BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS

"ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DEL AGUAMIEL DE *Agave salmiana* EN CÉLULAS HCT15 DE CÁNCER DE COLON."

PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADA EN NUTRICIÓN CLÍNICA

PRESENTA

BLANCA CRISTINA VILLALOBOS FLORES

DIRECTOR

D.C. MAURA CÁRDENAS GARCÍA

CO-DIRECTOR

D.C. ENRIQUE TORRES RASGADO

PUEBLA, PUE. NOVIEMBRE 2020.

Agradecimientos

A mis directores de tesis Dra. Maura Cárdenas García y Dr. Enrique Torres Rasgado quienes con sus conocimientos y apoyo me guiaron a través de cada una de las etapas de este trabajo para alcanzar los resultados que buscaba.

A mis compañeros de laboratorio, Gonzalo, Aleph, Alejandra, Yesenia, Monserrat y Esteban por las risas, momentos, consejos y críticas constructivas durante mi estancia en el laboratorio.

A Sr. Luis y Sra. Mariela, por su hospitalidad y ayuda para la obtención de las muestras.

A mi mamá, Graciela, por soportar mis momentos de histeria, por su amor incondicional, su paciencia, su apoyo y sobre todo por ser mi mayor ejemplo de vida y superación.

A mi familia por apoyarme en todo momento. Mis tíos, Rafa, Nancy, Naty, Jorge, Inés y Mauro por ser un ejemplo de superación profesional. A mis primos, Ian, Ángel, Raúl, Yohanny, Mau, Jess, David e Iván por llenar mi vida de alegría, por sus ocurrencias y los buenos ratos compartidos.

A Juan Plans, mi compañero de vida y de laboratorio, por apoyarme aun cuando el ánimo decaía y siempre tener un abrazo reconfortante al final del día. Por tu paciencia y amor infinito. A la familia Plans Contreras por su apoyo y por traer al mundo a tan extraordinario ser.

A mis amigos y segunda familia, Amir, Harold, Ithan, Ragni, Jara, Óscar y Rubén por estar presentes en los momentos más importantes y difíciles de mi vida, por las charlas y la motivación que recibí de cada uno de ustedes antes y durante la realización de esta tesis.

De una manera especial, a mi tía María Luisa, por su motivación a superarme cada día, por su conocimiento compartido y por enseñarme que cada día debe vivirse al máximo, por su cariño y ternura entregados a mi durante toda mi vida universitaria.

INDICE

1. RESUMEN ... 8

2. INTRODUCCIÓN ... 9

3. ANTECEDENTES ... 10

3.1 ANTECEDENTES GENERALES ... 10

3.1.1 CÁNCER ... 10

3.1.2 CÁNCER DE CÓLON ... 14

3.1.3 MEDICINA TRADICIONAL Y CÁNCER ... 23

3.1.4 AGUAMIEL ... 24

3.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS ... 29

3.2.1 COMPOSICIÓN DEL AGUAMIEL, PROPIEDADES PROBIOTICAS Y SU USO CONTRA EL CÁNCER ... 29

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA ... 43

5. OBJETIVOS ... 45

5.1 OBJETIVO GENERAL ... 45

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES ... 45

6. MATERIAL Y MÉTODOS ... 45

6.1 DISEÑO DE ESTUDIO ... 45

6.2 UBICACIÓN ESPACIO – TEMPORAL ... 46

6.3 ESTRATEGIA DE TRABAJO ... 47

6.4 MUESTRA ... 48

6.4.1 DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN ... 48

6.4.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA ... 48

6.5 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICIÓN ... 49

6.6 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS ... 50

6.6.1 RECOLECCIÓN DE AGUAMIEL ... 50

6.6.2 VIABILIDAD CELULAR ... 53

6.6.3 CONTEO CELULAR ... 54

6.6.4 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA POR MÉTODO DE XTT ... 55

7. RESULTADOS ... 59

7.1 DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LÍNEA HCT15 EN CONTACTO CON AGUAMIEL POR MÉTODO COLORIMÉTRICO XTT ... 59

7.2 VIABILIDAD CELULAR DE LÍNEA HCT15 EN CONTACTO CON AGUAMIEL POR MÉTODO COLORIMÉTRICO XTT ... 61

7.3 DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LINFOCITOS HUMANOS EN CONTACTO CON AGUAMIEL POR MÉTODO COLORIMÉTRICO XTT 64

7.4 RELACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE HCT15/LINFOCITOS HUMANOS EN CONTACTO CON AGUAMIEL POR MÉTODO COLORIMÉTRICO XTT..... 65

7.5 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN EL AGUAMIEL DE *Agave salmiana* POR MÉTODO DE FOLIN – CIOCALTEAU 67

8. DISCUSIÓN..... 70

9. CONCLUSIONES..... 75

10. PERSPECTIVAS A FUTURO..... 75

11. BIBLIOGRAFÍA..... 76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cáncer de colon metastásico. 12
Figura 2. Anatomía del colon. 15
Figura 3. Estadificación del cáncer de colon. 17
Figura 4. Plantío de maguey Manso o de Montaña (Agave salmiana). 50
Figura 5. Maguey B. 12 años de edad. 51
Figura 6. Maguey A. 8 años de edad. 51
Figura 7. Desviramiento o capado de maguey. 52
Figura 8. Limpieza y extracción de residuos o gabazo del centro del maguey. 52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de minerales en aguamiel. 29
Tabla 2. Contenido de vitaminas en aguamiel. 30
Tabla 3. Contenido de aminoácidos esenciales en aguamiel. 31
Tabla 4. Viabilidad celular de HCT15 en contacto con aguamiel de Maguey A. 62
Tabla 5. Viabilidad celular de HCT15 en contacto con aguamiel de Maguey B. 63
Tabla 6. Contenido de compuestos fenólicos totales en aguamiel. 69

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Actividad antiproliferativa del aguamiel de Agave salmiana (A) en células HCT15 por método de XTT. 60
Gráfica 2. Actividad antiproliferativa del aguamiel de Agave salmiana (B) en células HCT15 por método de XTT. 60
Gráfica 3. Viabilidad celular de HCT15 en contacto con aguamiel de Maguey A por método de XTT. 62
Gráfica 4. Viabilidad celular de HCT15 en contacto con aguamiel de Maguey B por método de XTT. 63
Gráfica 5. Viabilidad de linfocitos humanos en contacto con aguamuel de Maguey A. 65
Gráfica 6. Viabilidad celular de linfocitos humanos en contacto con aguamiel de Maguey B. 65
Gráfica 7. Relación de la viabilidad celular de HCT15/Linfocitos humanos en contacto con aguamiel de Maguey A. 66
Gráfica 8. Relación de la viabilidad celular de HCT15/Linfocitos humanos en contacto con aguamiel de Maguey B. 67
Gráfica 9. Curva de calibración del ácido gálico para la determinación de compuestos fenólicos totales por método de Folin - Coicalteau. 68
Gráfica 10. Contenido de compuestos fenólicos totales en aguamiel. 69
Gráfica 11. Viabilidad celular de HCT15 vs Concentración de compuestos fenólicos totales del aguamiel de Maguey A 70
Gráfica 12.Viabilidad celular de HCT15 vs Concentración de compuestos fenólicos totales del aguamiel de Maguey B 70

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ASOCIACIONES MUNDIALES

AJCC: Comité conjunto Americano del Cáncer, por sus siglas en inglés American Joint Comitte on Cancer.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

GCO: Global Cancer Observatory o GLOCOCAN.

IARC: Asociación Internacional de Investigación en Cáncer.

INC: Instituto Nacional del Cáncer.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

SIAP: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.

SMeO: Sociedad Mexicana de Oncología.

UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer.

OTROS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

BAL: Bacterias productoras de ácido láctico.

CCR: Cáncer Colorrectal.

DASH: Sigla en inglés de Dietary Approaches to Stop Hypertension (Enfoques Dietéticos para Detener la Hipertensión).

DMH: Diclorhidrato de 1,2-dimetilhidrazina.

FODMAP: Hidratos de carbono de cadena corta y alcoholes relacionados que son mal absorbidos en el intestino delgado.

FOS: Oligómeros de fructosa.

HCT15: Células pertenecientes al tejido de colon de un organismo *Homo sapiens, humano,* con patología Dukes tipo C, adenocarcinoma colorrectal.

IBSS: Síndrome del Intestino Irritable, por sus siglas en inglés Irritable Bowel Syndrome Severity Score.

IDR: Ingesta Diaria Recomendada.

NFkB: Factor nuclear Kappa B.

pH: Potencial de hidrógeno.

PROCEDIMIENTOS

DPPH: 2,2- difenil- 1- picrilhidrazilo

XTT: Sal de sodio 2,3-bis(2- metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT)

UNIDADES DE MEDICIÓN

mg: Miligramo (0.001 gramo).

ml: Mililitro (0.001 litro).

μg: Microgramo (0.001 miligramo).

μl: Microlitro (0.001 mililitro).

nm: Nanómetro (10^{-9} m).

rpm: Revoluciones por minuto.

1. RESUMEN

El cáncer ocurre cuando existe un crecimiento descontrolado de células, en este desorden tienen lugar cambios importantes en la proliferación, diferenciación y desarrollo celular. En el cáncer de colon este crecimiento celular descontrolado surge en los tejidos del colon y da inicio con el crecimiento de tumores de menor tamaño denominados pólipos. En México el cáncer de colon constituye el primer lugar en frecuencia de los tumores del tubo digestivo y se tiene un diagnóstico anual de cerca de 15 mil nuevos casos.

Un factor importante para el desarrollo de esta patología es la dieta, determinando que una alimentación rica en fibra, minerales, vitaminas y antioxidantes es el principal factor preventivo para el desarrollo de esta patología.

Siendo el cáncer un verdadero problema de salud pública es increíble que actualmente no exista un tratamiento adecuado para esta enfermedad. Sin embargo, las plantas medicinales o aquellas consideradas dentro de la medicina tradicional han sido estudiadas y han logrado demostrar que ayudan a combatir el desarrollo de esta patología pues la medicina tradicional es actualmente una alternativa con gran relevancia en el tratamiento de las enfermedades pues está muy comprometida con la búsqueda de nuevos fármacos basados en algunos compuestos químicos obtenidos a partir de plantas llamadas medicinales, para el tratamiento de diversas patologías.

El aguamiel en la medicina tradicional mexicana ha sido considerado como remedio para trastornos gastrointestinales. Se considera que parte de sus propiedades curativas es debido al microbioma presente en él, compuesto por bacterias y levaduras con potencial probiótico y antimicrobiano. Por tanto en este trabajo se buscó obtener un efecto antiproliferativo de la línea celular HCT15 al estar en contacto con aguamiel de *Agave salmiana*.

Demostrando que el aguamiel de agave salmiana presenta actividad antiproliferativa sobre la línea celular HCT15 perteneciente a cáncer de colon, con una disminución de entre 5.52% y 8.84% en la viabilidad celular, siendo mayor en el aguamiel obtenido de una planta madura con 12 años de edad. Relacionando

esta actividad con el contenido de compuestos fenólicos totales, el cuál aumenta conforme el tiempo de maduración de la planta. Por otro lado, se determinó que presenta citotoxicidad nula sobre linfocitos humanos, teniendo un aumento en la viabilidad celular de hasta 22.11-24.31% y por tanto actividad proliferativa sobre esta línea celular.

2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad fortalecer la investigación en cáncer con el objetivo de frenar la aparición de la patología y reforzar a su vez la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con este diagnóstico, es uno de los retos principales en la lucha contra el cáncer.

Actualmente se tiene una predicción que muestra que en años siguientes el cáncer llegará a ser la primer causa de la mortalidad a nivel mundial pues tiene una predicción de incidencia de 21.6 millones de nuevos casos para el año 2030 y aproximadamente 13 millones de muertes debidas a esta causa, esto según las estimaciones de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC). Todo esto a pesar de que la tasa de supervivencia global se acerca al 50%, gracias a los esfuerzos realizados en la rama de la investigación.

En el caso del cáncer de colon, en los últimos años ha avanzado silenciosamente de manera que se ha colocado como el cuarto tumor más frecuente en México. Recalcando que los factores de riesgo para el desarrollo de esta patología son completamente controlables, siendo estos los problemas relacionados con el peso corporal como sobrepeso y obesidad, la inactividad física o sedentarismo normalmente causado por cambios en la rutina y estilo de vida, la malnutrición causada por el exceso de alimentos altos en azúcares, grasas y comidas procesadas y por último aquellos hábitos toxicológicos como el tabaquismo y alcoholismo. Al ser controlables estos factores de riesgo, son por tanto prevenibles.

Adoptando nuevos hábitos de salud, siendo primordiales la alimentación correcta (dieta rica en vitaminas, minerales, fibra, y adecuada distribución de los

macro nutrimentos como hidratos de carbono, proteínas y lípidos) y la actividad física, se podría minimizar la posibilidad del desarrollo del cáncer de colon.

Este tipo de cáncer si es detectado a tiempo es el de más alta tasa de supervivencia. Anualmente se presentan aproximadamente 8 mil 700 casos nuevos.

Dentro de la rama científica, los probióticos han adquirido un interés por la comunidad y captado la atención de todos debido al papel que han, según diversos estudios, demostrado tener tanto en la prevención como en el tratamiento de diversas patologías, dentro de estas el cáncer de colon.

El aguamiel como alimento natural aceptado ya en la medicina tradicional, es una bebida alimenticia que cuenta con una capacidad prebiótica y probiótica importante, por lo que aunado a los estadios previamente realizados con alimentos que cuentan con estas mismas características donde se ha demostrado un efecto favorable en el tratamiento de algunas patologías, en esta investigación se determinó su efecto anti proliferativo in vitro en células de la línea tumoral HCT15 de adenocarcinoma rectal con clasificación Duke “C”.

3. ANTECEDENTES

3.1 ANTECEDENTES GENERALES

3.1.1 CÁNCER

Cuando existe un crecimiento descontrolado de células, ocurre un proceso denominado cáncer [(1)]. Este descontrol celular ocurre cuando las células comienzan a dividirse y diseminarse a otros tejidos y este proceso regularmente puede comenzar en cualquier parte del cuerpo humano. En este desorden están implicados cambios en la proliferación, diferenciación y desarrollo celular. El cáncer regularmente aparece como una masa de estas células generando un tumor.

Las células del organismo crecen y se dividen para dar lugar a la formación de nuevas células, esto conforme el mismo organismo va haciendo uso de ellas. Una vez que estas células envejecen o se dañan, se mueren y son reemplazadas por células nuevas. En el caso del cáncer este proceso de crecimiento celular se descontrola ya que las células no envejecen y las células dañadas no son

reemplazadas, sino sobreviven mientras células nuevas se forman cuando no son necesarias. [1]

Cualquier célula tiene el potencial de sufrir cambios malignos y desarrollar un carcinoma. Las células cancerígenas no están confinadas a la localización e infiltración del tejido circundante, estas pueden dividirse sin interrupción y formar masas llamadas tumores. Además, durante este proceso las células malignas crecen en un patrón completamente irregular y son capaces de filtrarse en tejidos circundantes, causando con esto la infiltración de los vasos tanto linfáticos como sanguíneos. Al tener acceso a estos vasos, las células pueden ser transportadas a otros sitios dentro del organismo, replicándose y creciendo descontroladamente durante un proceso denominado metástasis como se muestra en la Figura 1. Por otro lado, y con el fin de asegurar que estas células reciban el oxígeno y alimento necesario, se produce la angiogénesis constante o formación de nuevos vasos sanguíneos [2].

La propagación linfática ocurre cuando las células cancerígenas acceden al sistema linfático y viajan por los vasos a los nódulos linfáticos. Estas células pueden entonces establecer residencia en estos nodos regionales, donde se replican y eventualmente reemplaza al nódulo linfático por un tumor maligno. Las células pueden entonces viajar a través del sistema linfático al siguiente grupo de ganglios linfáticos, extendiéndose por todo el cuerpo del paciente [2].

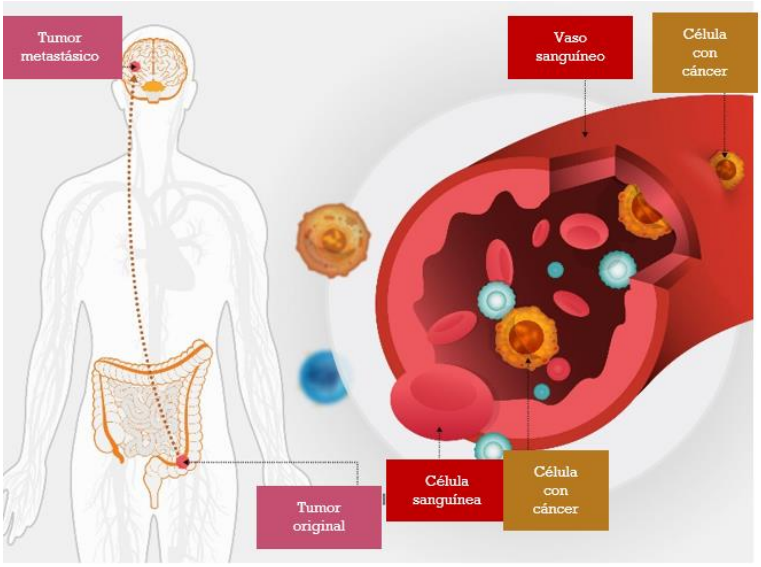


Figura 1. Cáncer de colon metastásico. Las células se separan del tumor original y se trasladan por medio del torrente sanguíneo o del sistema linfático a otras partes del organismo, como hígado, pulmón y cerebro. Recuperado del INC [3].

Esto generalmente ocurre cuando los mecanismos normales de control celular son interrumpidos. Entre más rápida sea la detección de la enfermedad, será menos probable que se haga metástasis y por lo tanto el pronóstico para el paciente será más favorable [2].

El cáncer es una patología que puede desarrollarse por cambios en aquellos genes encargados de controlar tanto el crecimiento como la división celular. Estos cambios genéticos pueden heredarse de la línea familiar o también pueden ser causados como resultado de los errores que ocurren durante el proceso de división celular, así como por un daño al ADN causado principalmente por exposiciones del medio ambiente, tales como aquellas sustancias o compuestos químicos que se encuentran presentes en el humo de tabaco, radiaciones como los rayos ultravioleta del sol, mala alimentación, sedentarismo, etcétera.

La carcinogénesis es un proceso de varios pasos que causa una transformación progresiva de una célula normal en una célula cancerígena. Esta transformación se debe a la sobreexpresión o hiperactivación de genes que promueven la supervivencia y proliferación celular (oncogenes) o a la pérdida de expresión de los genes que controlan el crecimiento celular (genes supresores de tumores). Como resultado, mientras que las células normales son sensibles a los

estímulos exógenos que controlan su crecimiento y supervivencia, las células cancerosas pueden crecer en la ausencia de estas señales exógenas y, por tanto, se vuelven insensibles a los reguladores de crecimiento y supervivencia. Aunado a esto, la sobreexpresión que existe en los factores de crecimiento y sus receptores conduce a una constante activación de las vías de señalización descendentes, y con esto se promueve el crecimiento y la supervivencia de las células dañadas.

Existen distintos tipos de cáncer y estos pueden ser agrupados en categorías para su diferenciación [(4)]:

- Carcinoma: Aquel crecimiento celular que da comienzo en la piel o en los tejidos que revisten o cubren los órganos internos. Existen a su vez subtipos de carcinoma, entre ellos, el adenocarcinoma, el carcinoma de células basales, el carcinoma de células escamosas y el carcinoma de células de transición.
- Sarcoma: Se denomina así cuando el crecimiento descontrolado de células comienza en hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén.
- Leucemia: El crecimiento celular tiene su desarrollo en el tejido en el que se forma sangre, como la médula ósea. Este proceso causa que se produzcan grandes cantidades de células sanguíneas anormales y que entren en la sangre de manera directa.
- Linfoma y mieloma: Este tipo de cáncer se desarrolla en las células del sistema inmunitario.
- Cánceres del sistema nervioso central: Aquel crecimiento descontrolado que se originan en los tejidos del cerebro y de la médula espinal.

