



ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de hidrolizados proteicos de *Spirulina (Arthrospira maxima)* y su efecto quimiopreventivo en cáncer de colon inducido con azoximetano.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA :

M en C. Nikte Yoliztli Martínez Palma

Directoras de tesis:

Dra. Gloria Dávila Ortiz

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala



México, D.F.

ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE CUADROS	viii
I.- ABSTRACT	1
II.- RESUMEN.....	2
III.- INTRODUCCIÓN	3
3.1. Estrés oxidativo y cáncer.....	3
3.1.1. Radicales libres	4
3.1.1.1. Fuentes de generación y mecanismos de reacción.....	4
3.1.1.2. Química y bioquímica de las especies reactivas de oxígeno	6
3.1.1.3. Química y bioquímica de las especies reactivas de nitrógeno	7
3.1.2. Daño oxidativo a biomoléculas.....	8
3.1.2.1. Daño a ADN nuclear y mitocondrial.....	8
3.1.2.2. Peroxidación lipídica.....	10
3.1.2.3. Oxidación de proteínas.....	12
3.1.3. Estrés oxidativo y señalización celular.....	13
3.1.4. Defensa antioxidante.....	15
3.1.4.1. Antioxidantes endógenos.....	15
3.1.4.2. Antioxidantes exógenos.....	17
3.1.5. Etapas y mecanismo de la carcinogénesis.....	17
3.2. Cáncer de colon.....	20
3.2.1. Incidencia y factores de riesgo.....	20
3.2.2. Fisiología e histología del epitelio del colon.....	21
3.2.3. Efecto del estrés oxidativo en el epitelio del colon.....	24
3.2.4. Carcinogénesis de colon.....	24

	Página
3.2.5. Quimioprevención en cáncer de colon.....	26
3.2.5.1. Estudios de quimioprevención en cáncer de colon.....	28
3.3 Péptidos bioactivos.....	29
3.3.1. Péptidos con actividad antioxidante.....	30
3.4. <i>Spirulina</i> (<i>Arthrospira máxima</i>).....	31
3.4.1. Caracterización y estructura de las ficobiliproteínas	32
3.4.1.1. Ficobilisomas.....	32
3.4.1.2. Ficobiliproteínas.....	33
3.4.1.3. Péptidos de unión en ficobilisomas.....	36
3.4.2. Ficobiliproteínas y péptidos de unión en <i>Spirulina</i>	39
IV. JUSTIFICACIÓN.....	41
V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	42
5.1. Hipótesis.....	42
5.2. Objetivo general.....	42
5.3. Objetivos específicos.....	42
VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	43
VII. MATERIALES.....	44
VIII. MÉTODOS.....	44
8.1. Análisis de la composición químico proximal y aminoácidos de <i>Spirulina</i>	44
8.2. Evaluación <i>in silico</i> de las ficobiliproteínas de <i>Spirulina</i>	45
8.3. Obtención de los hidrolizados proteicos de <i>Spirulina</i>	45
8.3.1. <i>Spirulina</i> reducida en polifenoles (Spr).....	46
8.3.1.1. Determinación del contenido total de polifenoles.....	46

	Página
8.3.2. Obtención del extracto de ficobiliproteínas de <i>Spirulina</i> (Exf).....	46
8.3.3. Hidrólisis enzimática de Spr y Exf.....	47
8.3.4. Grado de hidrólisis.....	48
8.4. Electroforesis (Microchips).....	48
8.5. Evaluación in vitro de la actividad antioxidante y quelante de los hidrolizados proteicos	49
8.5.1. Determinación de actividad antioxidante por el radical DPPH.....	49
8.5.2. Determinación de actividad antioxidante por el ensayo TEAC.....	49
8.5.3. Inhibición de la decoloración de β -caroteno.....	50
8.5.4. Determinación de poder reductor	51
8.5.5. Determinación de actividad quelante de hierro	51
8.5.6. Determinación de actividad quelante de cobre	51
8.6. Evaluación in vivo de la capacidad antioxidante y el efecto quimiopreventivo.....	52
8.6.1. Animales y diseño experimental	52
8.6.2. Determinación de proteína total.....	54
8.6.3. Evaluación de marcadores de oxidación en hígado y colon.....	54
8.6.3.1. Determinación de peroxidación lipídica.....	54
8.6.3.2. Determinación de proteínas oxidadas	55
8.6.3.3. Determinación de óxido nítrico.....	55
8.6.4. Evaluación del efecto quimiopreventivo.....	56
8.6.4.1. Evaluación de focos de criptas aberrantes (FCA).....	56
8.7. Análisis estadístico.....	56
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
9.1. Composición químico proximal y de aminoácidos de <i>Spirulina</i>	57
9.2. Evaluación in silico de las ficobiliproteínas de <i>Spirulina</i>	59
9.3. Obtención de hidrolizados proteicos de <i>Spirulina</i>	60

