud del huésped. Son las bacterias sacarolíticas las encargadas de la fermentación de carbohidratos en el colon, siendo las especies predominantes *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacilli* y *Clostridia*. Como resultado del proceso de fermentación se producen gases (dióxido de carbono, hidrógeno y metano), agua, se incrementa el número total de bacterias (biomasa) y se generan ácidos grasos de cadena corta (AGCC), fundamentalmente acético, propiónico y butírico.

En la última década, se le ha dado una importancia mayor al consumo de FD, esto debido, quizá, a que la población actual enfrenta un riesgo creciente de padecer enfermedades relacionadas con una alimentación deficiente, tales como diabetes, cáncer de colon, hipertensión, y otros desórdenes metabólicos. Los estudios relacionados con este tema afirman que la FD juega un papel preventivo y terapéutico importante contra estos padecimientos (Jacobasch *et al.*, 1999; Wollowski *et al.*, 2001; Bauer-Marinovic *et al.*, 2006).

Los mecanismos en que la FD aporta efectos benéficos a los individuos que la incluyen en su dieta se deben a sus propiedades fisicoquímicas de las cuales destacan las siguientes:

- Capacidad de retención de agua y aceites
- Viscosidad y formación de geles
- Hidratación
- Adsorción de macronutrientes y toxinas
- Tamaño de partícula
- Interacciones iónicas
- Fermentabilidad

Entre los anteriores, la fermentabilidad de la FD es uno de los factores más importantes, ya que se sabe también que los AGCC, resultantes de la fermentación de los carbohidratos indigeribles, son la principal fuente de energía de los colonocitos (Cummings *et al.*, 1995), tienen influencia en el flujo sanguíneo del colon (Mortensen *et al.*, 1995), regulan la motilidad intestinal (Ono *et al.*, 2004), promueven el intercambio de iones como el bicarbonato y el calcio (Yajima, 1988) e incluso se ha documentado que desempeñan un papel de prevención, protección y tratamiento contra el cáncer de colon (Fu *et al.*, 2004).

Por lo anterior, los AGCC juegan un papel muy importante en el colon, de esta manera está mediada la relación simbiótica que mantienen las bacterias de la microflora con la mucosa colónica humana.

Además, las células del colon cuentan con receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPR) específicos para AGCC, y son principalmente el GPR41 y GPR43. La importancia del estudio de los receptores de AGCC radica en el papel que desempeñan estas moléculas en la salud y bienestar del colon; en especial el butirato, dada su relevancia como factor trófico y por su relación con la protección en el cáncer colorrectal explicada en descubrimientos recientes.

4. ANTECEDENTES

FIBRA DIETÉTICA

La FD no es considerada un nutriente, sin embargo, los beneficios que aporta al organismo y la energía que se deriva de su fermentación la hacen un alimento indispensable para el buen funcionamiento colónico. Sus efectos en el organismo están dados por sus propiedades fisicoquímicas, las cuales se mencionan a continuación.

4.1.1 Propiedades fisicoquímicas

Viscosidad y formación de geles.- Uno de los posibles mecanismos por los cuales la FD reduce los factores de riesgo provocado por las enfermedades cardiovasculares (ECV) es que la fracción soluble (FS) se hidrata en el tracto gastrointestinal, formando una matriz gelatinosa que tiene la capacidad de enlazar el colesterol y lípidos, interfiriendo con su absorción (Scheeneman, 1989; Topping, 1991). Otra explicación es que el incremento en la excreción de esteroides es responsable de bajar los niveles de colesterol. Ciertos tipos de FD pueden enlazar las sales biliares y esteroides neutros (Stark y Madar, 1993), y de esta manera promover su remoción del cuerpo. Para compensar la pérdida de sales biliares excretadas en las heces, el ciclo enterohepático pone disponible pequeñas cantidades de sales biliares, necesarias para la absorción intestinal de las sustancias liposolubles, disminuyendo por tanto, la absorción de colesterol de la dieta. Además, para compensar los bajos niveles de sales biliares en el organismo, el colesterol sanguíneo y hepático es usado para la síntesis nueva de ácidos biliares.

Retención de agua y aceite.- Este efecto se traduce en la capacidad de las fibras de absorber macronutrientes, La fracción insoluble (FI) y la FS pueden absorber compuestos tóxicos impidiendo que los mismos estén disponibles en el intestino, así como ácidos biliares, reduciendo la formación de micelas y disminuyendo la absorción de colesterol. También influyen en la absorción de glucosa, teniendo entonces, un efecto hipoglucémico.

Tamaño de partícula.- El grado de molienda que alcance la FD durante la masticación y digestión puede producir diferentes efectos: fibras menores de 200 μ presentan mayor capacidad de hidratación y fermentabilidad, pues poseen mayor superficie de contacto. Fibras de tamaño de partícula mayor de 800 μ estimulan la defecación, aumentando el volumen fecal y evitando la constipación. El tamaño de partícula se estandarizó en este estudio para que fuera administrado a las ratas en una mezcla homogénea en polvo, siendo de 51 μ .

Interacciones iónicas.- Los fitatos y compuestos fenólicos, elementos asociados a las fibras, pueden formar complejos insolubles con minerales promoviendo la reducción de la absorción intestinal de los micronutrientes.

Fermentabilidad.- La fermentación colónica tiene importantes repercusiones sobre la salud del huésped. Algunos metabolitos bacterianos son *per se* sustancias tóxicas para el organismo (amoníaco, aminas y nitrosaminas carcinógenas, facapentaenos). Otros, pueden reducir la biodisponibilidad de vitaminas y minerales. Sin embargo, el incremento de la masa bacteriana y los AGCC (productos mayoritarios de fermentación), tienen efectos beneficiosos para el organismo, y se relacionan con la etiología y prevención de diferentes patologías de gran incidencia actualmente, como son el cáncer de colon y ECV. La fermentación de la FD de origen vegetal está determinada por sus propiedades fisicoquímicas, el grado de lignificación de la pared celular, su solubilidad en agua, el tamaño de partícula y la presencia de otros componentes vegetales capaces de inhibir la actividad bacteriana. Los almidones resistentes, por otro lado, pueden ser degradados casi completamente por la microflora colónica, las características fisicoquímicas tales como cristalinidad, puentes de hidrógeno, etc., determinan la velocidad de degradación.

4.1 NOPAL

Existe sin duda una gran variedad de alimentos ricos en FD, sin embargo, este estudio pone especial interés en el nopal (*Opuntia ficus-indica*) como fuente de FD en la alimentación de roedores de laboratorio (ratas *Wistar*). Se pensó en incluir al nopal por ser una especie endémica de México y por su contenido de FD

tanto soluble como insoluble, además de ser un alimento muy socorrido por los mexicanos en todos los niveles sociales y a lo largo de la extensión territorial.

El nopal es endémico de América, se conocen 258 especies, 100 de las cuales existen en México, principal productor a nivel mundial. Se le llama nopal a varias especies del género *Opuntia*, de la familia de las cactáceas, *Opuntia ficus-indica* es la especie que consumimos normalmente y a la que se hace referencia en este estudio. La producción de nopal se ha incrementado durante la última década según el Consejo del Nopal y Tuna del D.F. Aunque se siembra en 23 estados de la República, son 4 entidades las principales productoras de nopal: Distrito Federal (303,755 toneladas), Morelos (61,110), Estado de México (14,464) y Aguascalientes (13,178). De las 436,222 toneladas cosechadas al año, 97% se consume fresco y el 3% restante es utilizado como materia prima por las industrias de alimentos, farmacéutica y perfumería. Su demanda también se ha incrementado en el extranjero y aunque México es el principal exportador la cantidad de nopal vendida en otras partes del mundo aún es poca, menos del 1% de la producción nacional. Estados Unidos es el principal mercado seguido por Japón y algunos países europeos.

El contenido de fibra del nopal consta principalmente de lignina, celulosa, hemicelulosa, pectina y mucílagos cuyas estructuras se muestran en las figuras 1-4.