En el año 2018 se tuvo una estimación de 18 078 957 nuevos casos a nivel mundial, en ambos sexos y todas las edades, siendo los principales pulmón (11.6% - 2 093 876 casos), mama (11.6% - 2 088 849 casos), colorrectal (10.2% - 1 849 518 casos), próstata (7.1% - 1 276 106 casos), estómago (5.7% - 1 033 701 casos), hígado (4.7% - 841 080 casos) y esófago (3.2% - 572 034 casos)[(6)].

3.1.1.1 CANCER EN MÉXICO

Según los datos obtenidos en el año 2018, tres de cada 10 muertes por cáncer en la población mexicana de 30 a 59 años, son consecuencia del cáncer en órganos digestivos. Para la población de 60 y más años, de 2011 a 2016, cuatro de cada 10 defunciones por cáncer en mujeres se deben a tumor en órganos digestivos, contra tres de cada 10 en varones [(7)].

La Organización Mundial de la Salud menciona que actualmente se tiene una estimación para el año 2030, dónde se espera que los nuevos de cáncer sobrepasen los 20 millones anuales. Sin embargo, se calcula que hasta el 50% de los casos pueden ser prevenibles mediante la adopción de hábitos saludables, sistemas de vacunación, diagnósticos y tratamientos oportunos [(4)].

De acuerdo con cálculos de organismos internacionales los cánceres más recurrentes son el de mama, próstata, cervicouterino, colorrectal, tiroides y de pulmón en la población de ambos sexos [(4)].

En el país el cáncer es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Según datos obtenidos por el Global Cancer Observatory (GCO o GLOBOCAN) en el año 2018 se registraron en México 190 667 nuevos casos en ambos sexos y todas las edades. De estos nuevos casos los principales son mama (14.3% - 27 283 casos), próstata (13.1% - 25 049 casos), colorrectal (7.8% - 14 900 casos), tiroides (6.4% - 12 122 casos) y cervicouterino (4.1% - 7 869 casos) [(6)].

La Sociedad Mexicana de Oncología (SMeO) considera que además las elevadas cifras de muertes por cáncer se deben a los diagnósticos tardíos ya que el 60% de los casos de cáncer en México es detectado en etapas avanzadas. En el año 2018 GLOBOCAN reporta 83 473 muertes y 471 497 casos de prevalencia a 5 años [(6)].

3.1.2 CÁNCER DE CÓLON

El colon es un tubo de aproximadamente 150 cm de largo al final del sistema digestivo. Es un órgano con gran importancia, pues es el encargado de extraer el

agua, nutrientes y electrolitos de los alimentos digeridos. Y lleva los productos restantes o deshechos al recto para ser eliminados del organismo.

El intestino delgado se encuentra unido al colon por medio del ciego lo que se denomina colon proximal. El colon a su vez está conformado por: colon ascendente, colon transverso, colon descendente y colon sigmoideo como se muestra en la Figura 2. Este último tiene unión con el recto, el cual tiene como función la expulsión de deshechos [8].

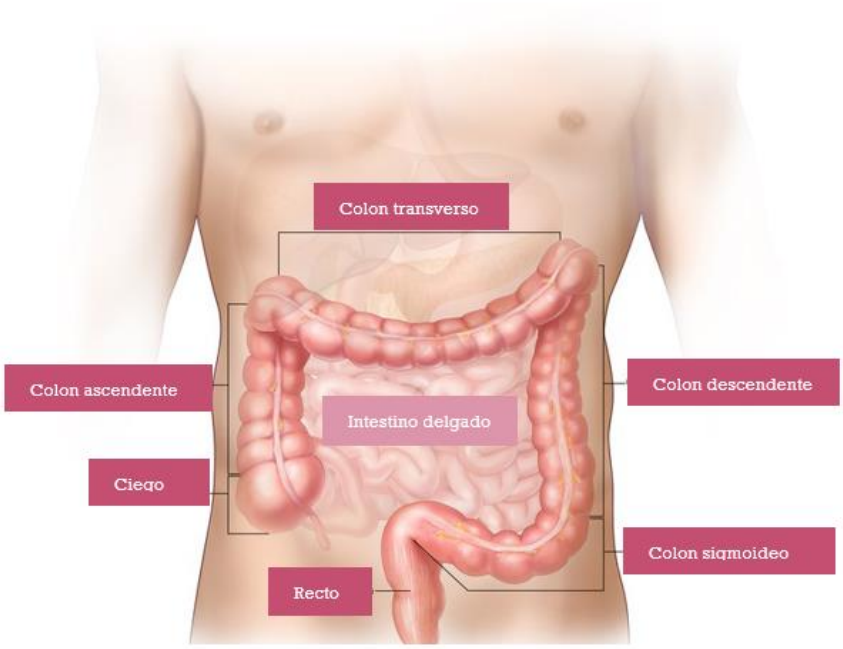


Figura 2. Anatomía del colon. El intestino delgado es conectado al colon por medio del ciego. El colon está conformado por colon ascendente, colon transverso, colon descendente y colon sigmoide. Este último, tiene conexión con el recto. [8]

Se denomina cáncer de colon al crecimiento descontrolado y formación de nuevas células malignas (cancerosas) en los tejidos del colon. Este proceso puede iniciarse en un crecimiento en el tejido del colon denominado pólipo. La mayoría de los cánceres de colon son adenocarcinomas: es decir, cánceres que empiezan en las células que producen y liberan el moco y otros líquidos [1].

No todos los pólipos son capaces de convertirse en cáncer con el paso del tiempo. La probabilidad de que esto ocurra depende completamente del tipo de pólipo. Por tanto, existen factores que deben tomarse en cuenta para considerar si

un pólipo es propenso a desarrollar cáncer o que aumente el riesgo, como tal, de que una persona lo desarrolle. Estos factores se muestran a continuación [1]:

- Descubrimiento de un pólipo con un tamaño mayor a un centímetro
- Descubrimiento de más de dos pólipos en la misma región.
- Descubrimiento de displasia después de la extirpación de un pólipo.

3.1.2.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE COLON

El cáncer de colon da inicio con el crecimiento de tumores de menor tamaño, benignos conocidos como pólipos adenomatosos. Los cuales con el tiempo se transforman en tumores cancerosos [9].

Es una patología con aparición global, actualmente se indica una incidencia de casi un millón de casos diagnosticados anualmente y una mortalidad de aproximadamente 500,000 casos, es la estirpe histológica maligna más frecuente y constituye más del 95% de los casos de adenocarcinomas. Es un problema de salud mundial, la neoplasia más frecuente del aparato digestivo, el tercer tumor de mayor incidencia a nivel mundial [10] y la segunda causa de muerte en Estados Unidos [11].

El cáncer colorrectal tiene una tasa de mortalidad de aproximadamente 19.6 por cada 100,000 habitantes y una tasa de incidencia de aproximadamente 46.4 por cada 100,000 habitantes [10]. Es el cáncer más común a nivel mundial con un diagnóstico anual de más de 1,000,000 de personas, siendo así el tercer tipo de cáncer más común en el mundo para personas de ambos sexos [10].

En México el cáncer colorrectal ya constituye el primer lugar en frecuencia de los tumores del tubo digestivo [9]. Cada año se diagnostican cerca de 15 mil nuevos casos de personas con cáncer de colon [12], enfermedad que, al tratarse adecuadamente, permite la curación de 9 de cada 10 casos. Se estima que anualmente seis mil 500 personas mueren en México por esta causa.

3.1.2.2 ESTADIFICACIÓN DEL CANCER COLORRECTAL

El principal pronóstico del cáncer de colon es la estadificación [10]. En resumen y según la Comité Americano en Cáncer (por sus siglas en inglés AJCC) y la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC), como se muestra en la Figura 3.

- Estadio 0, también denominado carcinoma *in situ*: Es la fase más temprana del cáncer colorrectal. Las células tumorales se encuentran situadas en la parte más superficial de la mucosa y en ningún caso la traspasa. No afecta ganglios linfáticos.
- Estadio I: El tumor afecta a la pared del colon o recto sin traspasar la capa muscular. No existe afectación de ganglios linfáticos. Tratamiento exclusivamente quirúrgico, con excelente pronóstico tras la intervención. Sin quimioterapia adyuvante.
- Estadio II: El tumor ha filtrado todas las capas de la pared del colon y recto. Puede invadir los órganos de alrededor. No se aprecia afectación ganglionar. Tienen un buen pronóstico después de la resección quirúrgica curativa y no parecen beneficiarse de la quimioterapia adyuvante.
- Estadio III: El tumor ha invadido los órganos más próximos y afecta a los ganglios linfáticos. Tras una cirugía con intención curativa, los pacientes con cáncer colorrectal se benefician de la adición de oxaliplatino a 5 Fluoro uracilo (5-FU) o a capecitabina como terapia adyuvante.
- Estadio IV: El tumor se ha diseminado afectando a órganos alejados del colon y recto como hígado, pulmón, ovario o ganglio no regional.

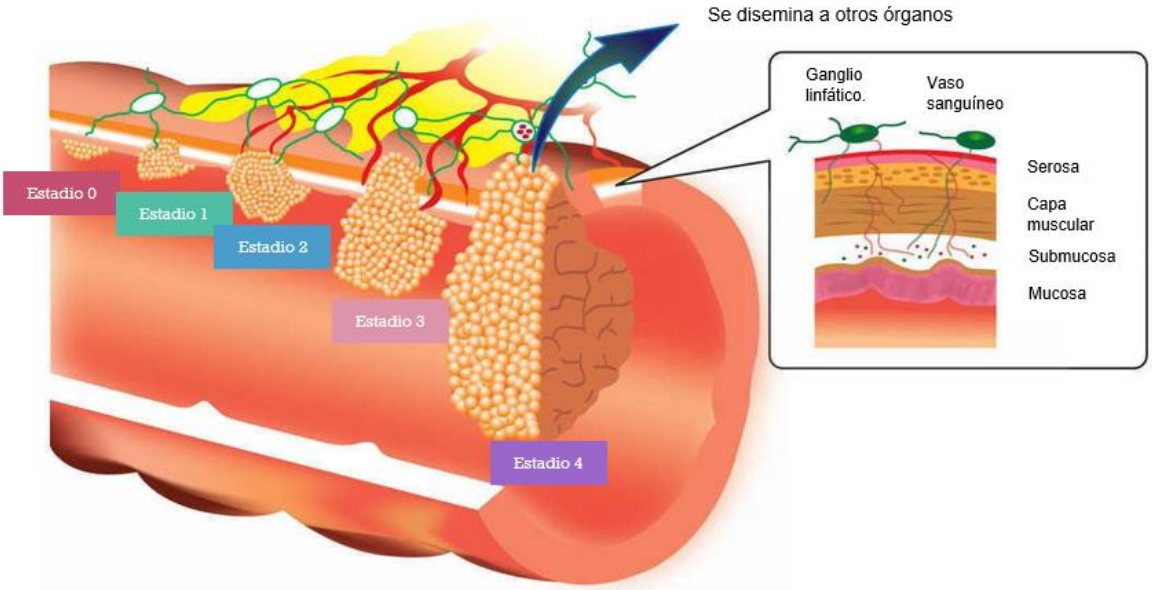


Figura 3. Estadificación del cáncer de colon [10].

Para la clasificación de este cáncer se utiliza también la Escala de Dukes, la cuál es utilizada para medir el estadio del cáncer tanto de colon como de recto. Esta gradación tiene implicaciones sumamente importantes en el pronóstico y en la planificación del tratamiento [13].

- Dukes A: Tumor localizado en la mucosa.
- Dukes B: Tumor localizado en la submucosa, sin afección en ganglios linfáticos.
- Dukes C1: Invación del tumor a gánglios linfáticos sin atravesar la pared intestinal.
- Dukes C2: Metástasis en gánglios linfáticos, atravesando la pared intestinal.

3.1.2.3 CAUSAS DEL CÁNCER DE COLON

El cáncer colorrectal puede clasificarse en esporádico o hereditario. Se cree que más del 90-95% de estas neoplasias son esporádicas y un 5-10% parecen tener un componente hereditario [10].

Uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de colon es la edad, pues nueve de cada diez personas con este diagnóstico tienen más de 50 años, tomando en cuenta este dato podríamos corroborar que la incidencia de cáncer aumentará drásticamente para el año 2030 pues, a medida que la población mundial crece y envejece, las patologías como el cáncer de colon se diagnosticarán con mayor frecuencia.

Otro factor de riesgo importante para el desarrollo de esta patología es la dieta [11]. Hoy en día la alimentación está basada en un alto consumo de carnes rojas, grasas, alimentos procesados y bajo consumo de frutas, verduras, fibra y alimentos antioxidantes. Una dieta adecuada, por tanto, rica en fibra, minerales, vitaminas y antioxidantes es el principal factor preventivo para el desarrollo de este tipo de cáncer.

El estilo de vida, la obesidad, el tabaquismo y el alcoholismo contribuyen también al desarrollo de esta patología. Además, se suman a estos factores de

riesgo las personas con antecedentes de enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa [11].

Por otro lado, el cáncer colorrectal tiene una incidencia mayor en aquellos pacientes que cuentan con condiciones hereditarias que predispongan en mayor manera la patología, como poliposis familiar, herencia de cáncer de colon sin relación con poliposis o incluso algunas variantes del Síndrome de Lynch I y II y colitis ulcerosa [11].

De manera general los factores asociados al riesgo de desarrollar cáncer de colon se dividen en independientes, siendo estos aquellos que no son modificables, y dependientes aquellos que se pueden modificar e incluso prevenir [11]:

- Factores de riesgo no modificables o independientes:
    - Edad mayor a los 50 años.
    - Antecedentes personales patológicos de pólipos colorrectales, diabetes mellitus tipo II y enfermedad inflamatoria intestinal
    - Antecedentes patológicos familiares de pólipos adenomatosos, síndromes hereditarios como poliposis adenomatosa familiar, CCR hereditario no asociado a poliposis o síndrome de Lynch, síndrome de Turcot, síndrome de Peutz-Jeghers, poliposis asociada al gen MUTYH).
- Dependientes:
    - Dietas ricas en carnes rojas y alimentos procesados, inactividad física, obesidad, tabaco, ingesta de alcohol.
    - Bajo consumo de frutas, verduras, fibra y alimentos antioxidantes.

También hay varios genes que se pueden heredar que incrementan el riesgo de cáncer de colon. Estos son genes de una amplia variedad de familias, incluidos los genes de reparación del ADN, como KRAS y P53.

3.1.2.4 DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE COLON

Los principales síntomas asociados al cáncer de colon o recto son: cambios en los hábitos de evacuaciones, sangre en el excremento, cólicos continuos y flatulencias o dolores abdominales [9].

El diagnóstico de esta patología se basa en algunos procedimientos como tacto rectal, rectosigmoidoscopia rígida o flexible con toma de biopsias, tomografía axial computarizada, resonancia magnética del abdomen y pelvis y ecografía endoscópica.

Toda la población de adultos mayores a 50 años debe tener un tamizaje, en especial atención para aquellos pacientes que cuenten con familiares de primera línea con antecedentes de cáncer de colon, por tanto, se establece como sugerencia la realización de una colonoscopia de detección en los pacientes de esta edad [11].

La colonoscopía ofrece ventajas tanto terapéuticas como complementarias durante el diagnóstico por toma de biopsias. Sin embargo, actualmente hay una disminución bastante notable en el apego que tienen los pacientes al tamizaje para el cáncer colorrectal cuando se realiza mediante colonoscopia, en comparación con la sangre oculta en heces o la elección voluntaria de alguno de ellos.

Las pruebas de cribado de cáncer colorrectal es otra de las causas implicadas en la reducción de la mortalidad y la incidencia. Tienen un papel importante no solo en el diagnostico sino también en la prevención pues implican la detección y extirpación de pólipos precancerosos, previniendo el desarrollo de tumores malignos y/o su detección en estadios precoces [10].

En general, las pruebas de cribado colorrectal se pueden dividir en dos grupos:

- Pruebas a base de muestras biológicas:
    - Test de sangre oculta en heces: Se basa en la detección de la actividad peroxidasa de la hemoglobina, emitida a la luz intestinal de algunos adenomas y del propio CCR, debido a la posible ulceración y friabilidad de los mismos. Es un test muy

barato. Sin embargo, presenta muchos falsos positivos. Por lo que la especificidad de la prueba es del 80%.

- Test inmunoquímicos fecales: Incorpora métodos inmunológicos tanto cuantitativos como cualitativos que detectan específicamente sangre humana. Es un test que tiene baja especificidad y alto costo.
- Test de detección fecal de ADN humano fecal: Se basa en la detección de mutaciones del ADN a través de heces, esta prueba permite la detección de carcinomas no sangrantes. Mejora de este modo la sensibilidad de las pruebas de sangre oculta en heces. Sin embargo, es de alto costo.

- Pruebas basadas en imágenes: tienen como desventajas el alto corte, sin embargo, el ahorro de costes se consigue con la detección en estadios precoces de las neoplasias.
    - Colonoscopia: Es la mejor técnica para el cribado de CCR, se considera la prueba gold standard o test de referencia. Permite la visualización de todo el colon y además de detectar neoplasias en pacientes de alto riesgo, permite en el mismo acto la resección de pólipos durante el proceso y la toma de biopsias.
    - Sigmoidoscopia: Es una prueba de baja eficacia ya que solo permite explorar hasta 60 centímetros, dejando parte del colon proximal sin explorar.
    - Enema opaco: Se trata de una prueba de rayos X.

3.1.2.5 TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE COLON

El principal tratamiento en esta patología es la cirugía, siendo el primordial y conocido como la piedra angular en la resolución de este tumor. Es capaz de producir una cura total en cerca del 50 % de los pacientes. La recidiva después de la cirugía es un problema grave y con frecuencia es la causa definitiva de muerte [(1)].

El tratamiento estándar para los pacientes de cáncer de colon con enfermedad localizada es la resección quirúrgica abierta de los ganglios linfáticos primarios y regionales [1]. Se sabe que el 90% de los pacientes con cáncer de colon se trata por medios quirúrgicos [11].

Aunque el tratamiento es únicamente quirúrgico, en los casos de estadios II de alto riesgo y estadio III se complementa con quimioterapia adyuvante [9]. Y, para el manejo de la enfermedad metastásica (estadio IV) se utilizan combinaciones de quimioterapia y fármacos biológicos. Sin embargo, la extirpación quirúrgica del tumor original no siempre es un tratamiento exitoso debido a la propagación microscópica [2].

3.1.2.6 PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE COLON

En México no existe un estudio que permita conocer el seguimiento prestado a la población, por lo que sería deseable conocer cuál es el seguimiento de la población médica respecto de este trastorno.

El pronóstico de esta patología se correlaciona de manera directa con el grado en que el tumor haya penetrado la pared intestinal y con la presencia o ausencia del proceso de invasión ganglionar. El seguimiento posterior al tratamiento debe tomar en cuenta que el porcentaje de recurrencias posterior a una resección se presentan en los primeros tres años, siendo este entre el 80 y 90%. Y el 5% restante puede presentarse después de los cinco años posteriores a la cirugía. Por tanto, en un paciente dado de alta posterior a la cirugía, debe ser preciso tener en cuenta la realización de los lineamientos establecidos como exploración física cada tres meses los dos primeros años y luego cada seis meses; determinación del antígeno carcinoembrionario cada tres meses los dos primeros años y con posterioridad cada seis meses; colonoscopia al año y después cada tres o cinco años. Incluyendo también la tomografía computarizada por su elevada sensibilidad para la definición de recurrencia del cáncer de colon y metástasis [11].

Sin embargo, es clara la idea que una alimentación saludable, rica en micronutrimentos, probióticos, fibra, bajo consumo de alimentos procesados o altos en grasas y azúcares podría disminuir el riesgo de desarrollar cáncer de colon [11].