Página

9.3.1. Obtención de <i>Spirulina</i> reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf)	60
9.3.2. Caracterización electroforética de Spr y Exf	62
9.3.3. Obtención y caracterización de los hidrolizados proteicos de Spr y Exf	64
9.4. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante y quelante de los hidrolizados proteicos.....	67
9.4.1. DPPH.....	67
9.4.2 ABTS.....	68
9.4.3. Poder reductor.....	70
9.4.4. Inhibición del blanqueamiento de β -caroteno.....	71
9.4.5. Actividad quelante de Fe^{2+}	73
9.4.6. Actividad quelante de Cu^{2+}	74
9.5. Evaluación antioxidante y quimiopreventiva del hidrolizado proteico de Spr	78
9.5.1. Peso corporal de los animales de experimentación.....	78
9.5.2. Evaluación de la capacidad antioxidante del hidrolizado proteico de Spr	80
9.5.2.1. Peroxidación lipídica	80
9.5.2.2. Oxidación de proteínas	82
9.5.2.3. Óxido nítrico	83
9.5.3. Evaluación del efecto quimiopreventivo del hidrolizado proteico de Spr.....	85
X. CONCLUSIONES	90
XI. REFERENCIAS	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1.- Productos de la oxidación de bases nitrogenadas	9
2.- Reacción de la guanina con el radical hidroxilo.....	10
3.- Vías de la peroxidación lipídica.....	11
4.- Vías de señalización inducidas por EROS/iones metálicos	14
5.- Modelo de carcinogénesis de tres etapas, efecto del nivel de carcinógeno y radicales libres.....	19
6.- Histología del colon.....	22
7.- Efecto antagónico de las señales celulares de proliferación y apoptosis en la cripta del colon.....	23
8.- Cambios morfológicos y moleculares en la secuencia adenoma-carcinoma.....	25
9.- a) Transformación del azoximetano. b) Micrografía a mucosa de colon de ratón tratado con AOM.....	27
10.- a) Imagen al microscopio de transmisión electrónica del tilacoide de rhodophyta b) Representación esquemática de la organización de los ficobilisomas en el tilacoide c) Modelo estructural de un ficobilisoma	33
11.- Estructura química del cromóforo ficocianobilina (a) y bilirrubina (b)	34
12.- a) Estructura tridimensional de la α -subunidad (a) y β -subunidad (b) de C-ficocianina de <i>F.diplosiphon</i> . b) Representación esquemática del monómero de ficocianina.....	35
13.- a) Interfaz de la asociación monomérica en PC b) Interfaz de la asociación trimétrica ($\alpha\beta$) ₃ en PC.....	36
14.- Modelo de ensamblaje de los péptidos de unión de <i>M. laminosus</i>	38
15.-a) Comparación del volumen de la cavidad hexamérica y el péptido de unión. b) Estructura terciaria de la proteína de unión L _C ^{7,8}	39
16.- Diagrama experimental general	46
17.- Diseño experimental de la evaluación <i>in vivo</i>	53
18.- Predicción de los perfiles de actividad biológica de las ficobiliproteínas de <i>Spirulina</i>	59
19.- Perfil electroforético de <i>Spirulina</i> reducida en polifenoles, extracto de ficobiliproteínas y <i>Spirulina</i> ...	63