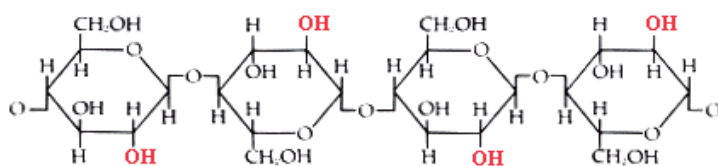


Figura 1. Estructura de la celulosa

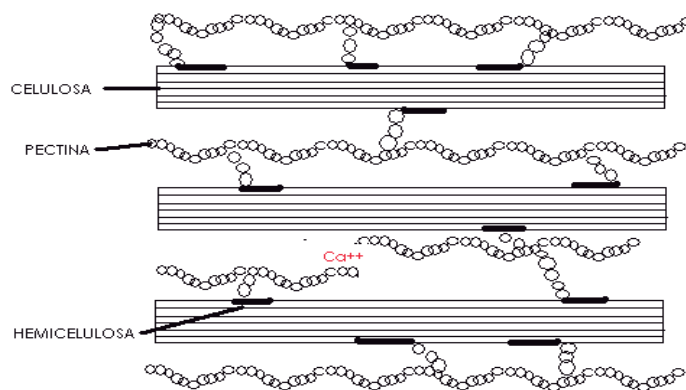


Figura 2. Estructura de las fibras que contiene la pared celular de un vegetal

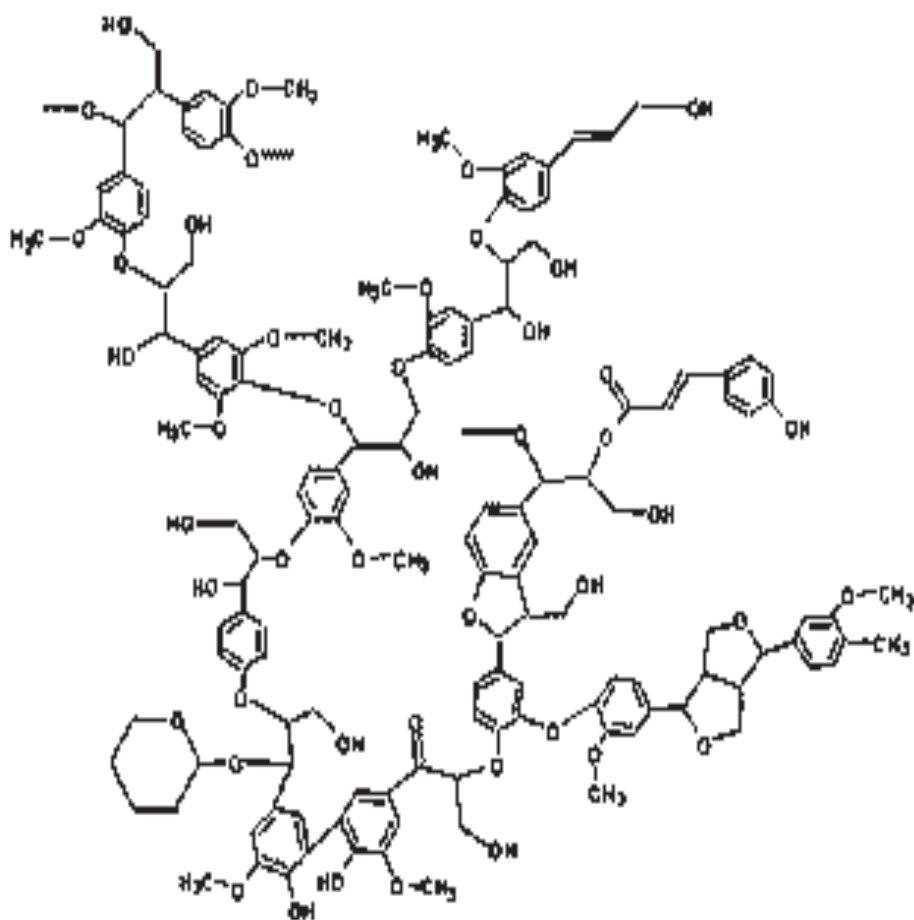


Figura 3. Estructura de la lignina

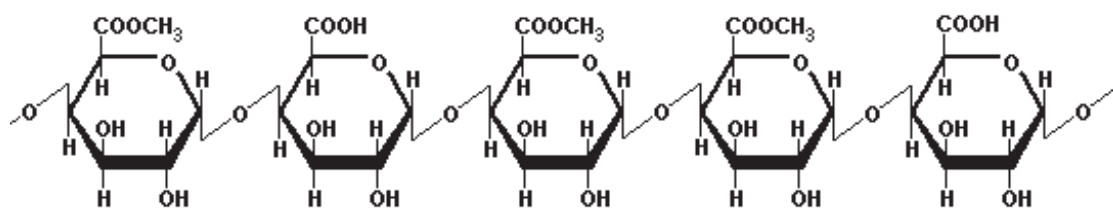


Figura 4. Estructura de una pectina, polímero de ácido α -galacturónico con un número variable de metil ésteres.

4.2 BUTIRATO

4.2.1 Producción de Butirato en colon

Las bacterias productoras de ácido butírico están constituidas por miembros del género *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptococci* y por *Butyribacterium* y *Sarcina máxima* (Cuadro 1). Los clostridios son bacilos gram positivos esporógenos que pueden presentar forma de mazo o raqueta debido a que la espora terminal es más ancha que la célula vegetativa. Muchos son activamente móviles y tienen una ligera tendencia a formar filamentos y cadenas. Son anaerobios estrictos. Se pueden dividir en dos grandes grupos: clostridios sacarolíticos y proteolíticos. Las especies sacarolíticas utilizan azúcares para formar ácido butírico, ácido acético y alcoholes. Las especies proteolíticas atacan aminoácidos y no pueden utilizar azúcares. *Butyribacterium rettgeri* es la actual denominación de *Eubacterium limosum*, y está incluido dentro del grupo de las propionibacteriáceas anaerobias con carácter obligado y que producen ácido butírico. *Sarcina maxima*, que también produce ácido butírico, es un coco gram positivo que se presenta frecuentemente en paquetes de ocho células. Esta especie es estrictamente anaerobia y está incluida en la familia de las peptococáceas. En la Figura 5 se muestran las rutas metabólicas que las bacterias colónicas usan para fermentar la FD.

Cuadro 1. Bacterias sacarolíticas colónicas. Sustratos y productos de fermentación

Bacteria	Sustratos	Productos
Bacteroides	Arabinogalactanos, pectinas, almidón, celulosa, xilanos, goma guar, mucinas, heparina	Ac, Pr, Suc, Lac
Bifidobacteria	Arabinogalactanos, pectinas, almidón, mucinas, goma arábica, xilanos	Ac, For, Lac, Et
Eubacteria	Almidón, pectinas	Ac, Bu, Lac
Clostridia	Almidón, pectinas	Ac, Pr, Bu, Lac, Et
Lactobacillo	Polisacáridos	Ac, Lac
Peptococo	Aminoácidos	Ac, Bu, Lac
Peptostreptococo	Polisacáridos, aminoácidos	Ac, Lac
Ruminococo	Mucinas, goma guar	Ac

Ac, acetato; Bu, butirato; Et, etanol; For, ácido fórmico; Lac, lactato; Pr, propionato; Suc, succinato. (Cummings & Macfarlane, 1991)

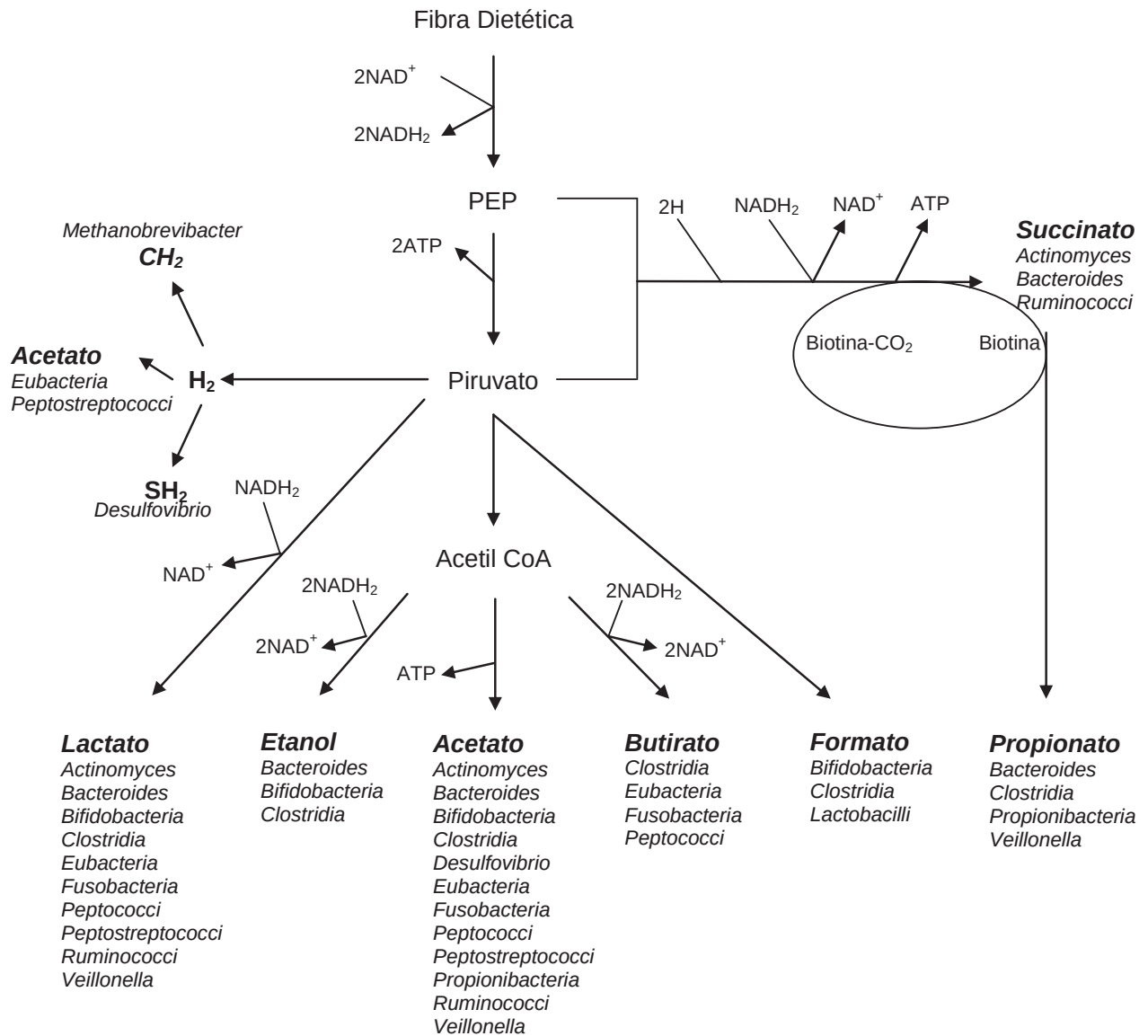


Figura 5. Rutas metabólicas que utilizan las bacterias del colon para fermentar la FD.