3.1.3 MEDICINA TRADICIONAL Y CÁNCER

La medicina tradicional es actualmente una alternativa con gran relevancia en el tratamiento de las enfermedades pues está muy comprometida con la búsqueda de nuevos fármacos basados en algunos compuestos químicos obtenidos a partir de plantas llamadas medicinales, para el tratamiento de diversas afecciones, dentro de las principales encontrándose el cáncer.

De acuerdo con la OMS las plantas medicinales son definidas como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos [14].

México es un país, se podría decir el único privilegiado en biodiversidad, con una cantidad de recursos naturales con propiedades medicinales ya conocidas, dónde a pesar de todo, sólo se ha estudiado alrededor del 5% de las especies medicinales con las que cuenta.

Actualmente se tiene una estimación que más del 75% de la población mexicana que vive en regiones poco desarrolladas emplean este tipo de medicina para el cuidado de su salud y la de su familia. Sin embargo, el principal problema de esto es que hoy en día se desconocen aún las dosis para poder llevar un buen control con su uso sin poner en riesgo la calidad de vida y la salud de quienes la consumen, pues el contenido de muchas plantas puede variar según las condiciones genéticas de la tierra o ambientales. Por este motivo es esencial el estudio de la medicina tradicional de forma científica para establecer los procesos de estandarización basándose en un metabolito que permita recetar estos compuestos herbolarios con bases firmes y seguras [14].

Siendo el cáncer un verdadero problema de salud pública es increíble que actualmente no exista un tratamiento adecuado para esta enfermedad. Sin embargo, las plantas medicinales o aquellas consideradas dentro de la medicina tradicional han sido estudiadas y han logrado demostrar que ayudan a combatir el desarrollo de esta patología.

Tal es el caso del aguamiel que en la medicina tradicional mexicana ha sido considerado como remedio para evitar las infecciones en las heridas, los padecimientos renales y trastornos gastrointestinales. Se considera que parte de sus propiedades curativas es debido al microbioma presente en él, compuesto por bacterias y levaduras con potencial probiótico y antimicrobiano [15].

3.1.4 AGUAMIEL

3.1.4.1 ORIGEN (*Agave Salmiana*)

En la República Mexicana se encuentra el origen de la familia *Agavacea*, a la que pertenece el género agave. Actualmente se describen 24 especies de esta familia distribuidas en todo el continente americano, encontrándose en México la mayor diversidad con 205 especies, entre ellas el maguey pulquero [16].

La planta de maguey pulquero (*Agave salmiana*) cuenta con hojas en forma de roseta, gruesas y carnosas [16] [17], denominadas pencas. Estas pencas a su vez se encuentran dispuestas sobre un tallo corto cuya piña inferior no sale de la tierra [16], son rígidas y con espinas en las puntas. Crece en clima semiseco y frio de la altiplanicie mexicana. Es una especie que resiste sequías y se adapta con facilidad a otros climas y tipos de suelos.

Se cultiva de los 1200 a 2500 metros de altitud en regiones con lluvias de 350 a 1000 mm anuales [18], a 1800 metros a nivel del mar [20], principalmente en zonas áridas y semiáridas [16]. Su reproducción se da principalmente por hijuelos con un promedio de 84.6% y el cultivo in vitro con el 3.8%. que se desarrollan en la base del tallo de la planta madre [18]. El tamaño de las plantas para trasplantarse en el terreno debe ser de 74 cm y una vez implantados los magueyes en el terreno, los productores deben llevar a cabo algunas prácticas culturales como el deshierbe, abonado y la poda [19].

En agroecosistema el maguey es capaz de combinarse con maíz, trigo, cebada, avena, chícharo, habas y papa; pero nunca con árboles frutales porque producen sombra no benéfica para el desarrollo de la planta y la calidad del aguamiel [18]. Crece en clima templado con vegetación compuesta principalmente por bosques de pino y oyamel.

La madurez de la planta va de los 10 a los 14 años y ésta será indicada por el grosor del meyolote, rasgo morfológico importante para la determinación de la maduración del maguey. Cuando el meyolote está delgado y largo, indica que está listo para ser capado y se dice que está al hilo y si pasa este momento, después de la aparición de flores de maguey, se convierte en palmilla [19].

Una vez capado el maguey, debe dejarse en un periodo de añejamiento de entre 4 y 8 meses, se conoce que entre más cercano sea el tiempo al año se produce aguamiel de mejor calidad. Transcurrido este periodo, se pican y se dejan los restos de las pencas en el centro de la planta por ocho días; después se inicia el raspado, siendo esta última práctica crucial en cuanto a la cantidad y calidad del aguamiel.

Cuando la planta está en crecimiento y no ha sufrido alguna alteración que entorpezca su desarrollo se le denomina maguey entero. Cuando ésta ha madurado lo suficiente debe ser capada extrayendo su yema apical floral para garantizar mayor cantidad de aguamiel. Al concluir esta operación el maguey dejará de llamarse entero y será capón [18].

Si a la planta no se le retira la yema de crecimiento o el conocido meyolote, brotará del centro un tallo largo que producirá su inflorescencia y posteriormente semilla, dando resultado lo que se denomina maguey saltado. Este maguey ya no producirá aguamiel [18].

Si un maguey deja de ser raspado un día, corre el riesgo de no producir más aguamiel. Cuando esta planta ya no produce aguamiel, su piña se extrae de la tierra, se le retiran las raíces, se corta por la mitad y se emplea como recipiente para proveer de alimento a los animales. Sus pencas principalmente se destinan a la producción de barbacoa de borrego [18]. De este modo no se desperdicia ningún componente de la planta.

En nuestro país se encuentran sembradas 3 mil 280 hectáreas de esta variedad de agave según la Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en el año 2014 [17]. Repartidas en 26 estados

donde se cultiva maguey. De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) en el año 2013, los principales productores de maguey son los estados de Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y el Estado de México [17].

Los pobladores mesoamericanos tienen una relación estrecha con el maguey que data de hace 10 mil años. José Acosta en 1590 denomina esta planta como “el árbol de las maravillas” debido a la variedad de aprovechamientos que ofrecía, entre ellos se incluyeron: alimento (sustancias comestibles y materiales relacionados con la preparación de los alimentos, aguamiel, elaboración de pulque a través de aguamiel, condimento o ingrediente, miel, medio de cocción o insumo gastronómico a través de los gusanos blancos o rojos de maguey), casa (elaboración de utensilios, muebles, enseres, productos de limpieza, combustible y fertilizante ornamental), vestido (hilo o cordeles de intle; fibra vegetal resistente), fibra (inulina de agave y Fructooligosacáridos o FOS) y medicina (Tratamiento de enfermedades gastrointestinales y anemia), así como agrícola ya que otorgan protección y regeneración del suelo [19] [18].

El maguey suministra dos tipos de gusanos en temporadas de lluvia: gusanos blancos y rojos. Los gusanos blancos viven en las pencas, son ricos en proteínas y grasas y los gusanos rojos o chinicuiles viven en las raíces de los magueyes jóvenes y son de sabor muy fuerte [18].

De las pencas del maguey se pueden obtener hilos para tejer costales, morrales o pizas, redes de pesca y cordeles; también enteras se usan para techar las casas a modo de tejado; los tallos secos sirven como vigas o cercas para delimitar terrenos; las púas o espinas se utilizaban como clavos o agujas; del centro del maguey se obtiene el aguamiel, bebida con propiedades curativas [20].

3.1.4.2 CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE AGUAMIEL

La región productora de aguamiel y pulque más importante fue la zona conocida como “Los llanos de Apan”, abarcando diferentes estados como Hidalgo, Puebla, Morelos, Tlaxcala y Estado de México [19]. Esta región para la primera mitad del siglo XIX contaba con 250 mil hectáreas y un aproximado de 206 millones de magueyes.

En el año 1930 la superficie cultivada con magueyes era de 70 600 hectáreas, en el año 1950 de 47 500 y en el año 1970 de 22 600 hectáreas; esto muestra claramente una disminución de la superficie con maguey en el país [19]. En el periodo del 2006 al 2014 el cultivo de maguey tuvo una reducción a solo algunos cientos de hectáreas cultivadas y la producción de aguamiel y pulque a miles de litros, anual según el Servicio de información agroalimentaria y pesca en el año 2014.

En la época prehispánica la ingesta de aguamiel tenía un sentido religioso. Se consideraba un fuerte estimulante o embriagante ritual, no era considerado una bebida ordinaria. Fue durante el tiempo del porfiriato dónde apareció la cerveza convirtiéndose en el gran rival del pulque o aguamiel fermentado.

La industria cervecera jugó un papel importante en la campaña acérrima de desprestigio contra el pulque ya que difundió muchos mitos alrededor de la bebida, el más común: que el pulque se fermentaba con excremento de animal o ser humano, hecho falso [18]. Fue así como desde década de 1960 surgió una disminución en su demanda debido al crecimiento en el consumo de cerveza.

3.1.4.3 CARACTERÍSTICAS DEL AGUAMIEL

El aguamiel es el principal producto derivado del maguey pulquero. Se han encontrado evidencias en Teotihuacan, Estado de México e Hidalgo que muestran que esta planta ha sido utilizada para la obtención de aguamiel desde hace 3 mil 500 años [19].

Es la savia que exuda la piña del maguey después de haber sido raspado, es producido de manera natural por hidrólisis de sus fructanos y es la materia básica con la que se fabrica la bebida tradicional mexicana conocida como pulque. Es conocido también por otros nombres como: tlachique, néctar de agave o hidromiel [17].

Se le adjudican propiedades benéficas como suplemento alimenticio, probiótico y diurético además de ser una bebida con bajo índice glucémico [17].

Su vida útil es de 2 horas aproximadamente a temperatura ambiente, debido a que es un producto altamente susceptible a fermentación se destina

principalmente a la elaboración de pulque o jarabes fructosados como la miel de maguey.

Por el alto contenido de saponinas se ha encontrado que el maguey pulquero tiene beneficios medicinales como diurético y remedio para enfermedades intestinales, con una ingesta en ayunas y no mayor a un vaso de 240 ml al día [18].

Los investigadores del centro de investigación en biotecnología aplicada del Instituto Politécnico Nacional en Tlaxcala demostraron que los microorganismos aislados del pulque tienen capacidad de inhibir el crecimiento de ciertas bacterias patógenas como *Escherichia coli, Shigella sp y Samonella sp* [21].

3.1.4.4 PROCESO DE MANUFACTURA DEL AGUAMIEL

La cadena productiva de maguey pulquero comprende cinco eslabones: productor, tlachiquero, tinacalero, expendor/dueño de pulquería y consumidor [19]. De este modo en el Valle del Mezquital, el maguey forma parte de la economía básica a nivel familiar pues personas aún ven en esta planta el principal medio de subsistencia [18].

Los tlachiqueros son aquellas personas encargadas de capar y raspar el maguey para la obtención del aguamiel, la mayoría comparte creencias para la obtención del aguamiel. Se cree que, si el maguey es capado en luna llena y se raspa en luna tierna o cuarto creciente, entonces se evitara con esto la pudrición de la planta [19].

Para el raspado del aguamiel se utilizan acocotes de madera, de guaje o de fibra de vidrio. Posterior al raspado es depositado en tinas de madera para esperar su fermentación.

En algunos municipios se lleva a cabo el control de plagas, los productores ponen cal a la parte basal de las pencas para el control de caracoles con el propósito de evitar la contaminación del aguamiel.

3.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

3.2.1 COMPOSICIÓN DEL AGUAMIEL, PROPIEDADES PROBIOTICAS Y SU USO CONTRA EL CÁNCER

El aguamiel es la savia o jugo extraído de algunas especies del género *Agave salmiana*, su producción se destina generalmente a la elaboración de una bebida artesanal fermentada, alcohólica, llamada pulque.

De acuerdo con su composición química el aguamiel contiene en 100 gramos 89.61% de humedad, 3.1% de ceniza, pH de 4.5 a 7.5 y acidez de 0.06 mg (mg/100 g de ácido láctico).

También contiene 3.5 gramos de proteína, 28.68 g de glucosa total, 61.31 g de azúcares reductores totales, 12.90 g de sacarosa, 10.2 g de fructooligosacáridos y 1-2 g de saponinas (actividad antiinflamatoria) [22].

Tabla 1. Contenido de minerales en el aguamiel por 100 gramos [22].

Minerales	mg/100 gr
Potasio	120.44
Calcio	11.70
Sodio	0.83
Hierro	0.81
Zinc	0.18
Cobre	0.07
Magnesio	0.055
Selenio	0.045
Plomo	0.015

Su contenido de minerales por 100 gramos de aguamiel se muestra en la Tabla 1. Y es de 120.44 mg de potasio 11.70 mg de calcio y 0.83 mg de sodio. Proporcionando 3.43%, 1.17% y 0.03% respectivamente, de la ingesta diaria recomendada por la FAO/OMS, la cual en nutrición es la dosis mínima recomendada que debe consumirse de un nutriente para mantener un estado de salud sano,

siendo así para potasio de 3510 mg/día, para calcio 1000 mg/día y para sodio 2400 mg/día en una dieta normal [22]. Contiene también 0.81 mg de Hierro, 0.18 mg de zinc, así como 0.07 mg de cobre, 0.055 mg de magnesio, 0.047 mg de selenio y 0.015 mg de plomo (no considerado tóxico para el consumo humano siendo la cantidad tolerable de 0.243 mg por día) [22].

El contenido de vitaminas solubles en agua en 100 gramos de aguamiel se muestra en la Tabla 2. Las vitaminas del complejo B participan en la regulación del metabolismo de la energía mediante la modulación de la síntesis y degradación de los hidratos de carbono, grasas, proteínas y compuestos bioactivos [22].

Tabla 2. Contenido de vitaminas en aguamiel por 100 gramos [22].

Vitaminas	mg/100 gr
Tiamina (B_1)	0.10
Riboflavina (B_2)	0.38
Niacina (B_3)	4.777
Piridoxina (B_6)	0.57
Vitamina C	17.99

Según las ingestas diarias recomendadas de vitaminas dadas por la FAO, es necesario consumir 1.2 mg de B1 o Tiamina, 1.3 mg de B2 o Riboflavina, 1.3 mg de B6 o Piridoxina y 20 mg de Vitamina C o ácido ascórbico. Por tanto, el aguamiel proporcionaría 8.33%, 29.23%, 34.07% y 89.95% de las necesidades diarias recomendadas de B1, B2, B6 y vitamina C, respectivamente [22].

Por tanto, el aguamiel podría reducir el riesgo de anemia y deficiencia de hierro por su contenido de vitaminas y minerales [22].

El aguamiel también contiene aminoácidos esenciales importantes como se muestra en la Tabla 3. Dentro de ellos se encuentran: ácido glutámico, lisina, isoleucina, leucina, metionina, valina y fenilalanina. La valina es un aminoácido necesario para el crecimiento y mantenimiento de los tejidos del cuerpo y la fenilalanina es utilizada en la producción de tirosina y tres hormonas importantes

(epinefrina, norepinefrina y tiroxina). Y algunos aminoácidos no esenciales como serina, prolina, treonina, alanina, tirosina e histidina. El contenido total de aminoácidos en 100 gramos de aguamiel es de 0.20 g [22].

El contenido total de fenol en el aguamiel es de 3.02 equivalentes de ácido gálico por gramo de aguamiel. Su actividad antioxidante por DPPH es de 8.72 capacidad antioxidante equivalente a trolox/ gramo de aguamiel (mayor actividad antioxidante que el zumo de naranja con 6.7 equivalente a trolox/g) [22].

Tabla 3. Contenido de aminoácidos esenciales en aguamiel por 100 gramos [22].

Aminoácidos esenciales	mg/100 gr
Ácido glutámico	20.08 mg
Valina	16.35 mg
Fenilalanina	10.03 mg

En la medicina tradicional mexicana el aguamiel ha sido considerado como remedio para evitar las infecciones en las heridas, los padecimientos renales y trastornos gastrointestinales. Se considera que parte de sus propiedades curativas es debido al microbioma presente en el aguamiel, el cual está compuesto por bacterias y levaduras con potencial probiótico y antimicrobiano [15].

En un estudio realizado por Arredondo [23], se lograron aislar 24 cepas bacterianas Gram-positivas distribuidas según su morfología en: bacilos (21%), cocos (8%), diplococos (33%), closters (17%) y tétradas (21%). De estos, un total de 16 resultaron tolerantes a 6.5%NaCl y 8 aislados tuvieron capacidad de crecer y reproducirse en un medio alcalino con un pH de 9.6. el 71% de estas cepas fueron capaces de fermentar los azúcares presentes (glucosa, sacarosa y lactosa). Durante este mismo estudio en la identificación taxonómica se determinaron 12 bácterias productoras de ácido láctico pertenecientes a los géneros *Leuconostoc spp, Lactococcus spp, Pediococcus spp, Enterococcus spp*, y 2 del género *Bacillus spp*. Estos géneros bacterianos identificados en este estudio forman parte del microbioma bacteriano habitual del aguamiel. Por tanto, este estudio concluye que el aguamiel es una fuente importante de bacterias productoras de ácido láctico

(BAL) y *Bacillus sp*, con capacidad fermentativa y un amplio rango de crecimiento bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y nutrientes, con potencial biotecnológico en la industria de alimentos y farmacéutica. Mencionando propiedades bioquímicas importantes como la descarboxilación de ornitina, actividad de la catalasa, desaminación de lisina y motilidad, las cuales podrían explicar el mecanismo de acción de dichos microorganismos.

Mediante el proceso de maduración del aguamiel surge una fermentación láctica y alcohólica que da como resultado la bebida alcohólica tradicional mexicana denominada pulque. La producción de polisacáridos extracelulares distingue al aguamiel, pues estos le confieren su viscosidad típica que depende completamente del tiempo de su maduración. En algunos estudios se nombra a *Leuconostoc mesenteroides* como la bacteria láctica responsable de la producción de exopolisacáridos de tipo dextrana a partir de sacarosa presente de aguamiel [(20)].

El pulque es una bebida obtenida de la fermentación de los azúcares presentes en el aguamiel extraído de diferentes especies de magueyes, como son*: Agave americana, A. atroviren, A. ferox, A. mapisaga y A. salmiana.* De esta bebida ha sido posible aislar cepas de microorganismos con actividad probiótica; microorganismos resistentes a las sales biliares, al pH ácido y a los jugos gástricos [(24)].

Los principales compuestos del aguamiel son azúcares como la sacarosa y la glucosa, los cuales se encuentran en mayor concentración cuando el estado de maduración del maguey esta entre los 7 y 8 años [(24)].

La fermentación de estos azúcares comienza en el centro del maguey gracias a la actividad del microbioma de este, con la ayuda de microorganismos autóctonos como levaduras, bacterias lácticas, bacterias productoras de etanol y bacterias productoras de exopolisacaridos. Su fermentación va de las 12 a las 48 horas cuando se encuentra en un recipiente que no contenga sustancias que inhiban los microorganismos mesofílicos presentes, a una temperatura de 25° [(21)].

Conforme pasa el tiempo de maduración del aguamiel, se comienzan a presentar cambios de gran importancia como un incremento en el porcentaje de alcohol y en la formación de exopolisacaridos [24].

Los agentes encargados de realizar la fermentación alcohólica, ácida y viscosa del aguamiel son levaduras, bacilos Gram positivos y bacilos Gram negativos [18].

El aguamiel contiene microorganismos de los géneros: *Lactobacilos*, capaces de incrementar la acidez láctica; *Leuconostoc (mesenteroides y dextraanicum)*, responsables de su nivel de viscosidad; *Saccharomyces carbajail sp*., siendo este un fermentador alcohólico; y *Pseudomonas lindneri*, principales productoras de etanol. Algunos de estos géneros microbianos presentan potencial probiótico [24].