Figura	Página
20.- Grado de hidrólisis de los hidrolizados proteicos de <i>Spirulina</i> reducida en polifenoles y extracto de ficobiliproteínas.....	65
21.- Perfil electroforético del hidrolizado proteico de <i>Spirulina</i> reducida en polifenoles.....	66
22.- Perfil electroforético de hidrolizado proteico de extracto de ficobiliproteínas.....	66
23.- Actividad antioxidante determinada por el método de DPPH de los hidrolizados proteicos de <i>Spirulina</i> reducida en polifenoles y extracto de ficobiliproteínas.....	68
24.- Actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos de <i>Spirulina</i> reducida en polifenoles y extracto de ficobiliproteínas determinada por el radical ABTS (TEAC).....	69
25.- Poder reductor como medida de la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos de <i>Spirulina</i> reducida en polifenoles y extracto de ficobiliproteínas.....	71
26.- Actividad antioxidante determinada por el método de inhibición del blanqueamiento del β -caroteno, de los hidrolizados proteicos de <i>Spirulina</i> reducida en polifenoles y extracto de ficobiliproteínas	72
27.- Actividad quelante de hierro de los hidrolizados proteicos de <i>Spirulina</i> reducida en polifenoles y extracto de ficobiliproteínas.	73
28.- Actividad quelante de cobre de los hidrolizados proteicos de <i>Spirulina</i> reducida en polifenoles y extracto de ficobiliproteínas.....	75
29.- Ganancia de peso corporal acumulado (g) a lo largo del ensayo, en los diferentes grupos experimentales tratados con <i>Spirulina</i> reducida en polifenoles (Spr), hidrolizado proteico de Spr y azoximetano.....	78
30.- Lipoperoxidación en tejido de colon e hígado de ratones macho cepa ICR administrados con <i>Spirulina</i> reducida en polifenoles (Spr), hidrolizado proteico de Spr y azoximetano.....	80
31.- Contenido de grupos carbonilo como medida de la oxidación de proteínas en tejido de colon e hígado de ratones macho cepa ICR administrados con <i>Spirulina</i> reducida en polifenoles (Spr), hidrolizado proteico de Spr y azoximetano.....	82
32.- Contenido de NO_2^- como medida indirecta del NO en tejido de colon e hígado de ratones macho cepa ICR administrados con <i>Spirulina</i> reducida en polifenoles (Spr), hidrolizado proteico de Spr y azoximetano.....	84
33.- Imagen al microscopio de la mucosa de colon de ratón.....	87

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1.- Principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno generadas de forma endógena en la célula ...	5
2.- Características de los principales péptidos de unión	37
3.- Polipéptidos de unión de <i>Spirulina</i>	40
4.- Composición químico proximal de <i>Spirulina</i>	57
5.- Composición de aminoácidos de <i>Spirulina</i>	58
6.- Contenido de polifenoles de <i>Spirulina</i> durante el proceso de extracción.....	61
7.- Comparación de los métodos empleados para la obtención del extracto de ficobiliproteínas.....	62
8.- Capacidad antioxidante y quelante de los hidrolizados proteicos de <i>Spirulina</i>	77
9.- Incidencia y tipo de criptas aberrantes.....	86

I. ABSTRACT

The current lifestyle promotes the development of oxidative stress, chronic degenerative diseases such as diabetes, obesity, hypertension and cancer have been associated with this condition. Cancer is a public health problem worldwide, and its incidence is expected to increase in the coming years, which result in the need to develop research aimed at finding alternatives for treatment and prevention. It has been proposed that antioxidants are potential candidates for the prevention and treatment of cancer, protein hydrolysates are an alternative of natural antioxidants.

The main objective of this work was to evaluate the antioxidant and chemopreventive activity of *Spirulina* protein hydrolysates. After checking the potential of the bioactive protein by *in silico*, aminoacids and proximal analysis, two protein hydrolysates were obtained from *Spirulina*, one with reduction of polyphenol content and other with a protein extract from phycobiliproteins, which also exhibit differences in their protein electrophoretic profile, phycobiliproteins concentration and degree of hydrolysis, showed different results in the determinations of antioxidant activity performed.

According to the results obtained *in vitro*, the chemopreventive and antioxidant activity of protein hydrolyzate was evaluated in a colon carcinogenesis model in mice, induced by azoxymethane. *Spirulina* protein hydrolyzate (40 and 400 mg/kg) showed antioxidant activity to decrease the levels of nitric oxide, carbonyl groups and malondialdehyde generated by azoxymethane. However with the low dose greater reduction of aberrant crypts (56%) was observed, suggesting the involvement of antioxidant activity in the chemopreventive effect, without ruling out the influence of other mechanisms. This protein hydrolyzate could be an option consumption of *Spirulina* and functional product.