4.2.2 Metabolismo del butirato en colon

El butirato, producto final de la fermentación colónica, tiene gran trascendencia en el intestino grueso debido a que se considera una molécula altamente energética que es rápidamente absorbible y metabolizable. Algunos descubrimientos muestran que el butirato es el combustible preferido por las células del epitelio colónico, se cuantifica un 70% del consumo total de energía. Roediger (1980) documentó que más del 70% del oxígeno consumido por los colonocitos del colon ascendente y descendente se produjo por la oxidación del butirato. Parte del butirato que es oxidado es convertido a cuerpos cetónicos (Figura 6). La cetogénesis es, generalmente, un indicador de la oxidación de las grasas y se toma para considerar la conservación de energía del organismo de los herbívoros, especialmente los rumiantes, que absorben grandes cantidades de AGCC. Tomando en cuenta estos datos se puede considerar al butirato no sólo como proveedor de energía para el organismo sino como la fuente de energía predominante en el epitelio de la mucosa colónica pues aún en presencia de glucosa el butirato permanece como el principal combustible de los colonocitos.

A pesar de que en el intestino delgado, específicamente en el íleon, se absorben AGCC, los enterocitos no llevan a cabo la formación de cuerpos cetónicos. La habilidad de producir cuerpos cetónicos y oxidar butirato es una diferencia metabólica entre la mucosa del intestino delgado y grueso.

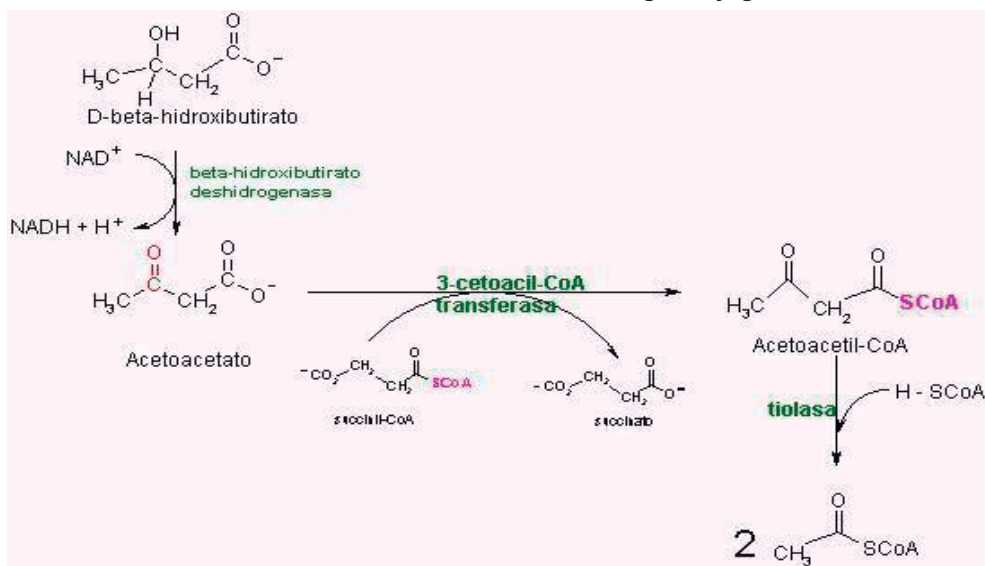


Figura 6. Ruta metabólica que siguen los colonocitos para convertir el butirato a cuerpos cetónicos.

4.2.3 Funciones del butirato

Además de lo mencionado, el butirato influye ampliamente en diversas funciones celulares; se le atribuyen las siguientes propiedades:

- **Potencial anticarcinogénico.**- Se ha propuesto que el butirato tiene efectos de prevención e inhibición de la carcinogénesis de colon, encontrándose una relación inversa entre la ingesta de FD y la incidencia de cáncer colorectal. La exposición *in vitro* de muchas líneas celulares de tumores a butirato conduce a un efecto anticarcinogénico por la inducción de la apoptosis (Hinnebush *et al.*, 2002), la inhibición de la proliferación (Comalada *et al.*, 2006) y la promoción de un fenotipo más diferenciado (Hodin *et al.*, 1996). Se considera que la habilidad del butirato de influenciar las funciones celulares está dada por su capacidad para regular la expresión de genes, la cual a menudo se atribuye a la inhibición de la enzima histona deacetilasa (HDAC) (Hinnebush *et al.*, 2002). Sin embargo, se conocen otros blancos intracelulares del butirato, incluyendo la hiperacetilación de otras proteínas, alteración de la metilación de DNA, inhibición selectiva de fosforilación de histonas y la modulación de las señales intracelulares de cinasas.
- **Efecto anti-inflamatorio.**- Existen evidencias de que el butirato puede ejercer efectos inmuno-modulatorios directos. La supresión de la activación del factor nuclear Kappa B, la cual pudiera resultar de la inhibición de HDAC, es un efecto antiinflamatorio frecuentemente estudiado (Andoh *et al.*, 1999). El factor nuclear Kappa B es un factor de transcripción que controla la expresión de genes que codifican para citocinas proinflamatorias, así como quimiocinas y prostaglandinas.
- **Regulación del estrés oxidativo.**- El estrés oxidativo es el resultado de un desbalance entre la generación de oxígeno y nitrógeno reactivos y los mecanismos de defensa antioxidante. La fuente más importante de oxígeno reactivo en condiciones normales en organismos aeróbicos es probablemente la pérdida de oxígeno activado (anión superóxido) de las mitocondrias durante el funcionamiento normal de la respiración oxidativa. El peróxido de hidrógeno,

otro común oxidante, es producido por una amplia variedad de enzimas incluidas las monooxigenasas y oxidasas. Hay algunas evidencias de que el butirato puede modular el estrés oxidativo. En dos estudios, la preincubación de colonocitos de rata (Abrahamse *et al.*, 1999) y de humano (Rosignoli *et al.*, 2001) con butirato mostraron una significativa reducción de daño al DNA inducido por peróxido de hidrógeno. Este daño al DNA es inversamente proporcional a las concentraciones de butirato (Toden *et al.* 2007).

- **Modulación de la barrera intestinal y la permeabilidad.**- Se ha mostrado que el butirato afecta varios componentes de la barrera de defensa colónica, resultando en una protección mejorada contra antígenos lumenales. Un componente importante de esta barrera es la capa de moco que cubre el epitelio consistiendo principalmente de glicoproteínas de mucina. El gen MUC2 es el que se expresa predominantemente en el colon y en diferentes estudios se ha probado que el butirato aumenta su expresión (Gaudier *et al.*, 2004). Por otra parte, la permeabilidad celular es un parámetro importante de la barrera de defensa intestinal. El estudio realizado por Peng *et al.* (2007) demostró que las concentraciones bajas (2mM) de butirato inducen un decremento en la permeabilidad de las líneas celulares Caco-2 y HT29 (líneas celulares de adenocarcinoma colorectal, se usan como modelos de tejido intestinal humano) mientras que concentraciones altas (8 mM) incrementaron la permeabilidad de las células.
- **Regulación de la saciedad.**- Las células endócrinas L están presentes en la mucosa colónica en altas concentraciones y secretan péptidos del tipo glucagon, péptido YY (PYY) y oxintomodulina, involucrados en la regulación del apetito (Delzenne *et al.*, 2005). En muchos estudios con animales usando carbohidratos fermentables como inulina, lactitol y fructooligosacáridos, fue reportado un incremento de la saciedad, una menor ganancia de peso y un incremento en la producción endógena de Péptido similar al glucagon 1 (GLP-1) y/o PYY (Delmee *et al.*, 2006). Se cree que este incremento en la saciedad es promovido por la producción de AGCC. Esto está apoyado por diversos estudios como el de Zhou *et al.* (2006) en el que el butirato incrementó la

expresión del PYY (péptido tirosina tirosina) y pro-glucagon en células epiteliales de rata *in vitro*.

4.3 RECEPTORES DE BUTIRATO

Se considera que los efectos de los AGCC en el lumen intestinal son inducidos por la activación de receptores específicos y/o por la absorción en células epiteliales, pero los mecanismos por los cuales los AGCC intraluminales son detectados se están descubriendo todavía. Brown *et al.* (2003) y Le Poul *et al.* (2003) reportaron simultáneamente que los receptores de AGCC fueron identificados como receptores acoplados a proteínas G, específicamente GPR41 y GPR43. También se reportó que ambos receptores están acoplados con G_q y G_{i/o}, y su activación induce un incremento en la concentración de calcio intracelular y una disminución de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) intracelular. GPR41 inicia su señalización principalmente acoplado a proteínas G_{i/o} y GPR43 está acoplado principalmente a proteínas G_q.

La familia de receptores GPR40 fue identificada originalmente por Sawzdargo *et al.* (1997). Los tres miembros principales de esta familia (ejemplificados por los receptores humanos GPR40, GPR41 y GPR43) están conservados en todas las especies de mamíferos (Brown *et al.*, 2005).

El orden de potencia de cada AGCC para activar ambos receptores es propionato > butirato > acetato.

En cuanto a la expresión de los receptores para AGCC, GPR43 se detecta en extractos de pared y mucosa de colon humano y de rata pero no en músculo y extracto de submucosa y GPR41 muestra un patrón de expresión muy parecido (Tazoe *et al.*, 2008)

Se ha reportado que los AGCC inducen mejoras en la motilidad intestinal por la liberación de serotonina (5-HT). Existen dos posibles fuentes de 5-HT: células enteroendócrinas que se encuentran a lo largo del tracto gastrointestinal y los mastocitos que se encuentran en la lamina mucosal del intestino de las ratas.

Se ha demostrado que GPR43 se co-expresa en los mastocitos por lo que pueden ser la fuente de 5-HT liberado por los AGCC (Karaki *et al.*, 2006).