A partir del aguamiel pueden ser recuperados algunos grupos microbianos como *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus (Lactobacillus acidophilus, L. hilgardi, L. plantarum)*; Proteobacterias como *Acetobacter pomorium;* Hongos levaduriformes como *Sacharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces sp* [21]. Estos grupos microbianos actúan por vía oral en la reducción de enzimas asociadas al desarrollo de algunas patologías como el cáncer gástrico, siendo estas nitrooreductasas, azoreductasas y glucoronidasas; tienen también un efecto antimicrobiano gracias a su producción de ácidos orgánicos, enzimas, bacteriocinas y competencia por nutrientes con los patógenos intestinales [21].

Los microorganismos con actividad probiótica tienen actualmente el interés de la comunidad científica por la importancia que han demostrado tener en la prevención y tratamiento de algunas problemáticas de salud. El aguamiel presenta una microflora con potencial probiótico que tiene ventajas actualmente sobre algunos probióticos presentes en diferentes productos comerciales [24].

Levaduras y bacilos gran positivos han sido reportados en estudios anteriores realizados por Escalante y colaboradores durante el año 2004, quienes identifican por análisis de ADNr 16S doce cepas, de las cuales 6 corresponden al género de *Lactobacillus,* bacterias ácido-resistentes y que en el caso de algunas especies ya

se ha demostrado su capacidad probiótica como es el caso de *L. Reuteri.* No fueron aisladas bacilos Gram negativos que pudieran indicar alguna contaminación de origen fecal [25].

El aguamiel es una bebida tradicional en la cultura mexicana, cuenta con propiedades que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas y estimula a su vez el crecimiento de la flora intestinal por lo que se le puede considerar como bebida probiótica ya que facilita la movilidad intestinal [16].

El aguamiel contiene fructooligosacáridos susceptibles a la fermentación colónica por los microorganismos presentes, los cuales son capaces de producir ácidos grasos de cadena corta, reducir niveles de lípidos y glucosa en sangre y disminuir a su vez la incidencia de lesiones gástricas. Estos ácidos grasos de cadena corta son detectados por receptores específicos de acoplamiento a proteínas G (GPR), los cuales están directamente involucrados en la regulación del metabolismo de los lípidos y la glucosa. Sin embargo, es bien conocido que el nivel de glucosa en plasma se determina por la absorción a través de los alimentos, gluconeogénesis y por la absorción por múltiples órganos [22].

El aguamiel es rico en hidratos de carbono, polisacáridos y fructanos como la inulina y los oligómeros de fructosa (FOS). Actualmente estos fructooligosacáridos en la industria alimentaria son utilizados como probióticos ya que son capaces de mejorar la microbiota intestinal gracias a su capacidad de modular la función intestinal y el tiempo de tránsito, así como su capacidad para activar el sistema inmunológico para aumentar la producción de ácido butírico y otros ácidos grasos de cadena corta, aumentan a su vez la absorción de minerales como el calcio y el magnesio e inhiben lesiones precursoras tanto de adenomas como carcinomas. Por tanto, por su actividad probiótica puede reducir los factores de riesgo que intervienen en el desarrollo de algunas patologías como las cardiovasculares, cáncer de colón y la obesidad [22].

Los FOS de cadena corta contenidos en el aguamiel tienen su fermentación en el colon proximal. Esta fermentación colónica conduce al crecimiento selectivo de bifidobacterias, mejor absorción de calcio y hierro, disminución del índice

glucémico y prevención del desarrollo del cáncer de colon. Las mayores concentraciones de ácidos grasos de cadena corta se encuentran por tanto en la parte proximal del colon y los principales son acetato, propionato y butirato [22].

El butirato cuenta con propiedades antiinflamatorias importantes gracias a la inhibición del factor nuclear Kappa B (NFkB) que controla la inflamación actuando como un factor de transcripción. El propionato a su vez posee la capacidad de inducir la hiper acetilación de las histonas las cuales son un tipo de proteína presente en los cromosomas, estas se unen al ADN y ayudan a dar forma a los cromosomas y a controlar la actividad de los genes [22].

El aguamiel al ser rico en azúcares y proteínas pasa a ser un sustrato nutricionalmente enriquecido que puede favorecer el crecimiento de poblaciones microbianas. Su consumo por si solo suple el papel del agua para la ingesta de personas y animales en algunas poblaciones del Valle del mezquital [18].

El contenido proteico en el aguamiel depende de la época de cosecha y especie utilizada de maguey, así como de las condiciones climáticas en que se efectúa la cosecha [25]. El consumo de aguamiel provee 50% del aporte proteico diario recomendado en comunidades que no tienen acceso a productos cárnicos y en algunas comunidades del Valle de México.

Los probióticos son microorganismos que surgieron en los años 60s. La palabra probiótico deriva de dos vocablos del latín, “pro” que significa “por” o “en favor de” y del griego “bios” que quiere decir “vida”, por tanto, el significado de la palabra es en pro de la vida o a favor de la vida [25].

Los probióticos son aquellos microorganismos vivos y compuestos que participan en el balance y en el desarrollo microbiano intestinal mediante diversos mecanismos; también reciben nombres como bioterapeuticos, bioprotectores o bioprofilácticos ya que se han utilizado en estudios como parte del método preventivo de infecciones entéricas y gastrointestinales. Pues tienen diversas funciones importantes que van desde la reducción de la colonización de patógenos, disminución y supresión de la producción de factores de virulencia, estimulación de

la respuesta inmunológica, hasta producción de compuestos con actividad antimicrobiana y antiviral en el intestino, bronquios, aparato genital urinario y glándulas mamarias, es decir que pueden tener efectos sobre las mucosas de manera general [25].

Los probióticos se clasifican en dos grupos [26]:

- Bacterianos: Corresponden los géneros de *Lactobacillus, Bifidobacterium, Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus y Bacillus* y cepas no patógenas de *E.coli* que compiten con su homólogo patógeno.
- Levadura: El único probiótico de tipo levadura que existe es *Saccharomyces boulardii.*

En una versión persa del antiguo testamento en el génesis ya se apuntaba que la longevidad de Abraham era debida al consumo de leche agria. Ya en el siglo 76 a.C el historiador romano Plinio recomendaba la administración de lácteos fermentados para tratar la gastroenteritis [26].

En 1908 el premio nobel Elie Metchnikoff atribuyó la longevidad de ciertas poblaciones balcánicas al consumo habitual de lácteos fermentados, que contenían lactobacilos que reducirían las toxinas producidas por las bacterias intestinales, promoviendo la salud y prolongando la vida [27].

El término prebiótico entonces hace referencia a los ingredientes que contienen los alimentos no digeribles que son capaces de estimular el crecimiento y la actividad de un tipo o de un número limitado de bacterias en el colon se manera selectiva. La ingestión de fructooligosacáridos e inulina presentes en el aguamiel, favorecen a las bifidobacterias de esta forma selectiva [27].

Los probióticos mejoran el equilibrio de la microbiota intestinal, reducen la severidad de la diarrea, previenen la diarrea asociada a antibióticos, reducen cualquier síntoma de intolerancia a la lactosa y del intestino irritable, estimulan el sistema inmune y mejoran la biodisponibilidad de los nutrientes, así como reducen el riesgo de cáncer de colon [26].

Para ser considerado un alimento probiótico, este debe ser no patogénico, no tóxico y resistente tanto a un pH bajo como a las sales biliares para con esto mejorar la sobrevivencia en el tracto gastrointestinal. La mayoría pertenece a dos géneros de bacterias productoras de ácido láctico*: Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, pero también se utilizan *Saccharomyces* y *Enterococcus* [15].

Gracias a su estudio en diversos trabajos, se han propuesto algunos probióticos para reducir el riesgo de cáncer de colon en animales de laboratorio pues existen pruebas en diferentes fuentes que apoyan fielmente la idea de que la microflora colónica interviene directamente en la etiología del proceso descontrolado de crecimiento celular o cáncer [15]. Los microorganismos probióticos son capaces de modificar la microflora pues aumentan el número de lactobacilos y bifidobacterias en el colon.

Las pruebas de que los probióticos influyen en la carcinogénesis se derivan de una serie de fuentes [15].

1. Efectos sobre las actividades enzimáticas bacterianas.
2. Efectos anti genotóxicos in vitro e in vivo.
3. Efectos sobre lesiones precancerosas en animales de laboratorio.
4. Efectos sobre la incidencia tumoral en animales de laboratorio.
5. Estudios epidemiológicos y experimentales en seres humanos.
6. Efectos de los probióticos sobre las actividades enzimáticas bacterianas.

La microflora presente en el colon es capaz de generar mutágenos, carcinógenos y promotores tumorales a partir de algunos precursores obtenidos por medio de la dieta o producidos de manera endógena. Por ejemplo, la enzima betaglucuronidasa, participa en la liberación de una serie de carcinógenos dietéticos en el colon a partir de su forma conjugada como los hidrocarbonos aromáticos policíclicos. Sin embargo, es necesario destacar en este punto que la hidrólisis del glucósido por la flora intestinal puede dar lugar a la generación de algunas sustancias anticarcinógenas y antimutagénicas potenciales en forma de flavonoides.

Se han utilizado probióticos en numerosos trabajos en modelos experimentales con resultados prometedores, pues se ha identificado en ellos un importante papel de la microflora intestinal en el metabolismo de los ácidos biliares (ácido cólico y quenodesoxicólico) en ácido desoxicólico y litocólico, los cuales se considera que poseen una actividad estimuladora tumoral. Existen también otros promotores importantes en el desarrollo de tumores, como el amoniaco, los fenoles y cresoles, los cuales también se generan por desaminación de aminoácidos como la tirosina, por bacterias intestinales.

Las especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* causan una reducción en las enzimas que participan en la formación y el metabolismo de los carcinógenos. Por tanto, el aumento de la proporción de bacterias acido lácticas en el intestino modificaría de manera benéfica los valores de enzimas metabolizadoras de xenobióticos. Se han realizado trabajos que tienen como objetivo adquirir mayores conocimientos sobre la forma en la que la administración de probióticos afectaría al metabolismo de la microflora intestinal [15].

Los probióticos en la práctica clínica presentan efectos metabólicos con gran relevancia, favorecen la absorción de agua y calcio, modulan a su vez el metabolismo lipídico, tienen un efecto directo en la masa fecal (prevención y tratamiento del estreñimiento), efectos protectores como en la prevención de infecciones intestinales y sistémicas debido a la traslocación bacteriana y prevención y control de la enfermedad inflamatoria intestinal y por tanto, reducción del riesgo de cáncer colorrectal [27].

Los probióticos también se han propuesto para el tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal por su efecto sobre el crecimiento de los lactobacilos y bifidobacterias ya que favorecen la producción de ácidos grasos de cadena corta, previenen la adherencia de las bacterias patógenas, favorecen la producción de antibióticos y el descenso del pH intraluminal [27].

Por tanto, los probióticos han demostrado tener un papel importante en la prevención de la diarrea asociada a antibióticos la cual es una complicación muy frecuente en el ámbito hospitalario. El uso de probióticos en esta patología se

plantea con el objetivo de reestablecer la microbiota intestinal, aumentar la respuesta inmunitaria, competir con las bacterias patógenas y retirar sus tóxinas. Con esto, asegurando una buena absorción y evitando el daño causado por los antibióticos, los cuales barren con la microbiota intestinal [27].

Existe un estudio randomizado en humanos, controlado frente a placebo con el uso de simbióticos que contenían oligofructosa, inulina, Lactobacillus y Bifidobacterium en 43 pacientes intervenidos de pólipos colónicos y 37 pacientes con cáncer de colon. Durante el estudio se obtuvieron muestras de heces y sangre antes, durante y después de la intervención, y se obtuvieron muestras de biopsia colorrectal antes y después de la intervención. Se examinó el efecto del consumo simbiótico sobre una batería de marcadores biológicos intermedios para el cáncer de colon. La intervención simbiótica mostró cambios significativos en la flora fecal: Aumento de Bifidobacterium y Lactobacillus y disminución de Clostridium perfringens. La intervención por otra parte redujo significativamente la proliferación colorrectal y la capacidad del agua fecal para indicar necrosis en las células del colon y mejorar la función de barrera epitelial en pacientes intervenidos por pólipos colónicos. Los ensayos de genotoxicidad de las muestras de biopsia de colon indicaron una exposición disminuida a las genotoxinas en los pacientes intervenidos con pólipos colónicos al final del periodo de intervención. El consumo de estos simbióticos por otra parte evitó el aumento de la secreción de interleucina 2 por las células mononucleares de sangre periférica en los pacientes con pólipos colónicos y aumentó a su vez la producción de interferón gamma en los pacientes con cáncer de colon. Por tanto, se demostró que además de mejorar la flora fecal también mejoraron diversos biomarcadores genéticos, celulares, inflamatorios e inmunológicos y con esto se logró reducir el riesgo teórico de cáncer de colon [27].

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla presentó el trabajo clínico controlado, doble ciego y placebo control sobre los efectos de una bebida simbiótica basada en aguamiel como tratamiento nutricional coadyuvante para el Síndrome del Intestino Irritable. Se evaluó en este estudio la combinación de una dieta restringida en sodio, tipo DASH y baja en FODMAP y raciones con una bebida simbiótica y su

efecto en síntomas gastrointestinales y calidad de vida en 26 pacientes con SII referidos de un hospital público de tercer nivel vs pacientes que recibieron una bebida placebo con dos cepas de bacterias ácido lácticas a 250 ml/día por un periodo de 28 días. Con base en el cuestionamiento IBSS (Irritable Bowel Syndrome Severity Score), al final del tratamiento ambos grupos mostraron reducción de la gravedad de los sangrados gastrointestinales en 73.81%, disminución del dolor en 71.31% y reducción de la distención abdominal en 56.96%. En este estudio, el beneficio global se atribuyó a la dieta DASH/ baja en FODMAP en combinación con el uso de aguamiel [28].

El efecto de las bacterias ácido-lácticas sobre la inducción de mutaciones mediante una amplia variedad de carcinógenos in vitro se ha estudiado utilizando la prueba de Ames. Los carcinógenos utilizados incluyen las sustancias *N*-nitrosas *N*-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) y N-metilnitrosourea (MNU), aminas heterocíclicas y aflatoxina B1. En conjunto, los resultados indican que diversas BAL inhiben la genotoxicidad de los carcinógenos dietéticos *in vitro* [15]. Sin embargo, el grado de inhibición depende completamente de la especie.

Por ejemplo, se demostró que *L. casei* y *L. lactis* inhibieron la actividad mutagénica de las sustancias nitrosadas de la carne de buey en más de un 85%, mientras que *L. confusus* y *L. sakei* carecieron de efecto [15]. Es probable que estos resultados son consecuencia de la unión de los mutágenos por las bacterias ácido lácticas, esta unión parece ser altamente dependiente del pH.

Los mismos investigadores utilizando la técnica de electroforesis en microgel de célula única (prueba Cometa) investigaron la capacidad de una serie de especies de BAL para inhibir la lesión del ADN en la mucosa del colon de ratas tratadas con los carcinógenos MNNG o 1,2-dimetilhidracina (DMH). Todas las cepas de lactobacilos y bifidobacterias examinadas como *L. acidophilus* (aisladas a partir del yogur), *L. gasseri*, *L. confusus*, *B. breve* y *B. longum*, previnieron la lesión del ADN inducida por MNNG cuando se administraron a una dosis de 10^{10} células/kg de peso corporal, 8 horas antes del carcinógeno. En la mayoría de los casos, la lesión del ADN se redujo hasta un nivel similar al de ratas no tratadas. *Streptococcus*

thermophilus no fue tan eficaz como las otras cepas de BAL. El efecto protector fue dependiente de la dosis: dosis de *L. acidophilus* que representaron un 50 y un 10% de la dosis original fueron menos eficaces en la disminución de la lesión del ADN inducida por MNNG. Y lo que es más importante todavía, el tratamiento por calor de *L. acidophilus* abolió su potencial antigenotóxico, lo que indica la importancia de las células viables. Se obtuvieron resultados similares cuando se examinaron cepas BAL en ratas a las que se administró DMH como agente lesionante de ADN. Una vez más, todos los lactobacilos y bifidobacterias inhibieron potentemente la lesión del ADN en la mucosa del colon, mientras que *S. thermophilus* fue mucho menos eficaz [(15)].

La prueba cometa también fue utilizada para evaluar el efecto de la lactulosa sobre la lesión del ADN en la mucosa del colon. Se alimentaron ratas con dieta que contenía 3% de lactulosa, a las cuales previamente se les había administrado DMH y demostraron una menor lesión del ADN en las células del colon en comparación con aquellas ratas alimentadas con una dieta a base de sacarosa. Demostrando que el grupo de ratas alimentadas con dieta a base de sacarosa presentó una lesión severa del ADN del 33% del total, comparado con el primer grupo de ratas con 3% de lactulosa que presentó un 12.6% del total. Estos resultados proporcionan pruebas de que tanto las BAL como los prebióticos producen efectos protectores frente a los estadios precoces del cáncer de colon. [(15)]

Los patrones epidemiológicos del cáncer de colon implican la dieta alta en carnes rojas como un factor de riesgo principal para el desarrollo de esta patología, a partir de esto se sugiere la idea que el alto consumo de productos lácteos fermentados aumenta el número de lactobacilos en la flora fecal y por tanto, contrarresta este factor de riesgo.

Como prueba de esta hipótesis Goldin y Gorbach investigaron el efecto de *L. acidophilus* sobre la incidencia de tumores de colon en ratas tratadas con DMH (1,2-dimetilhidracina) el cuál es un isómero cancerígeno que además actúa como agente metilante in vivo. Durante este estudio, se administraron 20 mg de diclorhidrato de 1,2-dimetilhidrazina / kg de peso corporal durante 20 semanas a ratas F344

endogámicas machos. Se demostró que las ratas que consumieron una dieta de carne de res que simulaba una dieta "occidental" tuvieron tasas más altas de cáncer de colon que las ratas alimentadas con granos (83% frente al 31%, respectivamente). Adicional a esta dieta tipo occidental, se proporcionó en la dieta de las ratas cultivos viables de *Lactobacillus acidophilus* luego que las ratas habían sido estimuladas con diclorhidrato de 1,2-dimetilhidrazina. La incidencia de cáncer de colon después de un período de inducción de 20 semanas fue menor en los animales que recibieron *L. acidophilus* (40% frente a 77% en los controles), pero no se distinguió ninguna diferencia en la incidencia después de un período de 36 semanas. Por lo tanto, los suplementos dietéticos de *L. acidophilus* parecen aumentar la latencia o el tiempo de inducción del cáncer de colon experimental [(15)].

Las bacterias ácido-lácticas y otras bacterias intestinales absorben o se unen de forma in vitro a diversos carcinógenos de origen alimentario, incluyendo las aminas heterocíclicas formadas durante la cocción de la carne, la toxina fúngica aflatoxina B1, benzopireno y el contaminante alimentario AF2. Esta absorción en diversos estudios parece ser un fenómeno físico, principalmente debido a un intercambio de cationes.

Haciendo referencia a este planteamiento se llevó a cabo un estudio en 11 individuos que como parte de su dieta durante 2 días consumieron hamburguesas fritas (fuente rica de mutágenos de tipo pirolisato detectables en la orina), al primer grupo se le administró leche con *Lactococcus* como control 2 días antes de los suplementos dietéticos de hamburguesas fritas hasta los 6 días después de su consumo y al segundo grupo se le administró *Lactobacillus acidophilus* en el mismo tiempo de exposición. Se logró observar una disminución de la excreción urinaria de mutágenos en un 50-70% y la excreción de mutágenos fecales también disminuyó en un 30%.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de colon es una afección global que tiene una incidencia anual de casi un millón de casos y una mortalidad de 500 000 casos, actualmente es la estirpe histológica maligna más frecuente y constituye más del 95% de los casos del adenocarcinoma. Es un problema de salud mundial, la neoplasia más frecuente del aparato digestivo y el tercer tumor de mayor incidencia.