II. RESUMEN

Las condiciones de vida actual favorecen un desbalance a favor del estrés oxidativo, enfermedades crónico degenerativas como diabetes, obesidad, hipertensión y cáncer se han asociado con este padecimiento. El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial y se prevé que su incidencia aumentara en los próximos años, lo que trae como consecuencia la necesidad de desarrollar investigaciones encaminadas a la búsqueda de alternativas para su tratamiento y prevención. Se ha propuesto que los antioxidantes son candidatos potenciales para la prevención y tratamiento de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, una alternativa de antioxidantes naturales, son los hidrolizados proteicos.

El objetivo principal del trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante y quimiopreventiva de hidrolizados proteicos de *Spirulina*. Por lo que después de comprobar el potencial bioactivo de sus proteínas por medio de análisis *in silico*, químico proximal y de aminoácidos, se obtuvieron dos hidrolizados proteicos de *Spirulina*, uno con reducción en su contenido de polifenoles (Spr) y otro de extracto de ficobiliproteínas (Exf), que además de presentar diferencias en su perfil electroforético, concentración de ficobiliproteínas y grado de hidrólisis, mostraron diferente actividad antioxidante en las distintas determinaciones realizadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos *in vitro*, se evaluó el efecto antioxidante y quimiopreventivo del hidrolizado proteico de Spr por medio de un modelo de carcinogénesis de colon en ratón inducido con azoximetano. El hidrolizado proteico Spr probado a 40 y 400 mg/kg presentó actividad antioxidante al disminuir los niveles de óxido nítrico, grupos carbonilo y malondialdehído generados por el azoximetano. Sin embargo con la dosis baja se observó una mayor reducción de criptas aberrantes (56%), lo cual sugiere la participación de la actividad antioxidante en el efecto quimiopreventivo, sin descartar la influencia de otros mecanismos. Este hidrolizado proteico podría representar un producto funcional además de una opción de consumo de la *Spirulina*.

III. INTRODUCCIÓN

3.1. Estrés oxidativo y cáncer

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial, actualmente es la causa del 12% de todas las muertes en el mundo. En aproximadamente 20 años, el número de muertes a causa del cáncer aumentará de 6 a 10 millones por año (ACS, 2014).

El término cáncer se aplica de forma general en más de 100 enfermedades diferentes incluyendo tumores malignos localizados en diferentes sitios (mama, cuello uterino, próstata, estómago, colon/recto, pulmón, boca, leucemia, sarcoma de hueso, enfermedad de Hodgkin, etc.) Todas las enfermedades se caracterizan por tener fallas en los mecanismos que regulan el crecimiento, proliferación y muerte celular. En última instancia, hay progresión del tumor desde una anomalía leve a una severa, a través de invasión en tejidos vecinos. Con el tiempo se puede extender a otras áreas del cuerpo (ACS, 2014).

En las últimas dos décadas se ha generado evidencia considerable que sugiere una relación directa entre el estrés oxidativo y el desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas (Reuter *et al.*, 2010).

El oxígeno es un gas que juega un doble papel, ya que puede ser tanto benéfico como perjudicial en los sistemas biológicos. Su reactividad le permite participar en la transferencia de electrones de alta energía, generando grandes cantidades de adenosín-trifosfato (ATP) a través de la fosforilación oxidativa. Este proceso ha permitido la evolución de organismos multicelulares complejos, pero también le confiere la capacidad de atacar moléculas biológicas (Burton y Jauniaux, 2011).

El cuerpo humano está constantemente sometido al ataque de especies reactivas de oxígeno (ERO), para equilibrar los efectos negativos de dichas especies existe un complejo sistema de defensa antioxidante. Sin embargo, en algunas situaciones este balance es perturbado, generando estrés oxidativo. El estrés oxidativo es definido en términos generales como una alteración en el balance pro-oxidante antioxidante a favor de la formación de los primeros, que conduce a la generación de daño celular potencialmente tóxico (Gutteridge y Halliwell, 2000).

Bajo condiciones sostenidas de estrés oxidativo, las ERO son producidas en mayor proporción durante un largo periodo de tiempo, generando daño en la estructura y función celular, que pueden inducir mutaciones somáticas y transformaciones neoplásicas (Reuter *et al.*, 2010). De hecho, la iniciación y progresión del cáncer se han relacionado con el estrés oxidativo debido al aumento de mutaciones en el ADN, inestabilidad genética y proliferación celular (Visconti y Grieco, 2009).