Como se mencionó, los AGCC son producidos por la fermentación de carbohidratos de la FD en el lumen colónico. Por lo tanto, la presencia de carbohidratos en el lumen refleja la actividad de la flora bacteriana y los receptores de AGCC posiblemente monitorean las bacterias para defensa del huésped. De hecho, se ha reportado la expresión de GPR41 y GPR43 en células del sistema inmune, incluyendo células polimorfonucleares (GPR41 y GPR43), monocitos (GPR43), células dendríticas (GPR41) (Le Poul *et al.*, 2003) y mastocitos (GPR43) (Karaki *et al.*, 2006). De éstas, las células polimorfonucleares, los monocitos y las células dendríticas son los fagocitos para antígenos no selectivos del sistema inmune innato.

Se han propuesto diferentes mecanismos de absorción de AGCC a través de la membrana apical de los colonocitos, incluyendo la difusión de la forma no disociada (liposoluble), el intercambio de AGCC/ HCO_3^- , y el transporte activo de la forma disociada por transportadores. Han sido reportados dos transportadores: la isoforma 1 del transportador de monocarboxilato (MCT1) y el co-transportador de monocarboxilato acoplado a sodio (SMCT1) (Gupta *et al.*, 2006). De aquí que el butirato estimula la absorción de sodio y agua y puede ser considerado como agente antidiarréico.

5. JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos de detección y transporte al interior de la célula de los AGCC han sido estudiados recientemente, llamando la atención por su significancia nutricional y clínica al estar relacionados con el mantenimiento de la salud y buen funcionamiento intestinal, así como en el tratamiento y prevención de enfermedades crónico degenerativas tales como la diabetes, obesidad, y cáncer colorectal. En el presente trabajo de investigación, se pretende determinar si el consumo de fibra dietética tiene influencia directa sobre la expresión relativa de los receptores específicos para butirato con el fin de confirmar si los colonocitos tienen la capacidad de regular la expresión de los receptores GPR41 y GPR43 por modificación de la dieta.

6. HIPÓTESIS

La expresión relativa de los receptores de butirato GPR41 y GPR43 en colonocitos de rata será promovida por las diferentes concentraciones de fibra dietética de nopal consumidas.

7. OBJETIVOS

7.1 GENERAL

Evaluar la expresión cuantitativa de los genes de receptores a butirato en células del intestino grueso, después de que ratas de laboratorio sean alimentadas con dietas conteniendo diferentes concentraciones de fibra fermentable.

7.2 ESPECÍFICOS

1. Seleccionar y caracterizar la fibra dietética de nopal que será utilizada.
2. Realizar el ensayo biológico con ratas alimentadas con cuatro dietas que contengan diferentes concentraciones de FD (0, 5, 15 y 25 %) proveniente de nopal.
3. Determinar la expresión cuantitativa de los receptores de butirato en colonocitos por RT-PCR cuantitativo.

8. METODOLOGÍA

8.1 CARACTERIZACIÓN DE LA FUENTE DE FIBRA DIETÉTICA

Se propuso utilizar polvo de nopal secado al sol como fuente de fibra en las dietas, por considerarse un alimento con la proporción adecuada de fibra soluble.

El nopal se deshidrató por el método convencional de secado solar (Figura 7), utilizando para este fin una cámara diseñada especialmente para la deshidratación de alimentos, la cual consta de una estructura de cartón comprimido cuyas paredes en su interior están revestidas de aluminio negro, para absorber el calor del sol, y cuenta con dos niveles en su interior en los cuales se seca el alimento colocándolo en rejillas tipo malla. La cubierta es de policarbonato transparente, el cual permite el paso de los rayos del sol y al mismo tiempo mantiene el calor en el interior, la caja cuenta también con respiraderos para dejar circular el aire y que el proceso de secado se optimice de esta manera. El nopal se rebanó finamente para obtener un secado más homogéneo y se expuso al sol por un período de aproximadamente 10 h, tiempo después del cual se obtiene el producto deshidratado con un porcentaje de humedad ≈ 6.8 .



Figura 7. Proceso de secado solar de nopal

8.2 DISTRIBUCIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para el experimento se utilizaron ratas Wistar de 8 semanas de nacidas y un peso aproximado de $196g \pm 56$. Los grupos de ratas fueron asignados al azar para cada una de las dietas experimentales, seleccionándose al final del experimento 6 individuos por grupo. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de 12 h de luz artificial durante el día y 12 h de oscuridad por la noche, ambiente aislado de ruidos y alimento y agua suministrados *ad libitum*.

8.3 FORMULACIÓN DE LAS DIETAS

Con base en el contenido de FD de la muestra, se elaboraron las dietas experimentales conteniendo nopal como fuente de fibra, además de una dieta control: 1. Dieta sin fibra de nopal (Dieta 0, control); 2. Dieta con 5% de fibra dietética (Dieta A) 3. Dieta con 15% de fibra dietética (Dieta B); 4. Dieta con 25% de fibra dietética (Dieta C). Las dietas se elaboraron siguiendo las recomendaciones de la fórmula para roedores experimentales del American Institute of Nutrition, AIN-93 (Reeves *et al.*, 1993) (Cuadro 3), en relación al contenido de proteínas, grasas, vitaminas y minerales. Para cubrir el aporte de 5% de FD para la dieta A, 15% para la dieta B y 25% para la dieta C, a cada dieta se le adicionó 428g, 1,285.7g y 2,142.85g de polvo de nopal, respectivamente, y se ajustaron los demás componentes según el análisis bromatológico del polvo de nopal. Las Dietas se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Fórmula de la dieta para roedores experimentales AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993) y ajuste de las dietas A, B y C.

DIETA AIN-93M		DIETA A	DIETA B	DIETA C
INGREDIENTE	g/Kg de dieta	g/4.2kg de Fórmula		
Almidón de maíz	465.692	1,866.326	1,232.5719	512.7
Caseína	140	552.7756	482.186	411.6435
Almidón dextrinizado	155	651	651	651
Sacarosa	100	420	420	420
Aceite de soya	40	164.1052	153.3	148.5
Celulosa	50	-----	-----	-----
Mezcla de minerales	35	86.6	-----	-----
Mezcla de vitaminas	10	42	42	42
L-cistina	1.8	7.56	7.56	7.56
Bitartrato de colina	2.5	10.5	10.5	10.5
TBHQ (mg)	8			

8.4 DISECCIÓN DE INTESTINO GRUESO

Se sacrificaron los animales después de 16 días de tratamiento dietético con una administración de pentobarbital sódico a una concentración de 0.065mg/ml y una dosis de 0.06mg/g de peso, se disecó una parte del saco colónico, los tejidos se homogeneizaron en 800 µl de trizol y se almacenaron las muestras a -20°C hasta su uso.

8.5 EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción de RNA de intestino se realizó utilizando el reactivo Trizol (Ácido Guanidínico Tiocianato-fenol-cloroformo de Gibco-BRL) de INVITROGEN siguiendo el método de Chomczynski & Sacchi (1987). La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente a 260 nm.

8.6 RT-PCR

A partir de RNAm obtenido de las muestras de colon de los animales de experimentación, se obtuvo el cDNA correspondiente al receptor GPR43, para su posterior tratamiento y amplificación específica. Los ensayos de RT-PCR se realizaron a 50 °C Para llevar a cabo la retrotranscripción por 10 min, 95 °C para activar la polimerasa por 5 min, seguido por 40 ciclos que comenzaron a 90 °C para la desnaturalización por 50 seg, 61.5 °C para la alineación por 1 min y 71 °C para la extensión por 1 min. Finalizados los ciclos se dejó una última etapa de extensión a 72 °C por 8.5 min y al terminar las muestras permanecieron a 4 °C.

Esta amplificación se usó como control, para verificar la expresión tejido específico del RNAm GPR43.

8.7 RT-PCR EN TIEMPO REAL

Posteriormente, se realizó la reacción de RT-PCR cuantitativa, para medir la expresión de los receptores en relación al gen de referencia. El gen constitutivo que se usó como control positivo fue β - actina. Los oligonucleótidos sugeridos para GPR43, GPR41 y β – actina se muestran en el Cuadro 3, con productos de amplificación de 66pb, 109 y 199pb, respectivamente. El equipo utilizado fue LightCycler® 480 Real Time PCR System de Roche.

Cuadro 3. Número de ascensión, secuencia de oligonucleótidos y tamaño de producto de amplificación de los genes GPR43, GPR41 y β -actina.

Secuencia		Oligonucleótido	Tamaño del producto
GPR43 (NM_001005877.1)	Sentido	5'-ACC ATC GTC ATC ATC GTT-3'	66pb
	Antisentido	5'-CAC CGA GAA CCA AAT CAC -3'	
GPR41 (NM_001108912.1)	Sentido	5'- CTC CTC CCC GTG CGA CTG GA -3'	160pb
	Antisentido	5'- GGC TGG CTC CCT GGC TCA GA -3'	
B-Actina (NM_031144.2)	Sentido	5'-AGC GCT TCC GGT GTC CA-3'	199pb
	Antisentido	5'-GGC TGT GAT CTC CTT CT-3'	

La Figura 8 muestra la secuencia del mensajero de los genes GPR43 y GPR41, de la cual se diseñaron los oligonucleótidos específicos para iniciar la replicación en la reacción de RT- PCR.



Figura 8. Secuencia de RNA mensajero de los genes GPR43 A) y GPR41 B)

Oligonucleótidos resaltados en amarillo y producto de amplificación enmarcado en rojo.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 RESULTADOS

9.1.1 Análisis de la fuente de FD

Se realizaron ensayos analíticos para determinar las propiedades de composición química y fisicoquímicas del nopal comparando dos técnicas de secado (cámara solar y estufa) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Cuadro comparativo de las determinaciones realizadas al nopal sometido a dos procesos de secado

DETERMINACIÓN	Nopal secado solar	Nopal secado en estufa
Retención de agua %	13.19	7.82
Retención de aceite %	2.96	2.57
Contenido graso %	.91	.87
Cenizas %	14.07	14.76
Humedad %	6.83	7.38
Proteína cruda %	8.23	7.85
Fibra (FS/FI) %*	41.6%/58.4%	37.5%/62.5
Carbohidratos %	20.96	20.14

*El contenido de fibra dietética total en el nopal (fibra soluble + insoluble) es de 49%

Como los resultados lo demuestran, el nopal secado al sol conservó mejor sus propiedades, por lo que se eligió este método para deshidratar la fuente de fibra.