En México el cáncer colorrectal ya constituye el primer lugar en frecuencia de los tumores del tubo digestivo. Cada año se diagnostican cerca de 15 mil nuevos casos de personas con cáncer de colon según lo mencionado por el Instituto Mexicano del Seguro Social en el año 2019, enfermedad que, al tratarse adecuadamente, permite la curación de 9 de cada 10 casos. Se estima que anualmente seis mil 500 personas mueren en México por esta causa.

La OMS estima que en el año 2030 los nuevos casos de cáncer de colon van a sobrepasar los 20 millones anuales. Sin embargo, se calcula que hasta el 50% de los casos pueden ser prevenibles mediante la adopción de hábitos saludables, sistemas de vacunación, diagnósticos y tratamientos oportunos, así como con el uso de probióticos y antioxidantes.

La mayoría de las personas al hablar de productos probióticos lo relacionan con productos lácteos fermentados y no considera otros elementos como los aminoácidos o azúcares del agave pulquero o maguey, siendo esta una especie que tiene como objetivo principal generar reacciones benéficas al intestino produciendo un alimento rico en cepas probióticas, minerales, vitaminas y fibra llamado aguamiel.

El patrón alimentario que llevan las comunidades en México presenta una transformación constante en términos de diversidad de productos y con eso una transgresión tanto de los hábitos y costumbres como de la calidad nutricional de las comunidades.

Aunado a los problemas de la falta de alimentos nutricionales que consume la población mexicana, varias comunidades rurales se encuentran en condiciones de marginalidad, debido a que también han perdido su tradición en el cultivo de productos agrícolas por el sencillo hecho de que ya no se consumen, siendo el raspado de maguey y producción de aguamiel uno de los principales.

En el año 1930 la superficie cultivada con magueyes era de 70 600 hectáreas, en el año 1950 de 47 500 y en el año 1970 de 22 600 hectáreas. Actualmente se encuentran sembradas solamente 3 mil 280 hectáreas de esta variedad de agave según SAGARPA en el año 2014. Repartidas en 26 estados de acuerdo con el Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2013, dentro de los principales Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y el Estado de México.

Esto muestra claramente una disminución de la superficie con maguey en el país. En el periodo del 2006 al 2014 el cultivo de maguey tuvo una reducción a solo algunos cientos de hectáreas cultivadas y la producción de aguamiel y pulque a miles de litros, anual según lo registrado por el Servicio de información agroalimentaria y pesca en el año 2014.

La cadena productiva de maguey pulquero comprende cinco eslabones: productor, tlachiquero, tinacalero, expendor/dueño de pulquería y consumidor2. De este modo forma parte de la economía básica a nivel familiar pues personas de comunidades rurales aún ven en esta planta el principal medio de subsistencia. Por tanto, la disminución en el consumo de aguamiel y cultivo de maguey afecta también de manera socioeconómica al país.

Actualmente se tiene una estimación de que más del 75% de la población mexicana que vive en regiones poco desarrolladas emplean este tipo de medicina para el cuidado de su salud y la de su familia. Sin embargo, el principal problema de esto es que hoy en día se desconocen aún las dosis para poder llevar un buen control con su uso sin poner en riesgo la calidad de vida y la salud de quienes la consumen, pues el contenido de muchas plantas puede variar según las condiciones genéticas de la tierra o ambientales. Por este motivo es esencial el estudio de la medicina tradicional de forma científica para establecer los procesos

de estandarización basándose en un metabolito que permita recetar estos compuestos herbolarios con bases firmes y seguras.

Al ser el aguamiel una bebida tradicional en la cultura mexicana considerada importante en la medicina tradicional, ya que cuenta con propiedades que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas y estimula a su vez el crecimiento de la flora intestinal, se le puede considerar como bebida probiótica ya que facilita la movilidad intestinal. Lo que nos lleva a la siguiente pregunta de investigación **¿El aguamiel de *Agave salmiana* tiene actividad anti proliferativa en células HCT15 de cáncer de colón?**

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad anti proliferativa del aguamiel de *Agave salmiana* en células HCT15 de cáncer de colon.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estandarizar las condiciones de las células HCT15 de cáncer de colon en cultivo celular.
2. Obtener aguamiel de *Agave salmiana* estéril por método de filtrado.
3. Evaluar la capacidad anti proliferativa del aguamiel de *Agave salmiana* en células HCT15 de cáncer de colon por el método de XTT.
4. Determinar la dosis de aguamiel de *Agave salmiana* con mayor actividad anti proliferativa en células HCT15 de cáncer de colon por método de XTT.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

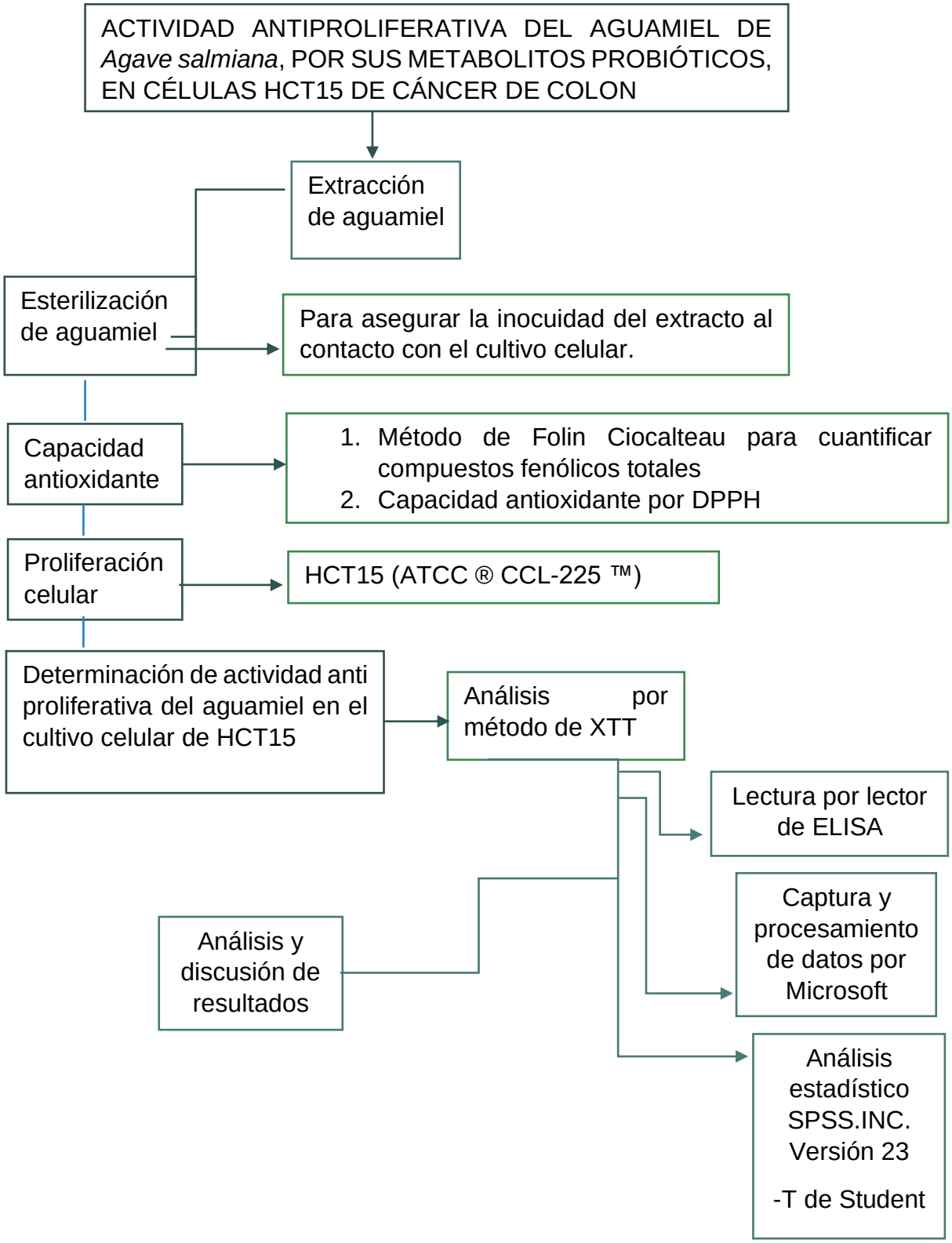
6.1 DISEÑO DE ESTUDIO

TIPO DE ESTUDIO	CARACTERÍSTICAS
Experimental	Por la intervención.
Analítico	Por el objetivo.
Prospectivo	Por los resultados.
Longitudinal	Por el tiempo.
Homodémico	Por la muestra.

6.2 UBICACIÓN ESPACIO – TEMPORAL

Los experimentos que componen en su totalidad el estudio se realizaron en el Laboratorio de Fisiología Celular de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Durante un periodo comprendido entre el mes de Septiembre al mes de Noviembre del año 2020.

6.3 ESTRATEGIA DE TRABAJO



6.4 MUESTRA

6.4.1 DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN

Para el cultivo celular se utilizó la línea celular HCT15 (ATCC ® CCL-225 ™) pertenecientes al tejido de colon de un organismo *Homo sapiens, humano,* con patología Dukes tipo C, adenocarcinoma colorrectal.

6.4.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA

6.4.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se seleccionaron células HCT-15 subcultivadas en caja T75 para contabilización y siembra de las mismas en placas de 96 pozos. Se utilizaron células en condiciones óptimas, sin datos de contaminación o muerte celular, adheridas, confluentes 85 – 90%, de forma poligonal, previamente incubadas a una temperatura de 37°C y 5% de CO_2.

6.4.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Durante el periodo del estudio se excluyeron células HCT15 con cambio en su morfología, aquellas que se encontraban en un medio no óptimo como caja fétida, con color amarillo oscuro o con medio contaminado.

6.4.2.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Se eliminaron del estudio aquellas células no diferenciadas o con datos de contaminación celular.

6.5 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICIÓN

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	VARIABLE	DEFINICIÓN NORMAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDADES
1. Estandarizar las condiciones de las células HCT15 en cultivo celular.	Cultivo celular	El cultivo celular es el proceso mediante el que células pueden cultivarse en condiciones controladas.	-Confluencia celular -Adherencia celular -Proliferación celular -Contaminación celular	CUALITATIVA DICOTÓMICA	0= CON 1=SIN
2. Obtener aguamiel de *Agave salmiana* estéril por método de filtrado.	Aguamiel	Liquido transparente proveniente del centro del maguey	-Color blanco transparente -Olor herbáceo -Viscosidad -Contaminación propia del proceso de raspado	CUALITATIVA DICOTÓMICA	0= CON 1=SIN
3. Evaluar la capacidad anti proliferativa del aguamiel de *Agave salmiana* en células HCT15 de cáncer de colon por método de XTT.	Capacidad anti proliferativa	Inhibición de la reproducción celular, especialmente de células cancerosas.	Muerte celular	CUANTITATIVA CONTÍNUA	Densidad óptica
4. Determinar la dosis de aguamiel de *Agave salmiana* con mayor actividad anti proliferativa en células HCT15 de cáncer de colon.	Capacidad antiproliferativa	Mayor grado de inhibición de la reproducción celular.	Muerte celular	CUANTITATIVA CONTÍNUA	nm

6.6 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

6.6.1 RECOLECCIÓN DE AGUAMIEL

En la recolección del aguamiel como materiales se utilizaron pipetas graduadas de 20 ml estériles, tubos falcon de 50 ml estériles para centrífuga y guantes. Para su transporte se hizo uso de hielera de unicel y para su almacenaje de congelador horizontal a una temperatura de -40°C.

La muestra de aguamiel fue recolectada de un plantío de maguey manso o de montaña (*Agave salmiana*) en la localidad de San Luis Atexcac, ubicada en el municipio de Guadalupe Victoria, en el estado de Puebla.

Figura 4. Plantío de maguey Manso o de Montaña (Agave salmiana). Fuente: Municipio Guadalupe Victoria. Villalobos, B.

Esta localidad se encuentra ubicada a una altura de 2415 metros sobre el nivel del mar y forma parte del valle de Libres-Oriental. Sus coordenadas se encuentran entre los paralelos 19° 13’ y 19° 24’ de latitud norte; los meridianos 97° 17’ y 97° 29’ de longitud oeste; altitud entre 2 400 y 3 400 m. Su clima es semiseco templado.

Se tomaron dos muestras de dos magueyes diferentes, recién capados y en producción posterior a la técnica de raspado tradicional, el Maguey A con 8 años de edad y el Maguey B con 12 años de edad.

Figura 6. Maguey A. 8 años de edad. Fuente: Municipio Guadalupe Victoria. Villalobos, B.

Figura 5. Maguey B. 12 años de edad. Municipio Guadalupe Victoria. Villalobos, B.

Durante el proceso de capado el señor Luis Hernández Pérez, encargado de la producción de aguamiel en el plantío, realizó un corte a cada penca de los magueyes seleccionados hasta dejar el centro o corazón del maguey libre. Posterior a este procedimiento, se realizó el proceso de raspado mediante un utensilio de madera, donde se raspó firmemente la pared de cada maguey hasta obtener un residuo o bagazo. El cuál, se retiró del centro a la periferia del maguey para obtener un corazón limpio y libre de residuos, como se muestra en las figuras 7 y 8.

Figura 8. Limpieza y extracción de residuos o gabazo del centro del maguey. Fuente: Municipio Guadalupe Victoria. Villalobos, B.

Figura 7. Desviramiento o capado de maguey. Fuente: Municipio Guadalupe Victoria. Villalobos, B.

Figura 9. Aguamiel exudado del centro del maguey. Fuente: Municipio Guadalupe Villalobos, B.

Después del raspado se dejó reposar al maguey durante 12 horas tapado con una penca mientras se conseguía la exudación del aguamiel.

A las 12 horas se continuó con el proceso de extracción del aguamiel presente en el centro del maguey. Durante esta etapa se extrajeron 50 ml de aguamiel de los magueyes A y B utilizando pipeta graduada de 20 ml para cada muestra y se colocaron inmediatamente en tubos falcon estériles de 50 ml previamente identificados con un marcador.

Posterior a esto se transportó en una hielera de unicel con el fin de mantener el aguamiel congelado hasta el laboratorio de Fisiología Celular de la Facultad de

Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla donde se mantuvo en un congelador horizontal a una temperatura de -40°C hasta su utilización.

6.6.2 VIABILIDAD CELULAR

Este proceso comenzó con la proliferación del cultivo celular de la línea HCT15 (ATCC ® CCL-225 ™) pertenecientes al tejido de colon de un organismo *Homo sapiens, humano,* con patología Dukes tipo C, adenocarcinoma colorrectal. Células cultivadas en medio de cultivo RPMI-1640 formulado por ATCC, ATCC 30-2001, con Suero Fetal Bovino (ATCC 30-2020) en una concentración de 10%.

El medio de cultivo para esta línea celular es RPMI-1640 formulado por ATCC, ATCC 30-2001. Agregando para su preparación Suero Fetal Bovino (ATCC 30-2020) en una concentración final del 5% y 1% de mezcla de antibiótico y antimicótico.

Para el cultivo celular los materiales que se utilizarán son: matraz, solución de tripsina al 0.25%-EDTA 0.53 mM, solución salina en amortiguaador de fosfatos pH 7.2 (PBS), tubos eppendorf, caja T75, micropipetas, pipetas graduadas estériles de 5 ml y 10 ml, incubadora de laboratorio en condiciones de 37°C y 5% de CO_2, campana de flujo laminar, centrífuga, guantes estériles, bata de laboratorio y cubrebocas.

Una vez proliferado el cultivo celular se inició el proceso de tripsinización y conteo celular con el fin de contabilizar el número de células totales y corroborar si son suficientes para iniciar este estudio experimental.

Durante este proceso se evaluaron células HCT-15 subcultivadas en caja T75 para contabilización y siembra de las mismas en placas de 96 pozos. Se observaron células en condiciones óptimas, sin datos de contaminación o muerte celular, previamente incubadas a una temperatura de 37°C y atmósfera húmeda con 5% de CO_2.

Se visualizó la caja T75 al microscopio y se observaron células adheridas, confluentes 85-90%, de forma poligonal. Listas para el proceso de tripsinización.

Durante este proceso se utilizó la tripsina como actor principal, la cuál es una enzima que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis (REF). Esta tripsinización en cultivos de células adherentes se usa para despegar las células de la superficie de las cajas de cultivo, y así poder tenerlas en suspensión para su posterior conteo. Si se tienen las células mucho tiempo en contacto con la tripsina se lisan las mismas, por esta razón se debe contrarrestar la acción de esta enzima usando medio de cultivo con suero fetal bovino (FBS).

Se inició este proceso de tripsinización preparando tripsina 1x (1 ml de solución Trypsin-EDTA 10x y 9 ml de solución salina en amortiguador de fosfato pH 7.2 (PBS) y posterior a esto, se siguieron los siguientes pasos:

1. Se retiró el medio de las células.
2. Se lavó la caja T75 con medio sin suplementar.
3. Una vez lavada la caja T75, se retiró el medio sin suplementar.
4. Se agregaron 4 mL de tripsina 1x y se incubó la caja por 3 minutos a 37°C.
5. Se observó la caja T75 con células ya despegadas de las paredes.
6. Se colocaron 8 ml de medio sin suplementar para la inactivación de la tripsina.
7. Se trasladaron las células de la caja T75 a un falcon de 25 ml, llevándolas a la centrífuga a 1500 rpm por 10 minutos.
8. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 5 ml de medio suplementado, homogenieizando.

6.6.3 CONTEO CELULAR

Durante el conteo celular los materiales que se utilizaron fueron cajas T75, microscopio electrónico, solución Trypsin-EDTA, Solución salinada tamponada con fosfato (PBS), azul de tripano, micropipetas, alícuotas, centrífuga, tubos eppendorf estériles, tubos falcon estériles y rejillas de recuento.

Una vez homogenizadas las células con el medio suplementado se colocan en un tubo eppendorf estéril 45 μl de solución salinada tamponada con fosfato (PBS) al 1x, 45 μl de azul de tripano y 10 μl de células. Se toman 10 μl de la mezcla

previamente homogeneizada y se colocan en una rejilla de recuento, se coloca en el microscopio y se enfoca a un objetivo de 10x.

El conteo celular se inició en el cuadrante superior izquierdo siguiendo las manecillas del reloj, contando en total 111 células en los 5 cuadrantes (41 células en el cuadrante 1, 33 células en el cuadrante 2, 17 células en el cuadrante 3, 11 células en el cuadrante 4 y 9 células en el cuadrante 5).

Una vez obtenido el número total de células observadas durante el conteo celular, se aplicó la siguiente fórmula:

Núm. células / Núm. cuadrantes contabilizados =____ x 10 (factor de dilución)
=____ x 10,000
=____ células en 1 ml x 10 ml
=____ células en 10 ml

Para determinar cuántas células hay en 1 ml se aplicó la siguiente fórmula: 5000 células x 1 ml (1000 μl) / Núm. de células en 10 ml (obtenidas previamente en la formula anterior).

Se realizó una dilución al 18x con el fin de obtener 5000 células en 32.4 μl. Posterior a esto se colocó esta cantidad en cada pozo de la caja de 96 pozos, con 100 μl de medio suplementado y se incubó la caja 24 horas a 37°C y 5% de CO_2.

6.6.4 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA POR MÉTODO DE XTT

Los materiales utilizados para el método de XTT fueron células de la línea celular HCT15 (ATCC ® CCL-225 ™) previamente cultivadas, pipetas graduadas, micropipetas, jeringa de 5 ml, filtros pirinola de 0.22 μm, caja de 96 pozos, medio de cultivo RPMI-1640 formulado por ATCC, ATCC 30-2001, tubos para centrífuga estériles de 15 ml, Electron Coupling Reagent, XTT Labeling Reagent, papel aluminio, incubadora a 37°C y con atmosfera de CO_2 al 5% y lector de ELISA.

Para comenzar con este método fue necesario descontaminar y esterilizar por medio de un método de filtración el aguamiel, esto con la finalidad de dejarlo libre de contaminación.