3.1.1. Radicales libres

Los radicales libres son definidos como moléculas o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones desapareados, esta inestabilidad les confiere alta reactividad y un periodo de vida muy corto. Los radicales libres pueden ser generados a partir de muchos elementos, sin embargo en los sistemas biológicos los más importantes son originados a partir del oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) (Burton y Jauniaux, 2011).

Las ERO/ERN pueden ejercer tanto efectos nocivos como benéficos en los sistemas vivos (Valko *et al.*, 2004). A concentraciones fisiológicas, las especies reactivas son benéficas pues son usadas por el sistema inmune en defensa contra agentes externos (Rosen *et al.*, 1995) o bien en la vías de señalización redox (Owuor y Kong, 2002). A altas concentraciones son perjudiciales debido a su reactividad, atacando macromoléculas (ADN, lípidos y proteínas) induciendo oxidación, generando daño a membranas e inactivación de enzimas (Halliwell, 2005).

3.1.1.1. Fuentes de generación y mecanismos de reacción

Las ERO pueden ser producidas de fuentes endógenas y exógenas. Bajo condiciones fisiológicas la especie reactiva de oxígeno más común es el anión superóxido $O_2^{\bullet-}$ y la mitocondria es la principal fuente de generación. La transferencia de electrones a través de las enzimas en la cadena respiratoria no es totalmente eficiente, y los electrones que escapan del oxígeno molecular en particular de los complejos I y II resultan en la formación de $O_2^{\bullet-}$. En condiciones normales, 2 % del oxígeno consumido en la mitocondria es convertido en $O_2^{\bullet-}$, en lugar de ser reducido a H_2O (Burton y Jauniaux, 2011).

Además de la mitocondria, otra fuente de generación endógena del radical superóxido es la xantina oxidasa, que cataliza la conversión de hipoxantina a xantina y de esta a ácido úrico. Otras fuentes endógenas son los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos, citocromo p450, microsomas y peroxisomas (Valko *et al.*, 2006). En el **Cuadro 1** se muestran los principales radicales libres generados en la célula.

Cuadro 1. Principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno generadas de forma endógena

ERO/ERN	Fuente de generación	Características	Sistema de defensa enzimática	Producto (s)
Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	<ul style="list-style-type: none"> Mitocondria Fagocitos activados Xantina oxidasa Citocromo P450 	<p>Ligeramente reactivo</p> <p>No puede penetrar membranas</p>	Superóxido dismutasa (SOD)	$H_2O_2 + O_2$
Peróxido de hidrogeno (H_2O_2)	<ul style="list-style-type: none"> A partir del $O_2^{\bullet-}$ vía SOD Macrófagos activados Citocromo P₄₅₀ Xantina oxidasa Microsomas y peroxisomas 	<p>No es radical libre</p> <p>Puede penetrar membranas: intermediario en la producción de especies más reactivas</p> <p>Molécula de señalización intracelular</p>	Glutación peroxidasa (GPx)	$H_2O +$ GSSG $H_2O + O_2$
Radical hidroxilo (OH^{\bullet})	<ul style="list-style-type: none"> A partir de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 vía metales de transición (Fe^{2+} o Cu^{2+}) 	<p>Altamente reactivo con biomoléculas.</p> <p>Extremadamente dañino para el sistema biológico.</p>	Catalasas	
NO^{\bullet}	<ul style="list-style-type: none"> Óxido nítrico sintasa (NOSs) 	<p>Especies reactivas de nitrógeno (ERN).</p> <p>$NO + O_2^{\bullet-} \rightarrow$ peroxinitrito ($ONOO^{\bullet-}$) (altamente tóxico)</p> <p>Puede penetrar membranas</p> <p>Es un importante marcador de oxidación biológica.</p>	Proteínas S-nitrosadas	Proteínas-SO _N + RSH

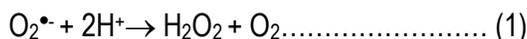
Fuente: Wang *et al.*, 2011.

Las especies reactivas pueden ser generadas por procesos exógenos. Agentes ambientales tóxicos, incluyendo carcinógenos no genotóxicos pueden producir directa o indirectamente radicales libres a nivel celular. La inducción de estrés oxidativo y daño han sido observados durante la administración de diversos xenobióticos (Klaunig *et al.*, 1997).