En este trabajo se muestra la composición del nopal en cuanto a FD en sus fracciones soluble e insoluble además de su contenido de grasa, proteínas, carbohidratos y cenizas. Tomando en cuenta estos valores, se incluyó este alimento a la dieta de roedores experimentales como suplemento de FD.

9.1.2 Biología Molecular

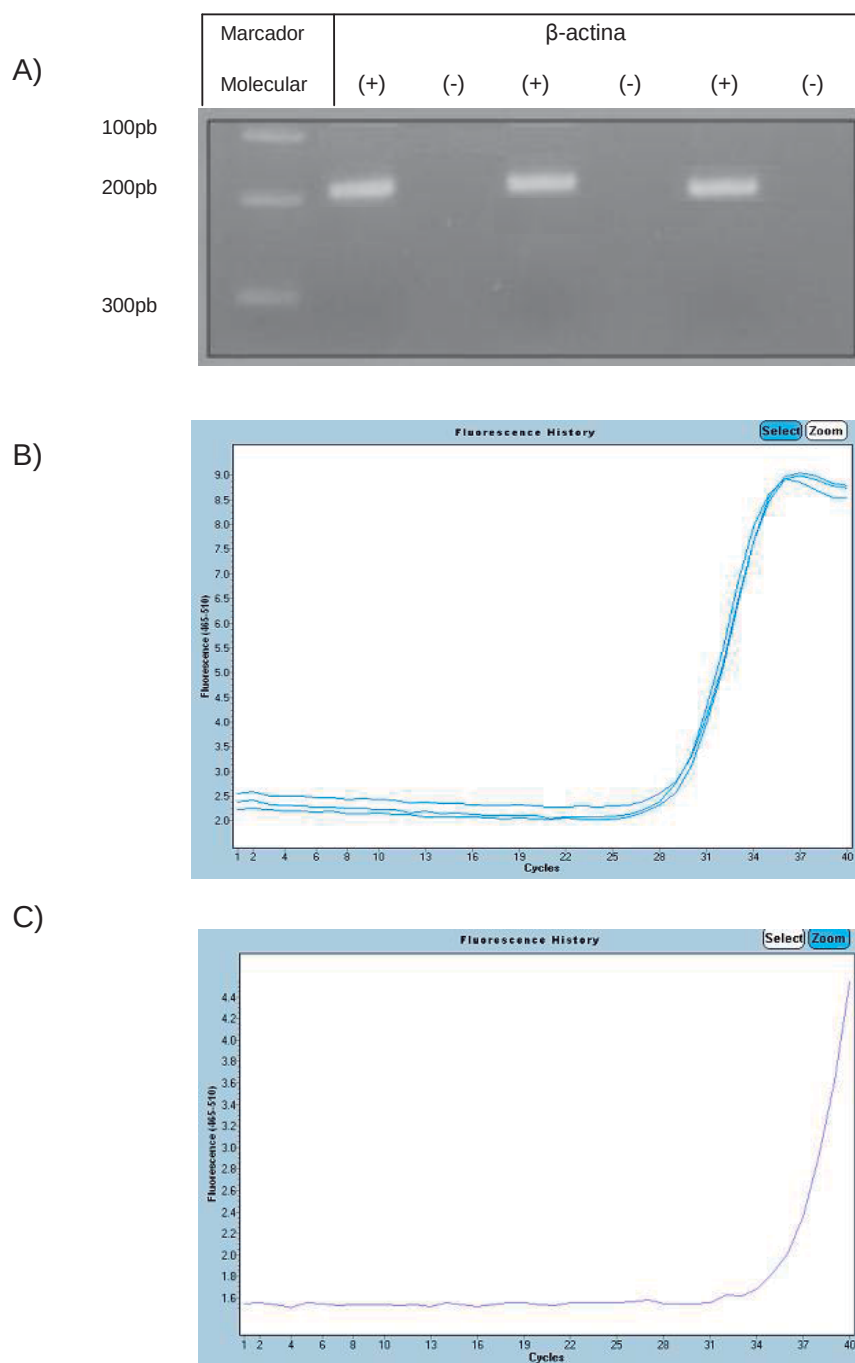


Figura 9. Expresión de β -actina A) Gel de agarosa que muestra los productos de amplificación de β -actina RT-PCR de 199pb. B) Curva de fusión del producto de amplificación de β -actina RT-PCR tiempo real. C) Control negativo de β -actina RT-PCR tiempo real

9.1.3 Validación de los controles endógenos

En la figura 9 se puede apreciar la identificación del gen de β -actina en el tejido colónico de los animales de experimentación por medio de una RT-PCR convencional encontrando bandas única y definidas en el gel de agarosa que resultó de la electroforesis del producto de amplificación (A), mientras que en B) y C) se observan las gráficas de la reacción de RT-PCR en tiempo real en una de las muestras con tres repeticiones y su correspondiente control negativo.

La expresión del gen de β -actina como control endógeno es definitiva para validar el experimento pues no sólo debe asegurarse la expresión del mismo en el tejido a estudiar sino que no deben existir cambios significativos en sus niveles de expresión a través de los diferentes tratamientos dietéticos (Figura 10).

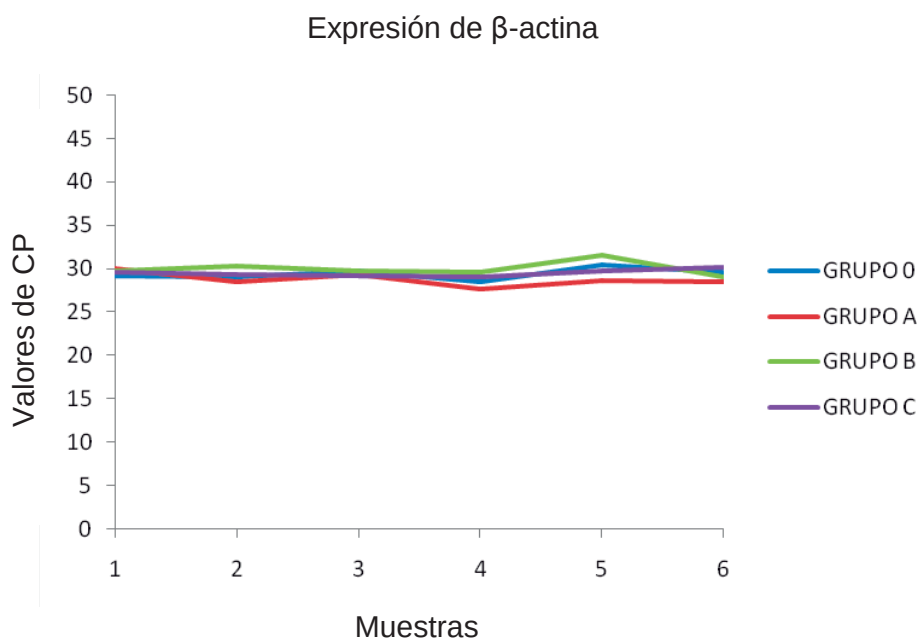


Figura 10. Valores de CP de β -actina de las diferentes muestras en la reacción de RT-PCR en tiempo real