Para este procedimiento de obtención de aguamiel puro se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Descongelamiento de aguamiel obtenido durante el proceso de extracción previamente descrito.
- Una vez descongelada la muestra, se llevó a la centrífuga a 2,500 rpm durante 15 minutos, esto para eliminar elementos contaminantes grandes.
- Se retiró el sobrenadante, colocándolo en un nuevo tubo para centrífuga estéril. Este se llevó a la centrífuga a 1,500 rpm durante 5 minutos.
- El sobrenadante se lleva a un proceso de filtrado en una campana de flujo laminar previamente estéril.
    - Filtración de aguamiel por medio de un filtro pirinola estéril con poro 0.22 μm en una campana de flujo laminar, colocándolo finalmente en un nuevo tubo para centrífuga estéril de 50 ml. Con ayuda de jeringa de 5 ml.

Una vez purificado el aguamiel, se utilizó para determinar su efecto anti proliferativo. Por medio del método de XTT. El cuál es un método colorimétrico basado en la utilización de sales de tetrazolio, las cuales se han utilizado ampliamente como reactivos de detección en estudios de biología celular. Este método puede utilizarse eficazmente en determinación de proliferación celular, citotoxicidad y ensayos de apoptosis.

El ensayo de XTT se describió por primera vez en 1988 por Scudiero et al. Como un método efectivo para medir el crecimiento celular y la sensibilidad a ciertos componentes de los medicamentos o principios activos en células de líneas tumorales pues actúa por medio de un sistema capaz de medir fácilmente el grado de células vivas para los medicamentos o compuestos activos.

La sal de tetrazolio (XTT) es un compuesto incoloro o ligeramente amarillo que al ser añadida al medio se convierte en cristales de formazán por acción de la oxidorreductasa mitocondrial que está activa sólo en las células vivas. Cuando la sal de tetrazolio (XTT) se convierte en cristales de formazán, el pigmento cambia a

naranja brillante, esta diferencia de color se usa específicamente para ver efectos como la proliferación celular y la citotoxicidad.

En general, se pueden usar un mínimo de 5000 células de manera efectiva para la realización de este ensayo con un tiempo de incubación de 4 horas. Esto para detectar las diferencias metabólicas en la actividad del cultivo celular. Siempre debe utilizarse la técnica aséptica, es decir, se deben mantener las condiciones estériles durante la realización de este ensayo.

Finalmente, el resultado se debe medir usando un lector de ELISA y se puede determinar por la diferencia en los valores de absorbancia medidos a longitudes de onda de 500 nm y 550 nm.

Tomando en cuenta el fundamento y las características de este ensayo se decidió utilizarlo en este estudio. Comenzando con la adición del aguamiel purificado al cultivo celular.

Para la adición del aguamiel ya purificado al cultivo celular previamente incubado 24 horas en una caja de 96 pozos como se mencionó en el apartado de cultivo celular, se comenzó haciendo el retiro del medio de cultivo en cada pozo de la placa de 96 pozos y se agregó el principio activo en un experimento por duplicado, de la forma que se muestra en el siguiente esquema.

	Grupo control	Relación Principio activo / Medio de cultivo (unidades en microlitro)										
	0/200	10/190	20/180	30/170	40/160	50/150	60/140	70/130	80/120	90/110	100/100	110/90
Aguamiel A	0x	10x	20x	30x	40x	50x	60x	70x	80x	90x	100x	110x
Aguamiel A	0x	10x	20x	30x	40x	50x	60x	70x	80x	90x	100x	110x
Aguamiel B	0x	10x	20x	30x	40x	50x	60x	70x	80x	90x	100x	110x
Aguamiel B	0x	10x	20x	30x	40x	50x	60x	70x	80x	90x	100x	110x

Una vez pasadas 24 horas se retiró de la caja todo el contenido líquido de cada pozo y se agregó a cada uno 100 μl de medio suplementado. Y se realizó la

preparación de XTT en un falcón de 15 ml cubierto con papel aluminio, esto con la finalidad de evitar la foto exposición. Colocando 50 μl de Electron coupling reagent en 1 ml de XTT labeling reagent, homogeneizando la muestra.

Se colocó en cada pozo 50 μl de preparación de XTT para completar un total de 150 μl por pozo. Finalmente se leyeron los resultados por Técnica de ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas) por lector de ELISA a una absorbancia de 500 nm y 550 nm.

7. RESULTADOS

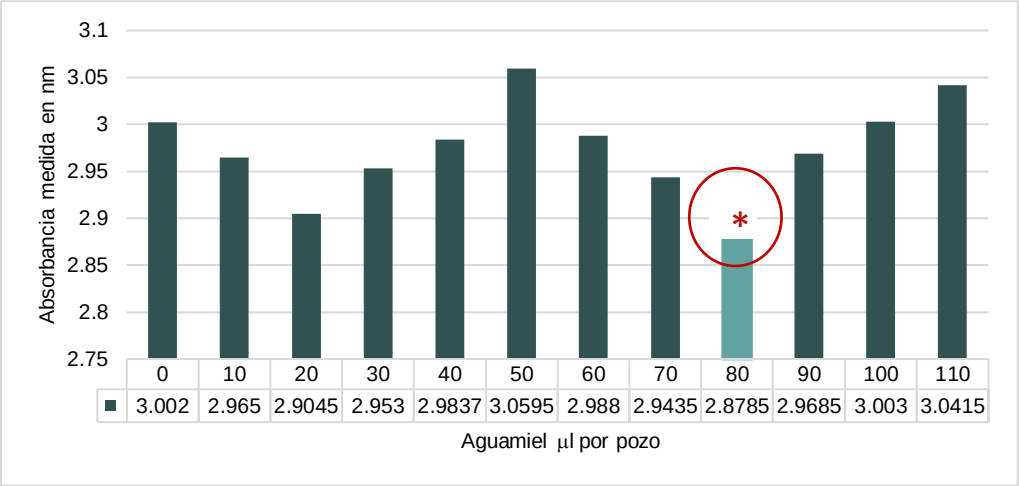
7.1 DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LÍNEA HCT15 EN CONTACTO CON AGUAMIEL POR MÉTODO COLORIMÉTRICO XTT

El término antiproliferativo hace referencia a aquellas sustancias que son capaces de inhibir la reproducción celular, especialmente de células cancerosas.

En este trabajo de tesis se buscó medir el efecto del aguamiel sobre la proliferación celular de la línea de cáncer de colon HCT15. Esto se realizó mediante el método colorimétrico de XTT. Por tanto, las células HCT15 pertenecientes a cáncer de colon, clasificación Dukes C, se estimularon con diferentes concentraciones de aguamiel de *Agave salmiana*. Con el fin de evaluar por el método colorimétrico XTT si el aguamiel afecta de manera directa la proliferación de la línea celular.

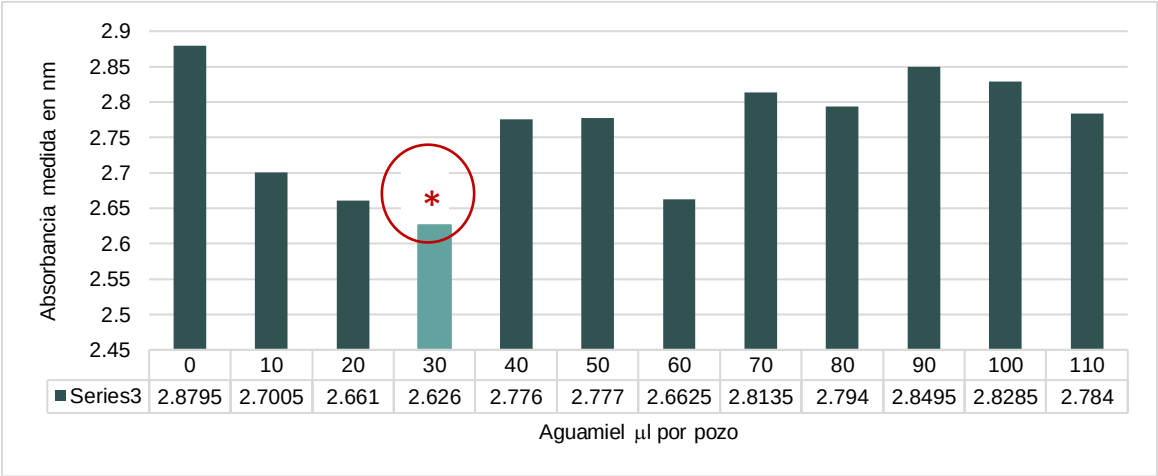
En la gráfica 1 se muestra el comportamiento de las absorbancias a 500 nm por medio del lector de ELISA del aguamiel perteneciente al Maguey A en contacto con las células HCT15. En la primer barra se muestra el control celular (sin aguamiel) con una absorbancia de 3.00 ± 0.08, el cual indica la absorbancia dada únicamente por las células HCT15. En las siguientes barras (2 a 12) se indican los promedios de absorbancias de las células HCT15 en contacto con diferentes concentraciones de este aguamiel (10 hasta 110 μl). Indicando una mayor disminución en la barra número 9 que pertenece a 80 μl de aguamiel en ese pozo, con una absorbancia de 2.87 ± 0.02.

Gráfica 1. Actividad antiproliferativa del aguamiel de Agave salmiana (A) en células HCT15 por método de XTT.



En la gráfica 2 se muestra el comportamiento de las absorbancias a 500 nm por medio del lector de ELISA del aguamiel perteneciente al Maguey B en contacto con las células HCT15. En la primer barra se muestra el control celular (sin aguamiel) con una absorbancia de 2.87 ± 0.02, el cual indica la absorbancia dada únicamente por las células HCT15. En las siguientes barras (2 a 12) se indican los promedios de absorbancias de las células HCT15 en contacto con diferentes concentraciones de este aguamiel (10 hasta 110 µl). Indicando una mayor disminución en la barra número 4 que pertenece a 30 µl de aguamiel en ese pozo, con una absorbancia de 2.62 ± 0.01.

Gráfica 2. Actividad antiproliferativa del aguamiel de Agave salmiana (B) en células HCT15 por método de XTT.



7.2 VIABILIDAD CELULAR DE LÍNEA HCT15 EN CONTACTO CON AGUAMIEL POR MÉTODO COLORIMÉTRICO XTT

Tomando en cuenta las gráficas 1 y 2 de absorbancias de XTT. Se calculó la viabilidad celular de la línea HCT15 en contacto con aguamiel de *Agave salmiana*. Definiendo a la viabilidad como la proporción de células vivas luego del contacto con aguamiel, por medio del ensayo de XTT.

Para calcular esta proporción se realizó la determinación de la concentración de compuestos fenólicos totales por volumen de aguamiel.

Para lo cual fue necesario determinar la densidad del aguamiel, la densidad por medio de un densitómetro, calculando para el aguamiel perteneciente al Maguey A una densidad de 1.001 $g.L^{-1}$ y para el perteneciente al Maguey B una densidad de 1.002 $g.L^{-1}$.

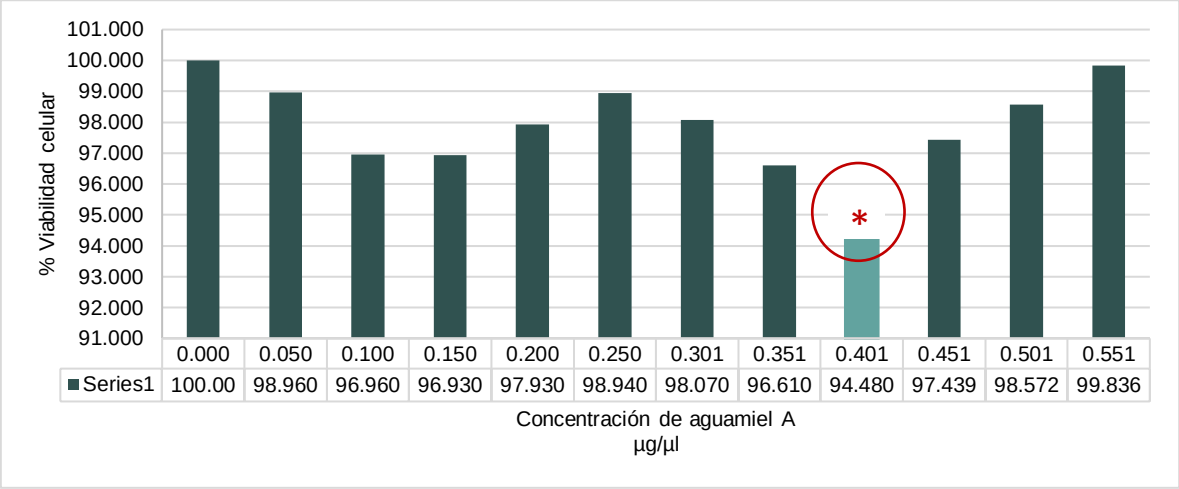
Posterior a la determinación de la densidad se realizó el cálculo de concentración de aguamiel por cada pozo según la dosis colocada en cada pozo de la placa (0 a 110 μl, en incremento de 10 en 10 μl por pozo) como se indica en la metodología. Finalmente se calculó porcentaje de viabilidad según la concentración de aguamiel por pozo y se graficó de la siguiente forma.

En la tabla 4 correspondiente a la viabilidad celular de la línea HCT15 en contacto con aguamiel del Maguey A. Se observa un pico mínimo de absorbancia en una dosis de 80 μl, el cual indica la mayor actividad antiproliferativa sobre las células HCT15 en contacto con una concentración de 0.401 µg/µl de aguamiel. Teniendo una viabilidad correspondiente al 94.48%, por tanto una disminución del 5.52% en la viabilidad celular (3.04 ± 0.01 vs 2.87 ± 0.01, $p<0.05$), como se muestra en la grafica 3.

Tabla 4. Viabilidad celular de HCT15 en contacto con aguamiel de Maguey A.

DOSIS DE AGUAMIEL ml	CONCENTRACIÓN AGUAMIEL MAGUEY A	VIABILIDAD AGUAMIEL MAGUEY A	% VIABILIDAD AGUAMIEL MAGUEY A
0	0	3.0465 ± 0.0134	100
10	0.0500838	3.0150 ± 0.0438	98.96602659
20	0.1001676	2.9540 ± 0.0650	96.96372887
30	0.1502514	2.9530 ± 0.0820	96.93090432
40	0.2003352	2.9837 ± 0.0363	97.93861809
50	0.250419	3.0145 ± 0.0078	98.94961431
60	0.3005028	2.9880 ± 0.0933	98.07976366
70	0.3505866	2.9435 ± 0.0177	96.61907107
80	0.4006704	2.8785 ± 0.0191	94.48547514
90	0.4507542	2.9685 ± 0.0219	97.43968488
100	0.500838	3.0030 ± 0.1131	98.57213195
110	0.5509218	3.0415 ± 0.0092	99.83587724

Gráfica 3. Viabilidad celular de HCT15 en contacto con aguamiel de Maguey A por método de XTT.

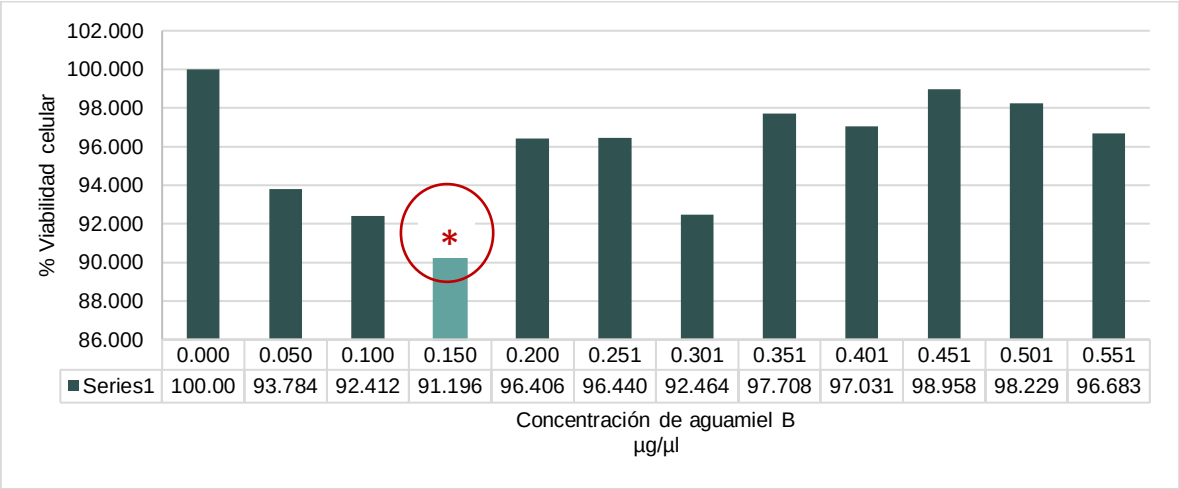


En la tabla 5 correspondiente a la viabilidad celular en contacto con aguamiel del Maguey B. Se observa un pico mínimo de absorbancia en una dosis de 30 µl, el cual indica la mayor actividad antiproliferativa sobre las células HCT15 en contacto con una concentración de 0.150 µg/µl de aguamiel. Teniendo una viabilidad correspondiente al 91.16%, por tanto una disminución del 8.84% en la viabilidad celular (2.87 ± 0.02 vs 2.62 ± 0.01, $p<0.05$). Como se muestra en la gráfica 4. Siendo mayor el efecto en este aguamiel Maguey B que en el de Maguey A (2.62 ± 0.01 vs 2.87 ± 0.01, $p<0.05$).

Tabla 5. Viabilidad celular de HCT15 en contacto con aguamiel de Maguey B.

DOSIS DE AGUAMIEL µl	CONCENTRACIÓN AGUAMIEL MAGUEY B	VIABILIDAD AGUAMIEL MAGUEY B	% VIABILIDAD AGUAMIEL MAGUEY B
0	0	2.8795 ± 0.0262	100
10	0.05012	2.7005 ± 0.0120	93.78364299
20	0.10024	2.6610 ± 0.0368	92.41187706
30	0.15036	2.6260 ± 0.0141	91.19638826
40	0.20048	2.7760 ± 0.0155	96.40562598
50	0.2506	2.7770 ± 0.0169	96.44035423
60	0.30072	2.6625 ± 0.0134	92.46396944
70	0.35084	2.8135 ± 0.0643	97.70793541
80	0.40096	2.7940 ± 0.0410	97.0307345
90	0.45108	2.8495 ± 0.0459	98.95815246
100	0.5012	2.8285 ± 0.0898	98.22885918
110	0.55132	2.7840 ± 0.0382	96.68345199

Gráfica 4. Viabilidad celular de HCT15 en contacto con aguamiel de Maguey B por método de XTT.



Como se puede apreciar en ambas gráficas, el aguamiel de *Agave salmiana* presenta actividad antiproliferativa sobre las células HCT15.

7.3 DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LINFOCITOS HUMANOS EN CONTACTO CON AGUAMIEL POR MÉTODO COLORIMÉTRICO XTT

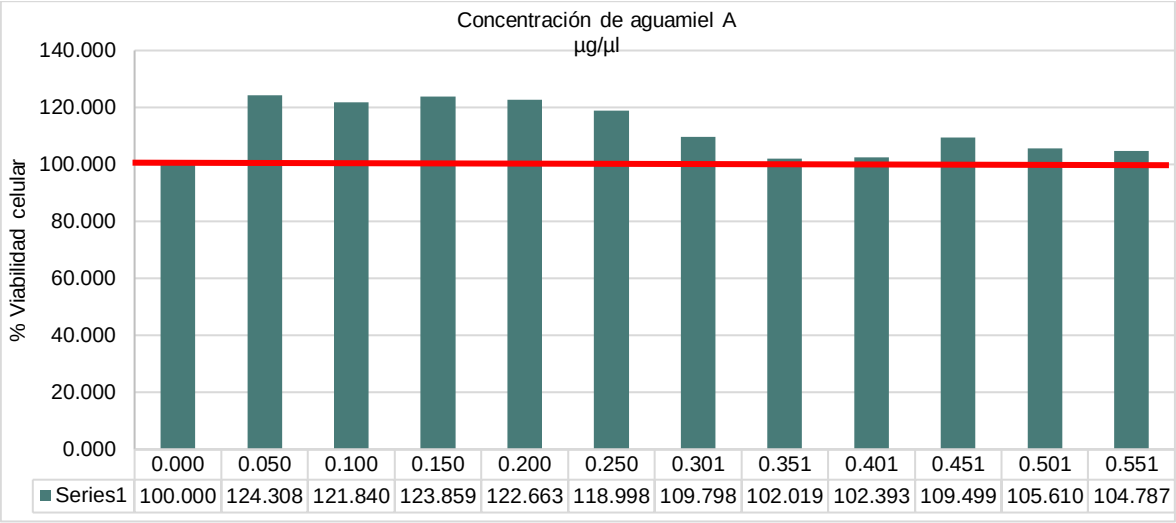
Los linfocitos son células inmunitarias elaboradas en la médula ósea, presentes en sangre y tejido linfático.