Aunado a esto, algunos estilos de vida y alimentación pueden actuar como potentes pro-oxidantes, como por ejemplo el tabaquismo, el consumo de alimentos ricos en grasa y la ingesta de carnes rojas, entre otros (Goodman *et al.*, 2011).

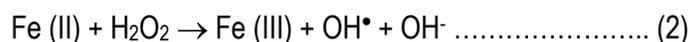
3.1.1.2. Química y bioquímica de las especies reactivas de oxígeno

El anión superóxido es considerado como la ERO “principal”. El $O_2^{\bullet-}$ puede dar lugar a otras ERO “secundarias” de forma directa o esencialmente por medio de reacciones catalizadas por enzimas o bien por metales (Poli y Leonarduzzi, 2004). Ésta especie es incapaz de reaccionar con proteínas o ADN y su interacción con lípidos es controversial. El $O_2^{\bullet-}$ es reducido por medio de una reacción de dismutación (reacción 1), dicha reacción es llevada a cabo por la enzima superóxido dismutasa (SOD). La superóxido dismutasa actúa en conjunto con otras enzimas como la glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa, que degradan el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Michiels *et al.*, 1994).



La generación de varios radicales libres está íntimamente ligada a los metales redox activos. El estado redox de la célula está influenciado por el hierro y en algunas ocasiones por el cobre, este se mantiene dentro de límites fisiológicos estrictos. Se ha sugerido que la homeostasis del hierro asegura que no exista este compuesto libre. Sin embargo, se ha demostrado que *in vivo* en condiciones de estrés, el $O_2^{\bullet-}$ puede liberar hierro de las moléculas que lo contienen (Liochev y Fridovich, 1994).

El Fe (II) liberado puede participar en la reacción de Fenton (reacción 2), generando el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) que es altamente reactivo.



Por otro lado, el radical $O_2^{\bullet-}$ puede participar en la reacción de Haber-Weiss (reacción 3), que combina la reacción de Fenton y la reducción del Fe (III) por el superóxido, generando radicales hidroxilo (OH^{\bullet}) (Liochev y Fridovich, 2002).



El radical OH• es altamente reactivo, con un tiempo de vida en solución acuosa menor a 1ns. Por lo tanto, cuando es generado *in vivo* reacciona inmediatamente en el sitio en el que se originó. Por lo que la generación de OH• cerca de ADN puede ocasionar daño en las bases o en la doble hélice (Valko *et al.*, 2006).

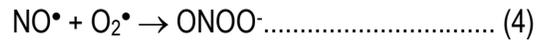
3.1.1.3. Química y bioquímica de las especies reactivas de nitrógeno

La especie reactiva más importante del nitrógeno es el óxido nítrico (NO•). Es un radical muy importante pues actúa como molécula de señalización en diversos procesos fisiológicos, incluyendo neurotransmisión, regulación de la presión sanguínea, mecanismos de defensa, relajación del músculo liso y regulación inmune (Alderton *et al.*, 2001). Esta pequeña molécula tiene un electrón desapareado en el orbital $2\pi^*\gamma$, que lo convierte en un radical. El óxido nítrico es originado en los tejidos biológicos por la enzima óxido nítrico sintasa (NOSs), que metaboliza arginina a citrulina con la formación de NO• a través de una reacción de oxidación de 5 electrones (Ghafourifar y Cadenas, 2005).

La sobreproducción de especies reactivas de nitrógeno generan el llamado estrés nitrosativo, el cual suele ocurrir cuando las especies reactivas de nitrógeno exceden la capacidad de los sistemas de defensa que las neutralizan. Este desequilibrio puede alterar la estructura de proteínas y por lo tanto inhibir o afectar sus funciones normales. El NO• tiene una vida útil de solo unos cuantos segundos en ambientes acuosos (Chiueh, 1999). Su estabilidad aumenta a concentraciones bajas de oxígeno.

Es soluble tanto en sistemas acuosos como lipídicos, tiene la capacidad de difundir rápidamente a través de membranas (plasmática y citoplasmática) (Valko *et al.*, 2006).

Las células del sistema inmune son capaces de producir NO• y O₂• durante procesos inflamatorios. Estos radicales pueden reaccionar (reacción 4) dando lugar a la formación de peroxinitrito. Este radical libre es altamente pro-oxidante y se le ha atribuido daño a lípidos y ADN (Burton y Jauniaux, 2011).