9.1.4 GPR43

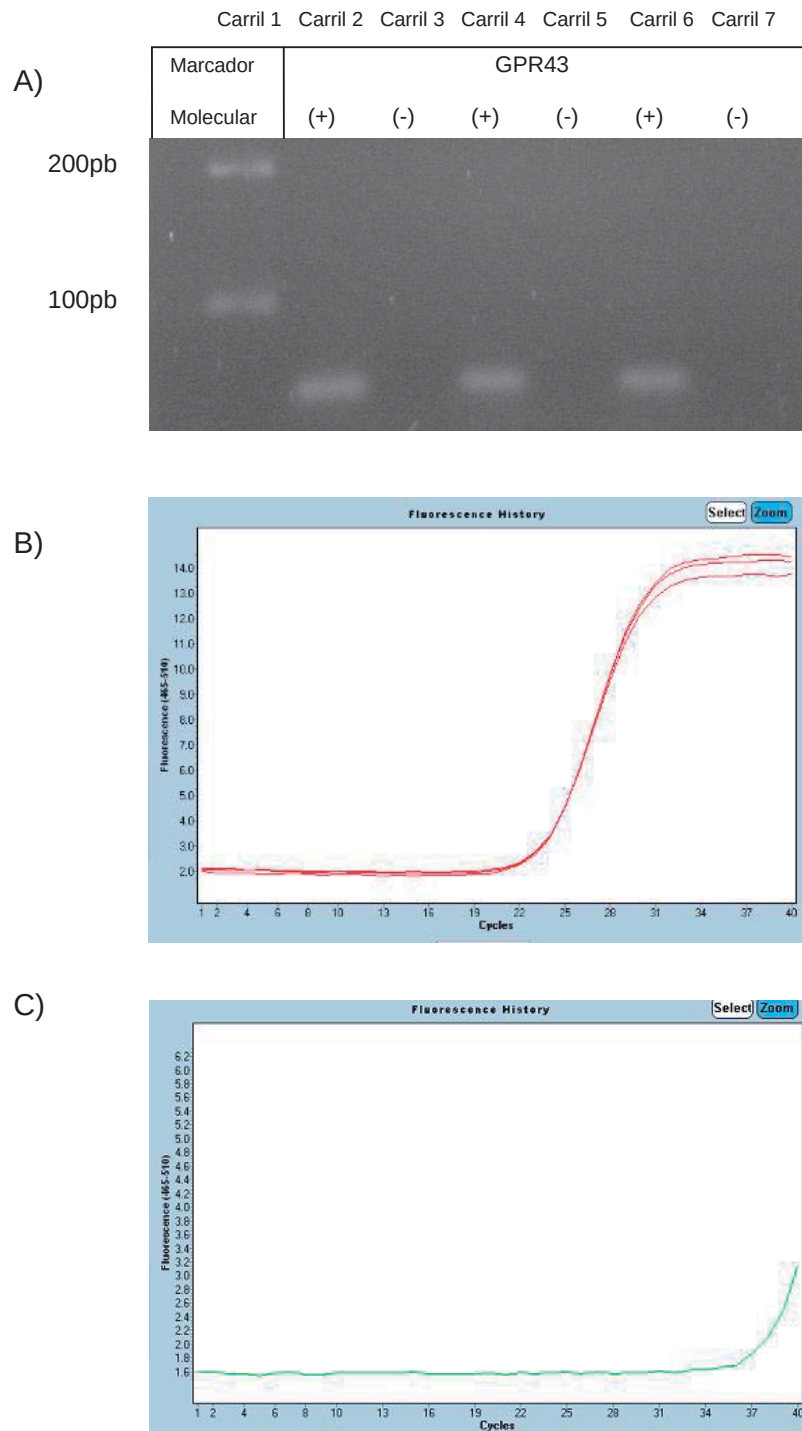


Figura 11. Expresión de GPR43 **A)** Gel de agarosa que muestra los productos de amplificación de GPR43 RT-PCR de 66pb. **B)** Curva de fusión del producto de amplificación de GPR43 RT-PCR tiempo real. **C)** Control negativo de GPR43 RT-PCR tiempo real.

Los resultados de la RT-PCR convencional que se realizó para la identificación del gen GPR43 se muestran en la Figura 11 en donde se aprecia el producto de amplificación del material genético extraído de los animales de experimentación sometidos a los diferentes tratamientos dietéticos (carriles 2, 4 y 6) con su respectivo control negativo (carriles 3, 5 y 7). En el gel de agarosa se observa una banda única y específica que representa un producto de 66 pares de bases (pb), equivalente al lugar en que se sitúa al lado del marcador molecular que se coloca en el carril 1.

Esta reacción sirvió como control de la expresión del gen en el tejido colónico de los animales para sentar las condiciones específicas de reacción y posteriormente realizar la RT-PCR en tiempo real, así como para verificar la confiabilidad de los controles y cada uno de los reactivos.

Las gráficas que arrojó el equipo de RT- PCR en tiempo real muestran las curvas de fusión en donde se observa la fluorescencia que aumenta en proporción a la amplificación de la secuencia del gen GPR43 a lo largo de los 40 ciclos de repetición que se programaron para la reacción. En B) se puede observar la gráfica correspondiente a una muestra de material genético con tres repeticiones las cuales muestran el mismo comportamiento validando así la técnica de la reacción. Por otro lado, en C) se observa la gráfica que corresponde al control negativo en la cual no se aprecia amplificación antes del ciclo 35 por lo que se considera un resultado negativo adecuado.

9.1.5 GPR41

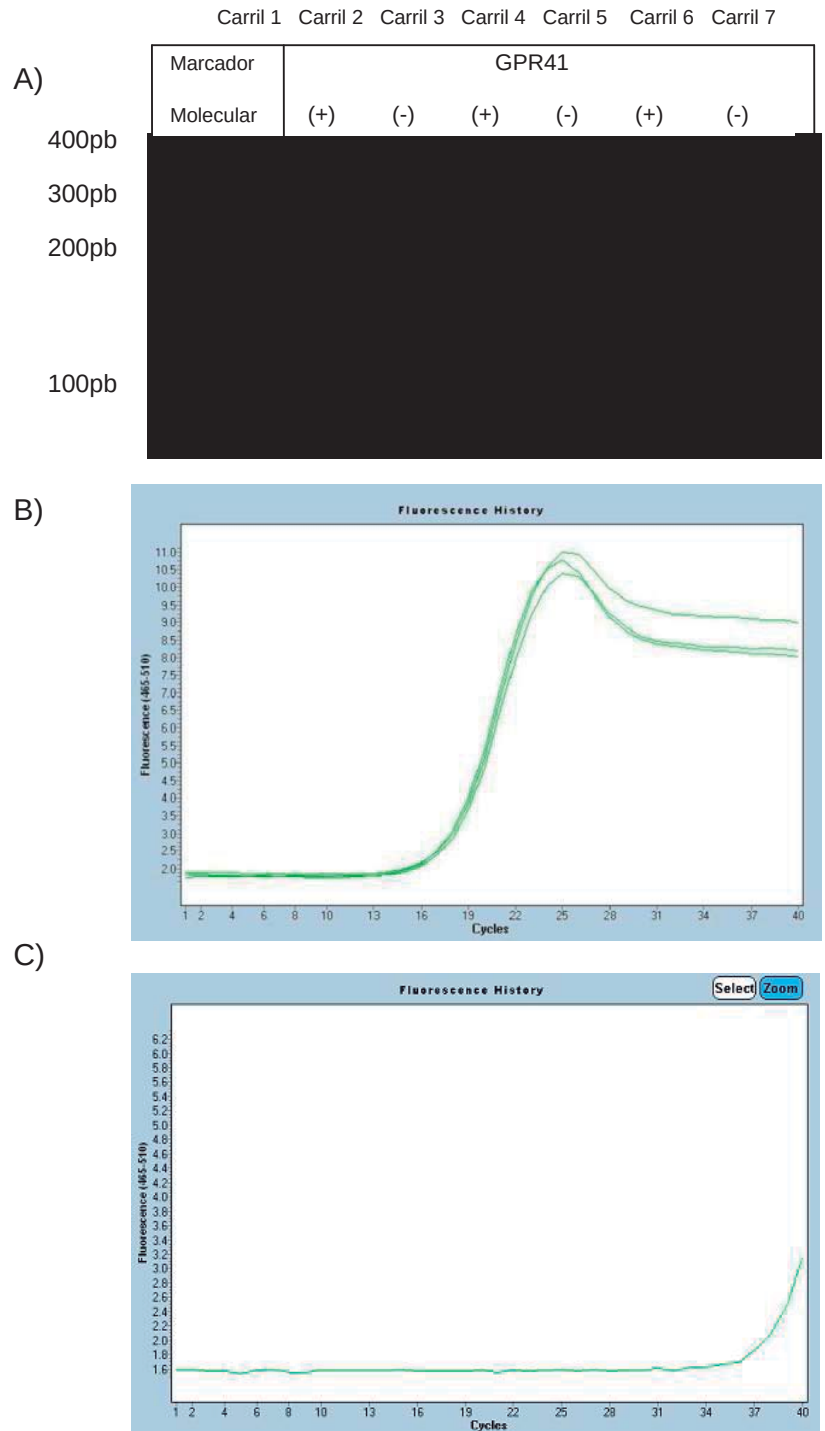


Figura 12. Expresión de GPR41 **A)** Gel de agarosa que muestra los productos de amplificación de GPR41 RT-PCR de 109pb. **B)** Curva de fusión del producto de amplificación de GPR41 RT-PCR tiempo real. **C)** Control negativo de GPR41 RT-PCR tiempo real

Los resultados de la RT-PCR convencional que se realizó para la identificación del gen GPR41 se muestran en la Figura 12 en donde se aprecia el producto de amplificación del material genético extraído de los animales de experimentación sometidos a los diferentes tratamientos dietéticos (carriles 2, 4 y 6) con su respectivo control negativo (carriles 3, 5 y 7). En el gel de agarosa se observa una banda única y específica que representa un producto de 160 pares de bases (pb), equivalente al lugar en que se sitúa al lado del marcador molecular que se coloca en el carril 1.

Esta reacción sirvió como control de la expresión del gen en el tejido colónico de los animales para sentar las condiciones específicas de reacción y posteriormente realizar la RT-PCR en tiempo real, así como para verificar la confiabilidad de los controles y cada uno de los reactivos.

Las gráficas que arrojó el equipo de RT- PCR en tiempo real muestran las curvas de fusión en donde se observa la fluorescencia que aumenta en proporción a la amplificación de la secuencia del gen GPR41 a lo largo de los 40 ciclos de repetición que se programaron para la reacción. En B) se puede observar la gráfica correspondiente a una muestra de material genético con tres repeticiones las cuales muestran el mismo comportamiento validando así la técnica de la reacción. Por otro lado, en C) se observa la gráfica que corresponde al control negativo en la cual no se aprecia amplificación antes del ciclo 35 por lo que se considera un resultado negativo adecuado.

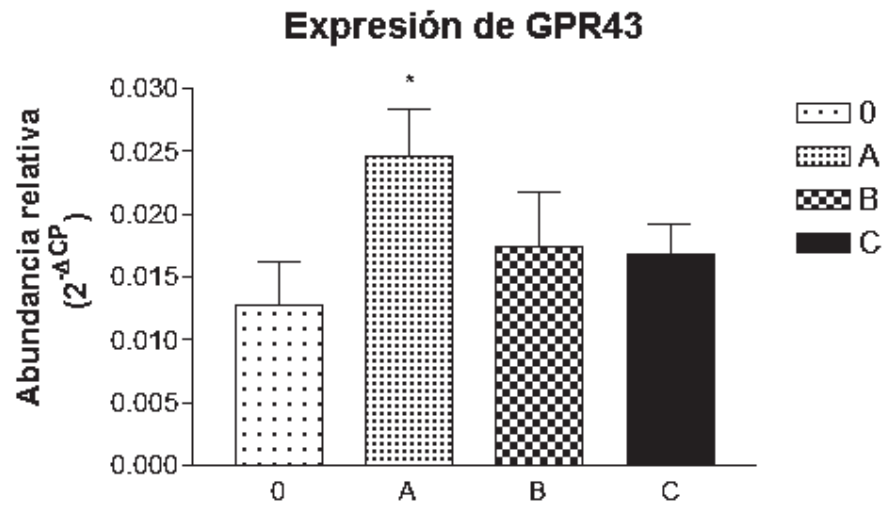


Figura 13. Niveles de expresión de GPR43 en relación a β -actina de las 4 dietas.