Con la finalidad de evaluar la actividad antiproliferativa del aguamiel sobre células sanas. Se realizó la determinación por método colorimétrico XTT, estimulando Linfocitos humanos con diferentes dosis de aguamiel de *Agave salmiana*.

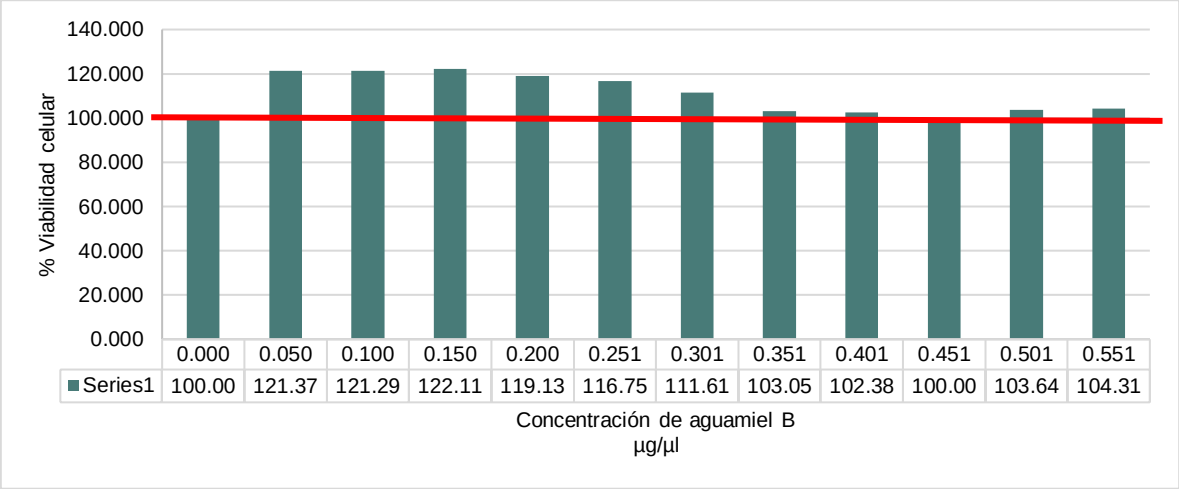
En la gráfica 5 correspondiente a la viabilidad celular de Linfocitos humanos en contacto con aguamiel del Maguey A. Se observa un pico máximo de absorbancia en una dosis de 10 µl, el cual indica que existe una actividad proliferativa sobre los linfocitos humanos al estar en contacto con una concentración de 0.0500 µg/µl de aguamiel. Teniendo una viabilidad correspondiente al 124.31%, por tanto un aumento del 24.31% en la viabilidad celular. Sin embargo, aunque en esta dosis se encuentra el pico máximo, se logra observar que en ninguna de las dosis existe una disminución celular, por el contrario, siempre se mantiene por encima del 100% inicial. Lo que comprueba que el aguamiel A no presenta actividad antiproliferativa sobre las células sanas del cuerpo humano.

En la gráfica 6 correspondiente a la viabilidad celular de Linfocitos humanos en contacto con aguamiel de Maguey B. Se observa un pico máximo de absorbancia en una dosis de 30 ml, el cual indica que existe una actividad proliferativa sobre los linfocitos humanos al estar en contacto con una concentración de 0.1503 µg/µl de aguamiel. Teniendo una viabilidad correspondiente al 122.11%, por tanto un aumento del 22.11% en la viabilidad celular. Sin embargo, aunque en esta dosis se encuentra el pico máximo, se logra observar que en ninguna de las dosis existe una disminución celular, por el contrario, siempre se mantiene por encima del 100% inicial. Lo que comprueba que el aguamiel B. tampoco presenta actividad citotóxica sobre las células sanas del cuerpo humano.

Gráfica 5. Viabilidad de linfocitos humanos en contacto con aguamuel de Maguey A.



Gráfica 6. Viabilidad celular de linfocitos humanos en contacto con aguamiel de Maguey B.



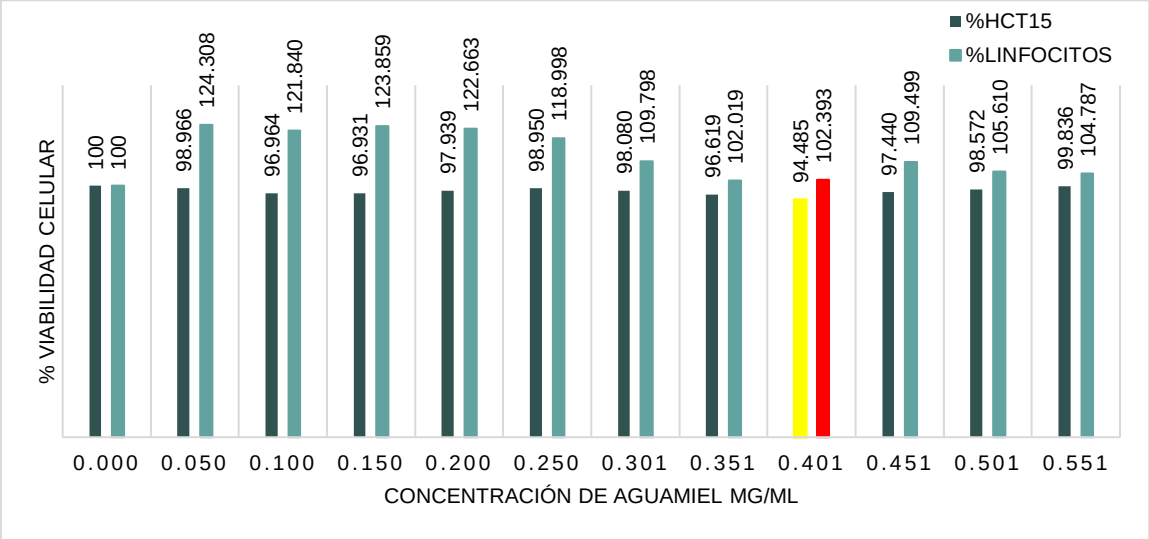
Como se puede apreciar en ambas muestras, el aguamiel de *Agave salmiana* presenta una actividad proliferativa sobre las células sanas del cuerpo humano, sugiriendo que este compuesto es de citotoxicidad nula sobre linfocitos sanos.

7.4 RELACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE HCT15/LINFOCITOS HUMANOS EN CONTACTO CON AGUAMIEL POR MÉTODO COLORIMÉTRICO XTT.

En la gráfica 7 se muestra la relación de la viabilidad entre linfocitos humanos y células de la línea HCT15 en contacto con aguamiel de Maguey A, a la misma dosis y concentración. Observando que en la dosis de 80 µl, correspondiente a la concentración de 0.40096 µg/µl de aguamiel existe un aumento del número de

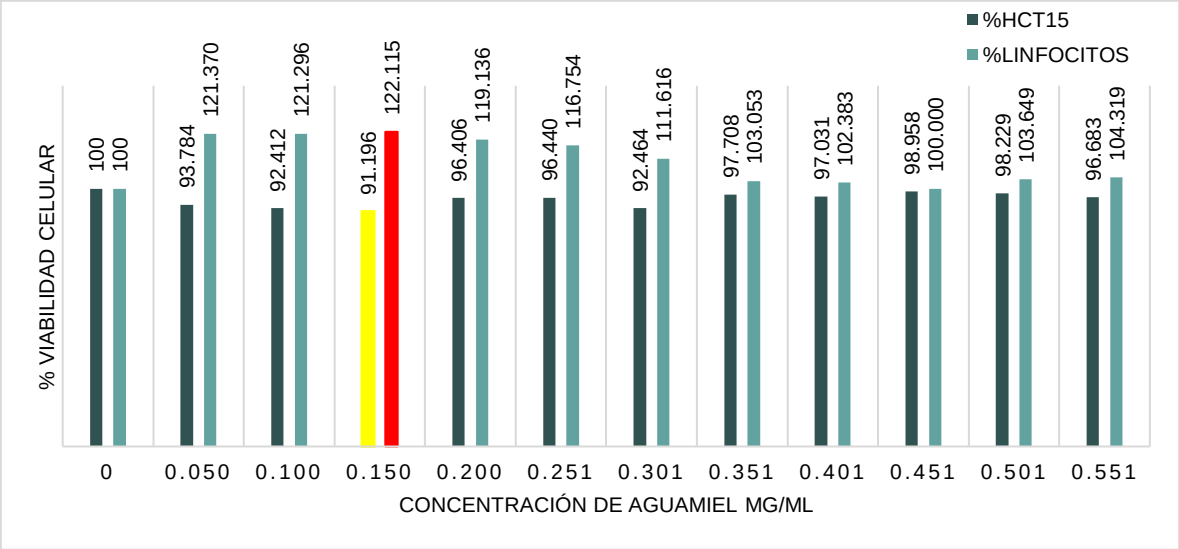
células vivas en un 2.39% por encima del control, a la par que existe una disminución en la proliferación celular de las células tumorales de la línea HCT15 en un 5.52%. Sin embargo, en la dosis de 10 µl existe la mayor proliferación de linfocitos humanos teniendo un aumento del 124.30% y a la vez una actividad antiproliferativa sobre las HCT15.

Gráfica 7. Relación de la viabilidad celular de HCT15/Linfocitos humanos en contacto con aguamiel de Maguey A.



En la gráfica 8 se muestra la relación de la viabilidad entre linfocitos humanos y células de la línea HCT15 en contacto con aguamiel de Maguey B, a la misma dosis y concentración. Observando que, en la dosis de 30 µl, correspondiente a la concentración de 0.1503 µg/µl de aguamiel existe un aumento del número de células vivas en un 22.11 % por encima del control, a la par que existe una disminución en la proliferación celular de las células tumorales de la línea HCT15 en un 8.81%. En este caso, se encuentra relación entre la dosis con mayor actividad antiproliferativa en células tumorales y la mayor actividad proliferativa en células sanas.

Gráfica 8. Relación de la viabilidad celular de HCT15/Linfocitos humanos en contacto con aguamiel de Maguey B.



7.5 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN EL AGUAMIEL DE *Agave salmiana* POR MÉTODO DE FOLIN – CIOCALTEAU

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que se encuentran principalmente en los alimentos de origen vegetal e interfieren directamente en el crecimiento y reproducción de las plantas, así como en procesos de defensa contra algunos agentes patógenos o radiación ultravioleta. Esta actividad biológica se relacionada con su carácter antioxidante, debido a la habilidad que tienen para quelar metales y secuestrar radicales libres y por tanto se han utilizado en la prevención de algunas patologías como el cáncer.

La concentración de estos compuestos fenólicos en las plantas o los extractos provenientes de ellas es muy variable ya que no solo depende de la variedad de la planta, sino también del grado de maduración y condiciones climáticas de la planta.

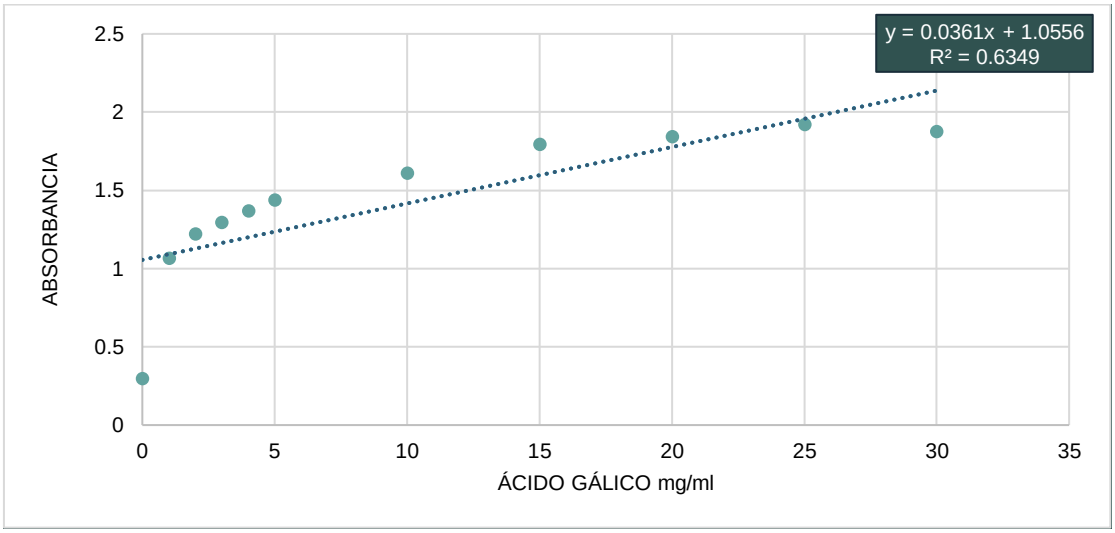
Este método se utiliza para medir el contenido de compuestos fenólicos totales en productos de origen vegetal y está basado en que los compuestos fenólicos son capaces de reaccionar con el reactivo de Folin – Ciocalteau a un pH básico, dando lugar a una coloración azul que es susceptible a ser determinada

espectofotométricamente a una absorbancia de 765 nm en base a una curva de calibración del ácido gálico.

En este estudio se determinó la cantidad de compuestos fenólicos totales con el fin de determinar la actividad antioxidante del aguamiel y asegurar con esto su capacidad antioxidante es decir de captar radicales libres y determinar la actividad antiproliferativa con respecto a la concentración de compuestos fenólicos totales por volumen de aguamiel y dar mayor peso a los resultados de esta tesis.

A partir de los valores de absorbancias obtenidos de cada concentración de ácido gálico se construyó la curva de calibración que se muestra en la gráfica 9.

Gráfica 9. Curva de calibración del ácido gálico para la determinación de compuestos fenólicos totales por método de Folin - Coicalteau.



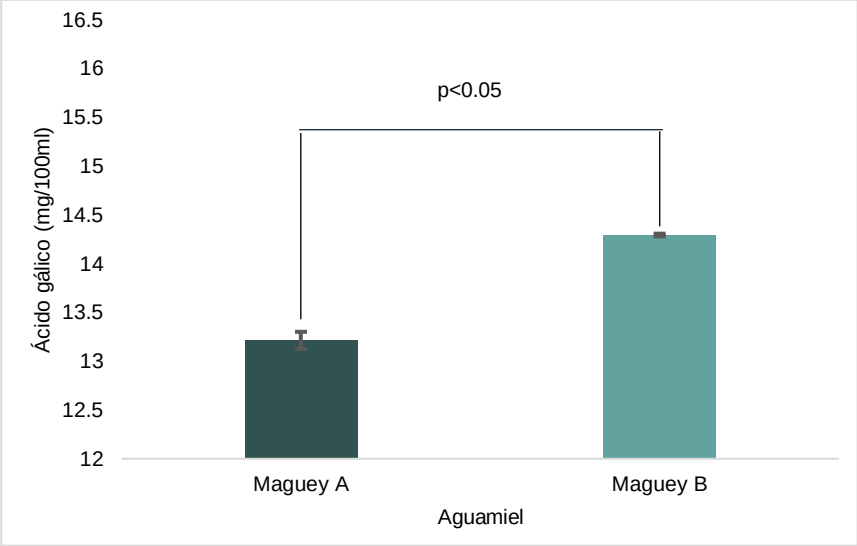
El contenido total de compuestos fenólicos para el aguamiel se muestra en la Tabla 6 y se expresa en la segunda columna como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de aguamiel. En la tercera columna se muestra el contenido de ácido gálico en 100 ml de aguamiel. Mismos resultados que se exponen en la gráfica 10.

Comprobando con esto que el Aguamiel de Maguey B tiene significativamente mayor cantidad de compuestos fenólicos totales comparado con el Maguey A (14.3 ± 0.01 vs 13.2 ± 0.08, $p<0.05$).

Tabla 6. Contenido de compuestos fenólicos totales en aguamiel.

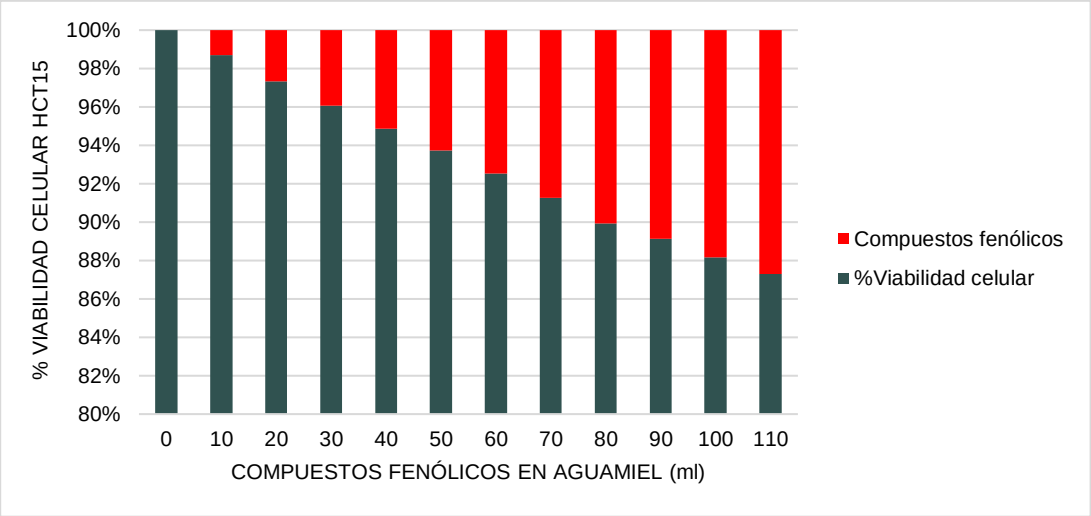
Aguamiel	Fenoles totales (mg/Eq de ácido gálico)	Ácido gálico (mg) en aguamiel (100 ml)
Maguey A	66.06	13.21
Maguey B	71.48	14.29

Gráfica 10. Contenido de compuestos fenólicos totales en ambas muestras de aguamiel.