3.1.2. Daño oxidativo a biomoléculas

Como se mencionó anteriormente los radicales libres son muy reactivos, por lo tanto tienen un tiempo de vida muy corto y su radio de acción es limitado. Sin embargo, cuando estas moléculas llegan a reaccionar con compuestos no radicales, se forman nuevos radicales libres que pueden seguir reaccionando. En este contexto, se forman largas cadenas de propagación causando efectos nocivos lejos del sistema que produjo el primer radical. Un claro ejemplo es la peroxidación lipídica, donde los radicales secundarios y productos de degradación pueden ejercer extremas afectaciones lejos del sitio inicial de producción.

Todos los componentes celulares: lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos pueden ser dañados por acción de especies reactivas (ERO/ERN) dando lugar a alteraciones metabólicas y celulares (Martínez, 1995).

3.1.2.1. Daño a ADN nuclear y mitocondrial

Se ha estimado que una célula humana está expuesta aproximadamente a 1×10^5 impactos de radicales libres (o especies reactivas) por día (Beckman y Ames, 1997). Se sabe que los radicales OH^\bullet actúan con todos los componentes de la molécula de ADN, dañando tanto a las bases púricas como pirimidicas, así como también a la estructura de desoxirribosas (Dizdaroglu y Jaruga, 2002).

La permanente modificación del material genético resultado del “estrés oxidativo”, representa uno de los mecanismos involucrados en la mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento. Se han identificado más de 100 productos de oxidación del ADN. El daño al ADN inducido por radicales libres provoca rupturas en la simple o doble hélice, modificaciones en las bases o desoxirribosas, y entrecruzamientos de ADN. El daño al ADN puede resultar en el paro o inducción de la transcripción y las vías de transducción de señales. Ocasionando errores de replicación e inestabilidad genómica, los cuales han sido asociados a la carcinogénesis (Cooke *et al.*, 2003).

El radical hidroxilo es capaz de adicionar dobles enlaces a las bases de ADN por medio de una reacción de segundo orden con una velocidad de $(3-10) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Puede sustraer átomos de hidrógeno del grupo metilo de la timina, así como también 5 átomos de carbono de la desoxirribosa a una velocidad constante de $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Mientras los aductos de las bases generados por los radicales OH^\bullet son producidos por una reacción de adición, los radicales alicíclicos de los azúcares centrados en el carbono se generan por una reacción de eliminación (Dizdaroglu y Jaruga, 2002). En la **Fig.1** se muestran algunos productos de la oxidación de las bases nitrogenadas.