0 = 0% de FD de nopal (control), A = 5% de FD de nopal, B = 15% de FD de nopal y C= 25% de FD de nopal.

**Estadísticamente diferente con $n=6$ y $P < 0.05$.*

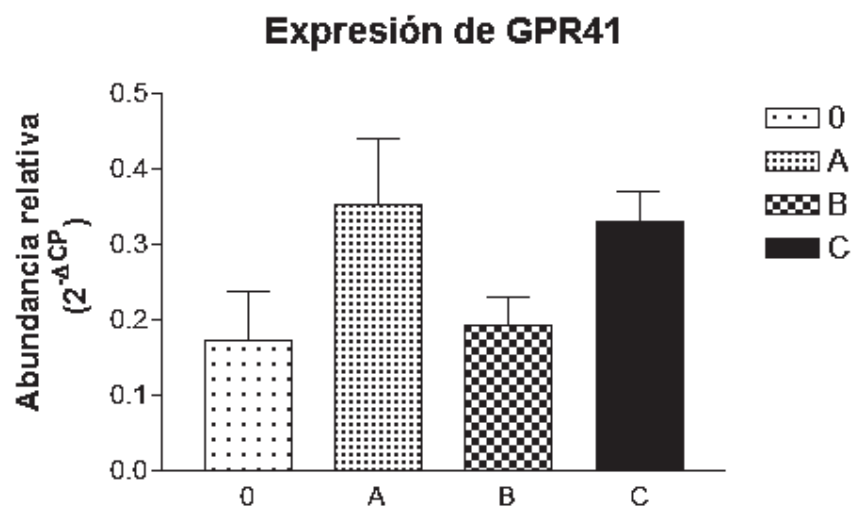


Figura 14. Niveles de expresión de GPR41 en relación a β -actina de las 4 dietas.

0 = 0% de FD de nopal (control), A = 5% de FD de nopal, B = 15% de FD de nopal y C= 25% de FD de nopal.

n=4 y $P < 0.05$.

Los resultados muestran que tanto el gen del receptor GPR43 como el de GPR41 aumentan considerablemente su expresión cuando se administra a los animales una dieta formulada con un 5% de FD. El aumento del gen GPR43 fue de 93.1% con respecto a la dieta control mientras que el gen de GPR41 tuvo una tendencia a aumentar un 102.1%.

En los animales del grupo B, con un suplemento de FD del 15%, el aumento de expresión del gen GPR43 fue de 36.6% mientras que para el gen de GPR41 la tendencia a aumentar la expresión fue de 10.9% en relación a la dieta control.

En los animales alimentados con una dieta del 25% de FD el aumento en la expresión del receptor GPR43 fue de 32.2% mientras que el gen GPR41 tuvo tendencia a aumentar un 91.7% con respecto a los animales alimentados con la dieta control.

Esto quiere decir que con una dieta que incluye 5% de FD la expresión de los receptores de AGCC GPR41 y GPR43 se vio aumentada casi al doble con respecto a una dieta sin FD. Los niveles de expresión con las otras dos dietas B y C, sin embargo, no se comportan de la misma manera en ambos receptores.

9.2 DISCUSIÓN

Se ha demostrado la presencia de GPR43 en diferentes tejidos, particularmente en depósitos de grasa, células inflamatorias y en el tracto gastrointestinal. Covington *et al.* (2006) detectaron niveles de expresión elevados en cuatro depósitos de grasa específicos: perirrenal, subcutáneo, mesentérico y parametrio; Karaki *et al.*, (2008) reportó expresión en muestras de pared entera de colon ascendente, y localización en células enteroendócrinas L que contienen péptido YY (péptido tirosina-tirosina) y en mastocitos que contienen 5-HT (serotonina). Lo cual sugiere que el receptor posee la capacidad de controlar el apetito por la liberación del péptido YY, enviando una señal de saciedad, y que puede controlar la motilidad gastrointestinal por los efectos de 5-HT/PYY.

GPR43 también exhibe patrones de expresión robustos en otro tipo de células inmunológicas incluyendo células polimorfonucleares, monocitos, eosinófilos y linfocitos B (Covington *et al.*, 2006). Sin embargo, no existen reportes previos de que la expresión pueda ser inducible.

Se reporta expresión de GPR41 en hueso, órganos viscerales, cerebro y células mononucleares de sangre periférica, además de su presencia en tejido adiposo (Covington *et al.*, 2006).

En este estudio se evidenció el aumento de expresión del receptor GPR43 y GPR41 al administrarse una dieta conteniendo 5% de FD proveniente de nopal comparada con una dieta ausente de FD demostrándose la importancia del consumo de fibra de una manera equilibrada. Cabe señalar que la concentración de 5% de celulosa en la dieta de roedores sugerido como ideal por Reeves *et al.* (1993), no es fermentable en la misma medida que la FD proveniente del nopal y por lo tanto produce menor cantidad de AGCC.

Los motivos por los cuales la abundancia relativa de la expresión del receptor GPR43 disminuyen cuando las ratas fueron alimentadas con dietas conteniendo 15 y 25% de FD en relación a la dieta con 5% de FD se pueden deber a los diferentes factores que involucra el metabolismo del intestino grueso

en presencia de una alta cantidad de fibra, recordando que los efectos de ésta cuando es administrada en concentraciones mayores a las recomendadas pueden desencadenar mala absorción de nutrientes, constipación, diarrea osmótica y un desequilibrio en la microflora colónica. En un estudio realizado por Boffa *et al.* (1992) se documentó que la concentración de butirato disminuye al administrarse una dieta con 20% de FD con respecto a una dieta con 5% de FD administrada a ratas.

Los efectos en el aumento de expresión del GPR43 y GPR41 cuando se administra una dieta con 5% de FD se pueden atribuir a la presencia de butirato al ser producido por la fermentación bacteriana de los carbohidratos indigeribles, debido a que el butirato es un modulador de la estructura primaria de la cromatina dada su habilidad de inhibir la desacetilación de histonas y, consecuentemente, su capacidad en la regulación de la expresión génica. Boffa *et al.* (1992) documentaron que en células epiteliales de diferentes grupos de ratas alimentadas a diferentes concentraciones de FD, los niveles de acetilación de histonas y de proliferación celular parecen ser modulados por la concentración de ácido butírico, que está en equilibrio con su concentración fecal, encontrando una correlación positiva entre el nivel de acetilación de histonas y la concentración de ácido butírico y una relación negativa entre la concentración de ácido butírico y la proliferación celular. Este grupo de investigadores afirma que las dietas que contienen cantidades moderadas de FD (5%) pueden tener efectos protectores en cuanto a proliferación celular, diferenciación y carcinogénesis, mientras que dietas libres de fibra o suplementadas con mucha fibra (10-20%) podrían tener potencial de promover carcinogénesis de colon (Boffa *et al.*, 1992), esto tomando en cuenta que las cantidades de butirato producidas con una dieta suplementada con 20% de FD disminuyeron en comparación con las producidas en las dietas con 5 y 10% de FD, además atribuyen este efecto a que disminuye el tiempo de tránsito intestinal a lo largo del intestino cuando las concentraciones de FD son mayores y por ende se acorta la exposición de la materia fecal a la flora colónica y de los productos de fermentación a las células epiteliales.

Por otro lado, Gaudier y col. (2004) demostraron la capacidad de butirato de regular la expresión de genes de mucosa en cultivos celulares de colon de la línea celular HT29-C1.16E, en dos tipos de medios: rico en glucosa y libre de glucosa en el cual la principal fuente de energía fue butirato. En el medio rico en glucosa, butirato incrementó la expresión del gen *MUC3* y *MUC5B*, inhibió la expresión del gen *MUC5AC* y no tuvo efectos sobre la expresión del gen *MUC2*; mientras que en el medio libre de glucosa, en el que butirato permaneció como la única fuente de energía disponible, todos los genes de mucosa se vieron incrementados en su expresión (Gaudier *et al.*, 2004). Esto tiene trascendencia a nivel de protección por parte de la capa de mucosa en el intestino grueso. Zhou (2006) documentó el aumento de expresión de los genes que codifican para PYY y GLP-1 por medio de RT-PCR en tiempo real en dos métodos: *in vivo* con ratas alimentadas con una dieta de almidón resistente e *in vitro* con cultivos primarios de células epiteliales de ciego y colon de ratas después de ser incubados con butirato. En ambos estudios se observó aumento en la expresión de los genes atribuible a butirato. De este modo se confirma la capacidad de regulación de genes a nivel transcripcional de este metabolito.

Cabe señalar que los efectos observados en este estudio se aplican en relación a la FD proveniente de nopal, resaltando la relevancia de este producto y el potencial que como país se tiene de aprovechar este recurso natural que actualmente ha sido poco estudiado (Chávez Moreno *et al.*, 2009).