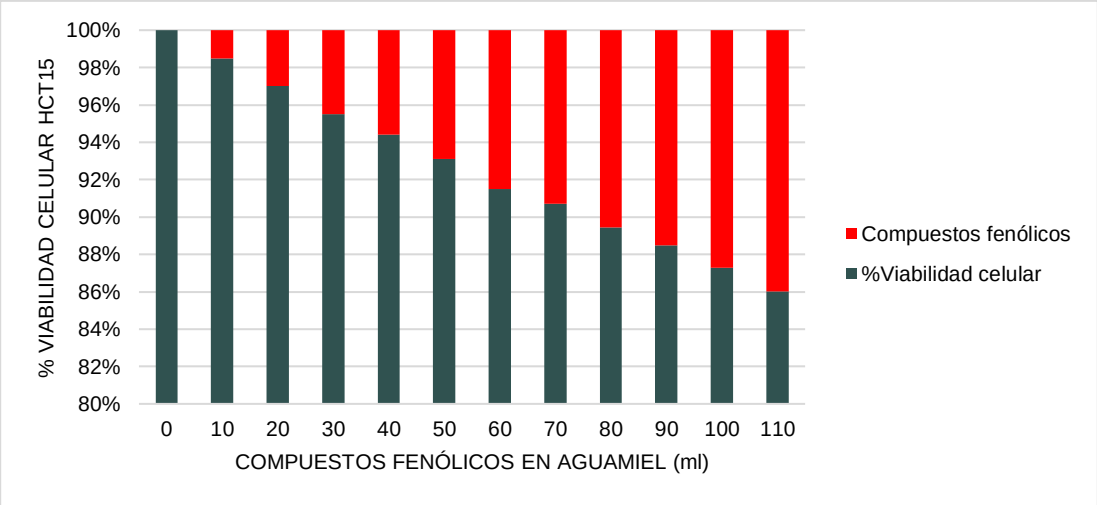


En las siguientes gráficas 11 y 12 se muestra la relación existente entre la viabilidad celular de la línea HCT15 en contacto con aguamiel y su contenido de compuestos fenólicos totales. En ambas se observa el mismo efecto dónde al aumentar la cantidad de compuestos fenólicos totales disminuye también el porcentaje de viabilidad celular. Por tanto, se relaciona el contenido de compuestos fenólicos con la actividad antiproliferativa del aguamiel de *Agave salmiana.*

Gráfica 11. Viabilidad celular de HCT15 vs Concentración de compuestos fenólicos totales del aguamiel de Maguey A



Gráfica 12.Viabilidad celular de HCT15 vs Concentración de compuestos fenólicos totales del aguamiel de Maguey B



8. DISCUSIÓN

El *Agave salmiana* es una especie de maguey resistente a sequías y se adapta con facilidad a otros climas y tipos de suelo, según la literatura crece en un clima semiseco y frío. Se cultiva entre 1200 y 2500 metros de altitud en regiones con lluvias [18], principalmente en zonas áridas y semiáridas [16].

La muestra de aguamiel fue recolectada de un plantío de maguey manso o de montaña (*Agave salmiana*) en la localidad de San Luis Atexcac, ubicada en el municipio de Guadalupe Victoria, en el estado de Puebla. Esta localidad se encuentra ubicada a una altura de 2,415 metros sobre el nivel del mar. Con clima semiseco templado. Corroborando así las características de plantación propias de la especie.

La madurez de la planta va de los 10 a los 14 años [16]. Por este motivo en este estudio se decidió tomar la muestra de dos magueyes de diferentes edades, con la finalidad de analizar el efecto que tuviera cada muestra en diferentes tiempos de maduración. Tomando la primera muestra denominada durante el trabajo como Maguey A con 8 años y por tanto encontrándose en una etapa inmadura y una segunda muestra denominada como Maguey B con 12 años de edad y por tanto encontrándose en una edad correcta de maduración según lo indicado en la literatura.

La vida útil del aguamiel es de aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente, debido a su alta susceptibilidad a la fermentación. Pues una vez fermentado éste aumenta su viscosidad y recibe el nombre de pulque, el cuál es una bebida tradicional mexicana. Por este motivo una vez recolectadas las muestras, éstas se transportaron en una hielera de unicel con el fin de mantener el aguamiel congelado, evitando su fermentación.

El cáncer ocurre cuando existe un crecimiento descontrolado de células [1]. Este desorden implica cambios en la proliferación, diferenciación y desarrollo celular. En este trabajo se buscó observar el efecto antiproliferativo sobre la línea celular HCT15 al estar en contacto con aguamiel de *Agave salmiana*. Determinando si las células al estar en contacto con el aguamiel eran capaces de inhibir su reproducción celular con la finalidad de presentar el producto como un alimento funcional en la prevención y tratamiento coadyuvante del cáncer de colon tanto en la parte pronóstica como profiláctica de la enfermedad pues actualmente el cáncer colorrectal tiene una tasa de mortalidad e incidencia relevante en nuestro país y en el mundo.

En México el cáncer colorrectal ya constituye el primer lugar en frecuencia de los tumores del tubo digestivo [9]. Cada año se diagnostican cerca de 15 mil nuevos casos de personas con cáncer de colon [12], enfermedad que, al tratarse adecuadamente, permite la curación de 9 de cada 10 casos. De este modo intervenir con un alimento funcional derivado de una planta mexicana como lo es el aguamiel en las etapas tempranas de la enfermedad ayudando a las células a frenar su reproducción podría ser esencial en el tratamiento de la patología.

Actualmente un factor de riesgo importante para el desarrollo de esta patología es la alimentación. Se cree que una dieta rica en fibra, minerales, vitaminas, probióticos y antioxidantes sería por tanto el principal factor preventivo para el desarrollo del cáncer.

El aguamiel contiene 10.2 gramos de fibra soluble en forma de fructooligosacáridos (FOS). El organismo no puede digerir los FOS pero estos si son usados como sustrato energético por las bacterias colónicas, por tanto que el aguamiel contenga cantidades de estos oligosacáridos nos indica teóricamente que cuenta ya con efectos positivos en la salud digestiva, inmunológica y en la prevención del cáncer de colon. Reforzando con esto su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *Escherichia coli, Shigella sp y Samonella sp* [21].

Contiene gran cantidad de minerales como potasio, calcio, sodio, hierro, zinc, cobre, magnesio y selenio indicados en los antecedentes de esta tesis. Cuenta también con un contenido de vitaminas como tiamina, riboflavina, piridoxina y vitamina C. Muchos de estos micronutrientes son actualmente considerados como potentes antioxidantes.

Por el contenido de estos micronutrimentos en el aguamiel, se realizó dentro de este trabajo el conteo de compuestos fenólicos totales por método de Folin Ciocalteau con el fin de determinar la capacidad antioxidante de cada muestra de aguamiel. La concentración de estos compuestos fenólicos depende del grado de maduración de la planta[40], por esta razón se realizó el conteo de estos compuestos a ambas muestras de aguamiel, pues cada una contaba con diferente tiempo de

maduración. Esto demostrándose con los resultados obtenidos en la tabla 6 correspondiente al conteo de compuestos fenólicos, observando que el aguamiel perteneciente al Maguey A presenta menor capacidad antioxidante que el proveniente del Maguey B, lo cuál indica que a mayor maduración de la planta existe mayor actividad antioxidante de este alimento funcional.

Los fructooligosacáridos que contiene el aguamiel como la inulina han sido utilizados como probióticos gracias a la capacidad que tienen para mejorar la microbiota intestinal, modular la función intestinal y el tiempo de tránsito, así como la capacidad que tienen para activar el sistema inmunológico.

Durante el desarrollo de este trabajo empleamos como control de células normales linfocitos de sangre periférica y observamos una actividad proliferativa del aguamiel sobre las células de defensa, este crecimiento puede estar relacionado con la capacidad que tienen estas células inmunitarias para generar anticuerpos, controlar respuestas inmunitarias y destruir células tumorales.

En las gráficas 5 y 6 se observa la actividad proliferativa que muestran los linfocitos al entrar en contacto con el aguamiel, teniendo un aumento del 24.31% y 22.11 % en la viabilidad celular de esta línea. Lo cual comprueba que ninguna de las muestras de aguamiel no presenta actividad antiproliferativa en células sanas, por el contrario, presenta un efecto benéfico y proliferativo.

Actualmente es considerado que parte de las propiedades terapéuticas del aguamiel son debidas al microbioma que presenta, el cual lo componen principalmente bacterias y levaduras con potencial probiótico reconocido como *Bacillus, Lactobacillus, Streptococcus* y *Sacharomyces cerevisiae* [(15)(21)]. Estos grupos microbianos se sabe actúan por vía oral en la reducción de algunas enzimas que participan en la formación y el metabolismo de carcinógenos alimentarios, y por tanto que están asociadas al desarrollo del cáncer.

Esta asociación que presentan los metabolitos del microbioma que contiene el aguamiel con el desarrollo de esta patología llevó a la realización de la medición de la actividad antiproliferativa del aguamiel sobre células HCT15 de la línea celular

de cáncer de colon. Concluyendo, de acuerdo con los resultados obtenidos durante este trabajo, que el aguamiel si presenta actividad antiproliferativa sobre la línea celular de cáncer de colon, observando en las gráficas 3 y 4 una disminución del 5.52% (aguamiel A) y del 8.84% (aguamiel B). Comprobando que existe una disminución de la reproducción celular de las células HCT15 al entrar en contacto con aguamiel y por tanto haciendo este compuesto eficaz para la prevención y tratamiento coadyuvante del cáncer de colon.

Tanto en la gráfica 3 como en la 4 correspondientes a la viabilidad celular de la línea HCT15 en contacto con el aguamiel a diferentes dosis se observa que después de la dosis con mayor actividad antiproliferativa existe un incremento en la proliferación celular, sin embargo este no sobrepasa el porcentaje celular inicial, por lo que se determina que sí existe un efecto antiproliferativo pues no hay un incremento en el número de células inicial. Esto tendría que estudiarse con detenimiento en investigaciones posteriores a este trabajo. Sin embargo, por medio de un análisis estadístico con prueba T para muestras independientes se logra concluir que estos datos tienen significancia estadística y por tanto rechazan la hipótesis nula de esta tesis, comprobándose con una $p<0.05$.

Por tanto, se propone al aguamiel como un alimento funcional en la prevención del cáncer de colon y apto como tratamiento coadyuvante de la patología pues al evitar la reproducción de las células cancerosas se maximiza la efectividad del tratamiento de base, evitando con esto la propagación del cáncer pues la reproducción estaría controlada. Esto reforzándose con los resultados obtenidos en la relación de HCT15/Linfocitos humanos en contacto con la misma dosis de aguamiel mostrados en las gráficas 7 y 8 donde se observa que en cualquier dosis de aguamiel existe un aumento en la proliferación de las células de defensa y una disminución en las células cancerosas, por tanto, se demuestra que el aguamiel no disminuye la proliferación de células normales, pero si disminuye la proliferación de las celular del cáncer.

9. CONCLUSIONES

1. El aguamiel de *Agave salmiana* si presenta actividad antiproliferativa sobre la línea celular HCT15 perteneciente a cáncer de colon.
2. El aguamiel de *Agave salmiana* no presenta una concentración inhibitoria 50 sobre la línea celular HCT15 perteneciente a cáncer de colon.
3. El aguamiel de *Agave salmiana* no presenta efecto antiproliferativo sobre linfocitos humanos.
4. El aguamiel de *Agave salmiana* presenta actividad proliferativa en linfocitos humanos.
5. El contenido de compuestos fenólicos totales del aguamiel de *Agave salmiana* aumenta conforme el tiempo de maduración de la planta.
6. El aguamiel del maguey B presenta mayor actividad antiproliferativa, sin embargo, ambas muestras (maguey A y B), cumplen con la misma propiedad.

10. PERSPECTIVAS A FUTURO

La investigación científica en la rama de la nutrición clínica toma un papel fundamental principalmente en la prevención de enfermedades como el cáncer.

En los últimos años el estudio de la actividad biológica de algunos alimentos de origen vegetal ha tomado relevancia pues existe la necesidad continua de encontrar nuevas alternativas de tratamiento ya que en el país existen muchas plantas con propiedades benéficas, pero son poco estudiadas o simplemente no se ha investigado a detalle sus propiedades químicas y biológicas.

Por esta cuestión se propone a futuro dar continuidad a este trabajo de investigación para enfatizar la actividad biológica del aguamiel sobre distintas líneas celulares. Resumiendo, a continuación, las perspectivas a futuro:

- Evaluar la actividad del aguamiel en diferentes líneas celulares de cáncer, a diferentes dosis, empleando la misma metodología.
- Evaluar el efecto que presenta el aguamiel en experimentos in vivo con biomodelos.

- Evaluar en una etapa preclínica la respuesta que presentan los pacientes con cáncer de colon al entrar en contacto con una dosis establecida de aguamiel vía oral, alterno a su tratamiento médico.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Cancergov. Instituto Nacional del Cáncer. [En línea]. Disponible en: https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es [Consultado el 9 de septiembre de 2019].
2. Malki, A. Teoría del cáncer y la progresión del cáncer. Grupo electrónico OMICS. 2015 ; 1 (1) : 1-19
3. Intituto Nacional de Cáncer. [Internet]. El cáncer metastásico colorrectal puede diseminarse al inicio de la enfermedad, indica un estudio. Disponible en: https://www.cancer.gov/espanol/noticias/temas-y-relatos-blog/2019/metastasis temprana-cancer-colorrectal
4. Infocancerorgmx. [En línea]. Disponible en: https://www.infocancer.org.mx/?c=conocer-el-cancer [Accedido el 9 de septiembre de 2019].
5. OMS. Organización Mundial de la Salud. [En línea]. Disponible en: https://www.who.int/topics/cancer/es/ [Consultado el 10 de diciembre de 2019].
6. GLOBOCAN Global Cancer Observator [En línea]. Disponible en: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf [Acceso marzo 2020].
7. Inegiorgmx. Inegiorgmx. [En línea]. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf [Consultado el 9 de septiembre de 2019].
8. Winslow, T. [Internet]. Anatomía del colon (con etiqueta del intestino delgado). Disponible en: https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=9801
9. Mayorga Reyes, L, Azaola Espinosa, A, Gutiérrez Nava, A. Revisión bibliográfica Probióticos y su potencial en la prevención del cáncer de

colon. Laboratorio de Biotecnología, Depto Sistemas Biológicos, UAM-X. 2010;77(1): 10-15.

10. Sánchez Gundín, J, Torres Suárez, A.I, Fernández Carballido, A.M, Martínez Valdivieso, L, Barreda Hernández , D. Colorrectal cancer: prevention and treatment. Real Academia Nacional de Farmacia. 2017;83(2): 188-199.
11. González Contreras, Q.H, Bahena Aponte, J.A. Cáncer de colon. Revista de gastroenterología de México. 2010;75(1): 65-68.
12. Saludgobmx. Saludgobmx. [En línea]. Disponible en: http://www.incan.salud.gob.mx/ [Accedido el 9 de septiembre de 2019].
13. Sarma, DP La clasificación de Dukes de cáncer colorrectal. Revista de la Asociación Médica Estadounidense. 2014; 246 (1.447)
14. Loraine, S. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2010; 21 (4): 18-27.
15. Burns, A.J, Rowland, I.R. Prebióticos y probióticos en la prevención del cáncer de colon. Gastroenterol Hepatol. 2003; 26 (1): 73-84.
16. Ramírez Murillo, LM, Pérez Armendariz, B, Yañez Moneda, AL. Análisis de los factores que inciden en el consumo de una nueva bebida probiótica elaborada a partir de aguamiel Nanacamilpa, Tlaxcala. Revista de Investigación y análisis. 2012; 26 (1): 185-202.
17. Espíndola Sotres, V, Trejo Márquez, M, Lira Vargas, A, Pascual Bustamante, S. Caracterización del aguamiel y jarabe de agave originario del Estado de México, Hidalgo y Tlaxcala. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2018;3(1): 522-528.
18. Vázquez García, A, Aliphat Fernández, M, Estrella Chulim, N, Ortiz Torres, E, Ramírez Juárez, J. El maguey pulquero, una planta multifuncional y polifacética: Los usos desde una visión mestiza e indígena. Scripta Ethnologica. 2016; XXXVIII (1): 65-87.
19. Álvarez Duarte, M.C, García Moya, E, Suárez Espinosa, J, Luna Cavazos, M, Rodríguez Acosta, M. Conocimiento tradicional, cultivo y

aprovechamiento del maguey pulquero en los municipios de Puebla y Tlaxcala. Polibotánica. 2018;45(15): 205-222.

20. Pineda, E, Uribarri, D. Propiedades químicas y creencias curativas populares del Maguey o Cabuya (Agave americana L) Caso, Churcampa, Huancavelica. Ciencia y Desarrollo. 2014;17(1): 77-83.
21. Cervantes Contreras, M, Pedroza Rodríguez, A. El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. NOVA Publicación científica en ciencias biomédicas. 2007;5(8): 101-212.
22. Romero López, MR, Osorio Díaz, P. Composición química, capacidad antioxidante y efecto prebiótico de aguamiel (Agave atrovirens) durante la fermentación in vitro. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 2015; 14 (2): 281-292.
23. Arredondo, J, Lafuente, F. Análisis del microbioma de bebidas tradicionales de Agave (Agave sp) como perspectiva de bioprospección. III Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina I Simposio Nacional de Microbiología Aplicada. 2016 ; 1 (1) : 26.
24. González Mesillas, F, Vázquez Castro, P, Jaimez Ordaz, J, Zúñiga Juárez, M.A. Potencial probiótico de bacterias aisladas del pulque: Una revisión. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2016;1(1): 924-930.
25. León de la O, D, Méndez Colin, D, Rodríguez Padilla, D, Puente Hurle, L, García Sorrondegui, F. Análisis bromatológico y aislamiento de microorganismos con potencial probiótico del pulque. Investigación Universitaria Multidisciplinaria. 2012;11(11): 115-122.
26. Castañeda Guillot, C.D. Microbiota intestinal, probióticos y prebióticos. Enfermería Investiga Investigación, vinculación, docencia y gestión.2017;2(4): 156-160.
27. Olveira Fuster, G, González Molero, I. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. Nutrición hospitalaria. 2007;22(2): 26-34.

28. Abreu y Abreu, A.T. Microorganismos en la salud y enfermedad Utilidad de probióticos, prebióticos y simbióticos. Revista de gastroenterología de México. 2018;83(1): 20-21.
29. Icaza Chávez, M.E. Microbiota en salud y disbiosis. Revista de gastroenterología de México. 2018;83(1): 15-17.
30. Jurado, D, Bravo, L.M, Cerón, C, Guerrero, N, Yépez, M.C. Hábitos de vida y cáncer colorrectal: Un estudio de casos y controles en una población de ingresos medios y bajos. Revista Universidad y Salud. 2015;17(1): 7-17.
31. Mara Kich, D, Vincenzi, A, Majolo, F, Volken de Souza, C.F, Goettert, M.I. Probiotic: effectivennes nutrition in cancer treatment and prevention.Nutrición hospitalaria. 2016;33(6): 1430-1437.
32. Rodríguez Fernández, Z, Jean Louis, B, Casaus Prieto, Pineda Chacón, J, Joubert Álvarez, G. Algunas especificaciones sobre el diagnóstico del cáncer de colon recurrente. MEDISAN. 2015;19(2): 169-179.
33. Romero Rojas, A.E. Cáncer de colon y dieta. Revista de gastroenterología de México. 2015;19(4): 191-192.
34. Sendrós Madroño, M.J. Aspectos dietoterapéuticos en situaciones especiales del paciente oncológico. Prebióticos y probióticos, ¿tienen cabida en la terapia nutricional del paciente oncológico?. Nutrición hospitalaria. 2016;33(1): 17-30.
35. Téllez Ávila, F.I. Cáncer de colon. Revista de gastroenterología de México. 2015;80(1): 96-98.
36. Valdovinos Díaz, M.A. Microbiota intestinal en enfermedades digestivas. Revista de gastroenterología de México. 2018;83(1): 18-19.
37. Valdovinos, M.A. Consenso mexicano sobre probióticos en gastroenterología. Revista de gastroenterología de México. 2017;82(2): 156-178.
38. Villegas Mejía, C.R, Chacón Cardona, J.A, Villegas Jaramillo, M, Villegas Jaramillo, P. Cáncer de colon ¿Una sola entidad? Consideraciones sobre

lateralidad en una institución oncológica colombiana 2001-2016. Revista CES Medicina. 2018;32(3): 191-202.

39. Gimeno, EVA Compuestos fenólicos Un análisis de sus beneficios para la salud. Elsevier. 2004 ; 23 (6) : 80-84.

40. García, EVA Determinación de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu. ETSIAMN Universitat Politècnica de València. Weblog. [Online] Disponible en: https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/;jsessionid=458DE802EB4D22411E493FD3170DCCB5?sequence=1#:~:text=El%20ensayo%20Folinda%2DCiocalteu%20se,determinada% 20espectrofotom% C3% A9tricamente% 20a% 20765% 20nm. [Consultado el 26 de agosto de 2020].