10.CONCLUSIÓN

Esta es la primera evidencia registrada del efecto que tiene la concentración de FD en la dieta sobre la expresión del RNAm de los receptores de AGCC, GPR43 y GPR41 en células epiteliales de colon. Esto demuestra que el gen de los receptores puede ser inducible en cuanto a su expresión por factores dietéticos, especialmente si se aumenta la concentración de butirato producido por la fermentación bacteriana de la FD. Como los resultados demuestran, la FD proveniente de nopal promueve la expresión del receptor de butirato GPR43 en colon de ratas alimentadas con una dieta que contiene FD a una concentración de 5%. No así en concentraciones mayores (15% y 25%) en cuyos tratamientos no se observan diferencias significativas en la expresión del receptor GPR43 en comparación con la dieta control. El receptor GPR41, por su parte, mostró una tendencia al aumento de expresión cuando se administra una dieta con un contenido de fibra de 5% y 25%, mientras que la expresión en la dieta con 15% de FD no superó los niveles de expresión basal de la dieta control más de un 10.9%. Estos resultados contribuyen a explicar el mecanismo por el cual se han registrado mejores condiciones colónicas cuando se consumen cantidades adecuadas de FD.

11.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamse, S. L., Pool-Zobel, B. L., Rechkemmer, G. 1999. **Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells.** *Carcinogenesis* 20:4; 629–634.
- Andoh, A., Fujiyama, Y., Hata, K., Takaya, H., Shimada, M., Bamba T. 1999. **Counter-regulatory effect of sodium butyrate on tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced complement C3 and factor B biosynthesis in human intestinal epithelial cells.** *Clinical and Experimental Immunology* 118:1; 23-9.
- Anon. 2001 **The definition of dietary fibre.** Report of the Dietary Fiber Definition Committee of the American Association of Cereal Chemists. *Cereal Food World* 46; 112–129.
- Bauer-Marinovic, M., Florian, S., Müller-Schmehl, K., Glatt, H., Jacobasch, G. 2006. **Dietary resistant starch type 3 prevents tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine and alters proliferation, apoptosis and dedifferentiation in rat colon.** *Carcinogenesis* 27:9; 1849–1859.
- Boffa, L. C., Lupton, J. R., Mariani, M. R., Ceppi, M., Newmark, H. L., Scalmati, A., Lipkin, M. 1992. **Modulation of Colonic Epithelial Cell Proliferation, Histone Acetylation, and Luminal Short Chain Fatty**

Acids by Variation of Dietary Fiber (Wheat Bran) in Rats. *Cancer Research* 52; 5906-5912.

- Brown, A. J., Goldsworthy, S. M., Barnes, A. A., Eilert, M. M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A., Wigglesworth, M. J., Kinghorn, I., Fraser, N. J., Pike, N. B., Strum J. C., Steplewski, K. M., Murdock, P. R., Holder, J. C., Marshall, F. H., Szekeres, P. G., Wilson, S., Ignar, D. M., Foord, S. M., Wise, A., Dowell, S. J. 2003. **The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids.** *The Journal of Biological Chemistry* 278:13; 11312-11319.
- Brown, A. J., Jupe, S., y Briscoe, C. P. 2005. **A Family of Fatty Acid Binding Receptors.** *DNA and Cell Biology* 24:1, 54-61.
- Chávez-Moreno, C. K., Tecante, A., Casas, A. 2009. **The *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Mexico: a historical perspective of use, interaction and distribution.** *Biodiversity and Conservation*. Published online.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Analytical Biochemistry* 1987: 162;156-159.

- Comalada M., Bailón E., de Haro O., Lara-Villoslada F., Xaus J., Zarzuelo A., Gálvez J. 2006. **The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype.** *J Cancer Res Clin Oncol* 132; 487–497.
- Covington, D. K., Briscoe, C. A., Brown, A. J., and Jayawickreme, C. K. 2006. **The G-protein-coupled receptor 40 family (GPR40–GPR43) and its role in nutrient sensing.** *Biochemical Society Transactions* 34:5; 770-773.
- Cummings, J. H., and McFarlane, G. T. 1991. **The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon.** *Journal of Applied Bacteriology* 70; 443-459.
- Cummings, J. H., Rombeau, J. L., Sakata, T. 1995. **Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids.** *Cambridge University press.* pp. 462-467
- Delmee, E., Cani, P. D., Gual, G., *et al.*, 2006. **Relation between proglucagon expression and metabolic response to oligofructose in high fat-fed mice.** *Life Science* 79;1007-1013
- Delzenne, N. M., Cani, P. D., Daubioul, C., *et al.*, 2005. **Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides.** *British Journal of Nutrition* 93:1;157-161

- Fu, H., Shi, YQ., and Mo, S. J. 2004. **Effect of short-chain fatty acids on the proliferation and differentiation of the human colonic adenocarcinoma cell line Caco-2.** *Chinese Journal of Digestive Diseases* 5; 115–117.
- Gaudier, E., Jarry, A., Blottière, H. M., de Coppet, P., Buisine, M. P., Aubert, J. P., Laboisie, C., Cherbut, C. and Hoebler C. 2004. **Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose.** *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology* 287:1168-1174.
- Gupta, N., Martin, P. M., Prasad, P. D., Ganapathy, V., 2006. **SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter.** *Life Science* 78:21; 2419-25.
- Hinnebusch, B. F., Shufen, M., J., Tang., Wu, S. Y. Archer, S., and Hodin, R. A. 2002. **The Effects of Short-Chain Fatty Acids on Human Colon Cancer Cell Phenotype Are Associated with Histone Hyperacetylation.** *Journal of Nutrition* 132; 1012–1017.
- Hodin, R. A., Meng, S., Archer S., Tang R. 1996. **Cellular growth state differentially regulates enterocyte gene expression in butyrate-treated HT-29 cells.** *Cell Growth & Differentiation* 7; 647-653.

- Jacobasch, G., Schmiedl, D., Kruschewski, M., Schmehl, K. 1999. **Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel diseases.** *International Journal of Colorectal Disease* 14; 201–21.
- Karaki, S. I., Mitsui, R., Hayashi, H., Kato, I., Sugiya, H., Iwanaga, T., Furness, J. and Kuwahara, A. 2006. **Short chain fatty acid receptors, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine.** *Cell and Tissue Research.* 324; 353–360
- Karaki, S. I., Tazoe, H., Hayashi, H., Kashiwabara, H., Tooyama, K., Suzuki, Y., Kuwahara, A. 2008. **Expression of the short-chain fatty acid receptor, GPR43, in the human colon.** *J. Mol. His.* 39:135-142
- Le Poul, E., Loison, C., Stuyf, S., Springel, JY., Lannoy, V., Decobecq, ME., Brezillon, S., Dupriez, V., Vassart, G., Damme, JV., Parmentier, M., y Detheux, M. 2003. **Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role on polymorphonuclear cell activation.** *The Journal of Biological Chemistry* 278:28; 25481–25489.
- Mortensen, F. V., Nielsen, H., Aalkjaer, C., Mulvany, M. J., Hessov, I. 1995. ***In vivo* and *in vitro* effects of short-chain fatty acids on Intestinal blood circulation.** *Pharmacol Toxicol.* 75(3-4);181-185.

- Ono, S., Karaki, S. I., Kuwahara, A. 2004. **Short-chain fatty acids decrease the frequency of spontaneous contractions of longitudinal muscle via enteric nerves in rat distal colon.** *The Japanese Journal of Physiology* 54; 483-493.
- Peng, I., He, Z., Chen, W., Holzman, I. R., Lin, J. 2007. **Effects of butyrate on intestinal barrier function in a caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier.** *Pediatric Research* 61:1; 37-41.
- Reeves, G. P., Nielsen, H. F., Fahey, C. G. 1993. **Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet.** *Journal of Nutrition* (123): 1939-1951
- Roediger W. E. W. 1980. **Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man.** *Gut* 5; 115–117.
- Rosignoli, P., Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Spinozzi, F., Agea, E., Pelli, M. A., Morozzi, G. 2001. **Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumor cells.** *Carcinogenesis* 22:10; 1675–1680.
- Sawzdargo, M., George, S. R., Nguyen, T., Xu S. J., Kolakowski, L. F., and Odowd, B. F. 1997. **A cluster of four novel human g protein-coupled**

receptor genes occurring in close proximity to cd22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293:2; 543–547.

- Scheneeman, B. O. 1987. **Soluble vs. insoluble fiber. Different physiological responses.** *Food Technology* 81-82.
- Stark, A., Madar, Z. 1993. **In vitro production of short-chain fatty acids by bacterial fermentation of dietary fiber compared with effects of those fibers on hepatic sterol synthesis in rats.** *Journal of Nutrition* 123:2166–2173.
- Tazoe, H., Otomo, Y., Kaji, I., Tanaka, R., Karakai, S.-I., Kuwahara, A. 2008. **Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions.** *Journal of Physiology and Pharmacology* 59:2; 251-262.
- Toden, S., Bird, A. R., Topping, D. L., Conlon, M. A. 2007 **Dose-dependent reduction of dietary protein-induced colonocyte DNA damage by resistant starch in rats correlates more highly with caecal butyrate than with other short chain fatty acids.** *Cancer Biology Therapy* 6:2;253-8.

- Topping, D. L. 1991. **Soluble fiber polysaccharides: effects on plasma cholesterol and colonic fermentation.** *Nutrition Reviews* 49:7;195-203
- Wollowski, I., Rechkemmer, G., Pool-Zobel, B. L. 2001. **Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer.** *American Journal of Clinical Nutrition* 73; 451–5.
- Yajima, T. 1988. **Luminal propionate-induced secretory response in the rat distal colon *in vitro*.** *The Journal of Physiology (Lond)* 403; 559-575.
- Zhou, J., Hegsted, M., McCutcheon, K. L., Keenan, M. J., Xi, X., Raggio, A. M., and Martin, R. J., 2006. **Peptide YY and proglucagon mRNA expression patterns and regulation in the gut.** *Obesity* 14:4; 683-689.