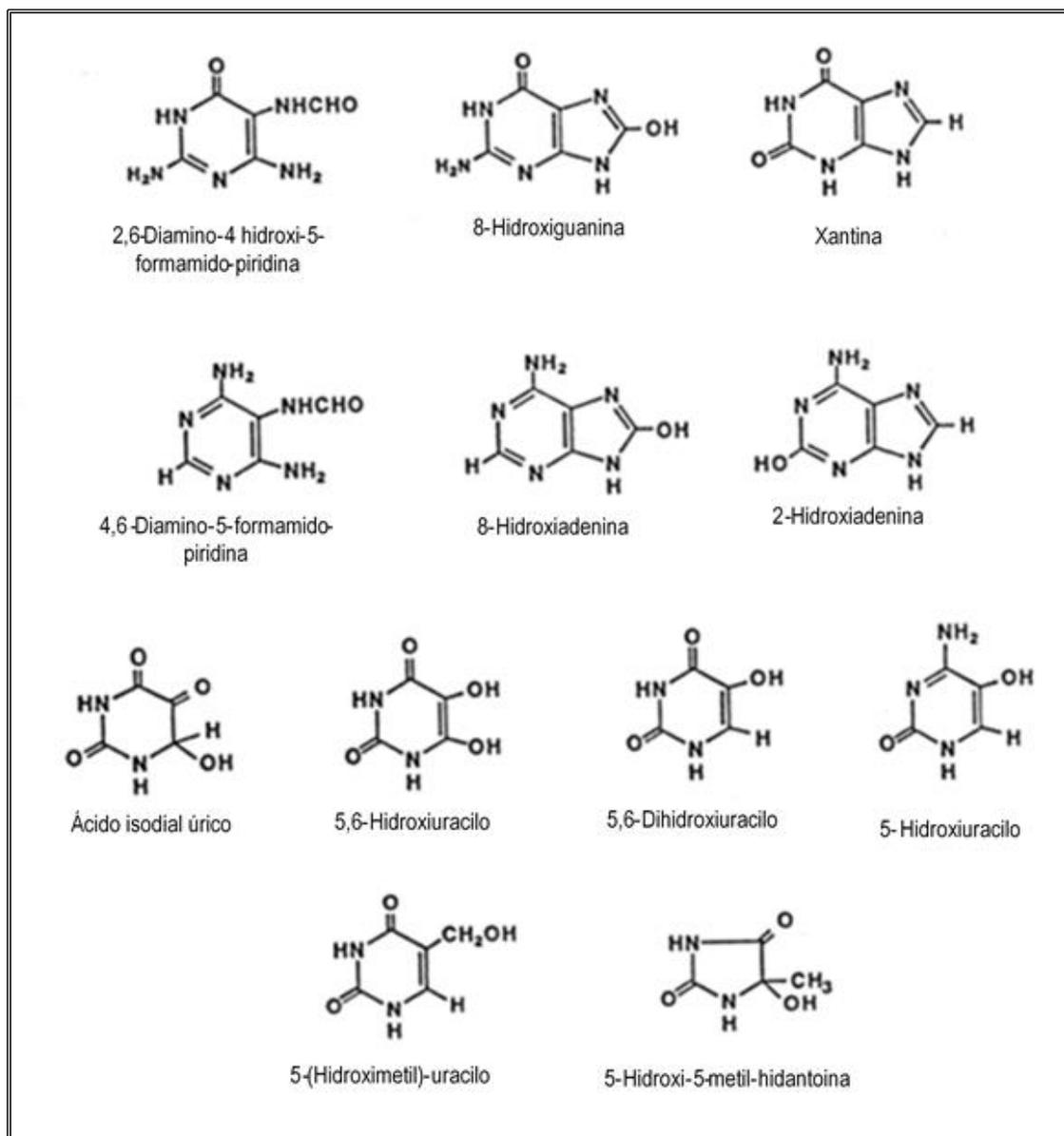


Figura 1.- Productos de la oxidación de bases nitrogenadas
Modificado y adaptado de Aruoma (1998)

Un ejemplo claro de la oxidación del ADN es la formación de 8-hydroxiguanina (8-OH-G) (**Fig. 2**). La presencia de 8-OH-G fue reportada por primera vez en orina humana por Shigenaga (1989). Este producto de oxidación es muy importante, por su formación relativamente sencilla y por su carácter mutágeno y carcinógeno. Se le considera un buen marcador de estrés oxidativo y un potencial marcador de carcinogénesis. Esta modificación ocurre aproximadamente en 1 de cada 105 residuos de guanidina en condiciones normales. El tabaquismo, los carcinógenos y fuentes exógenas de producción de radicales libres entre otras, aumentan considerablemente esta proporción ocasionando que el 8-OH-G logre ser detectado tanto en orina como en leucocitos (Halliwell y Gutteridge, 1985).

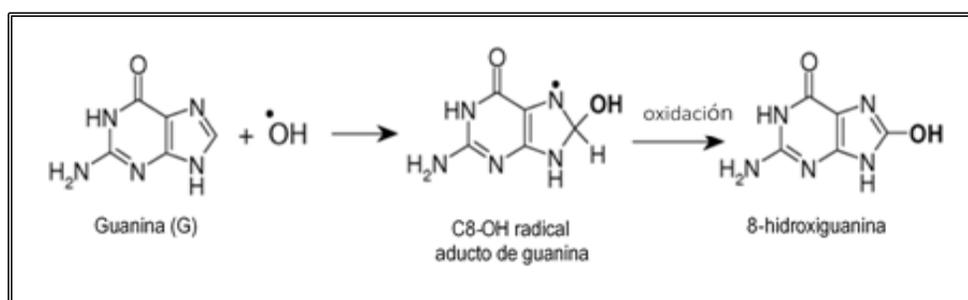


Figura 2.- Reacción de la guanina con el radical hidroxilo

El ADN mitocondrial es especialmente vulnerable al ataque de ERO, sobre todo en el área próxima donde se generan los radicales $\text{O}_2\cdot$ por acción de la cadena transportadora de electrones, debido a la falta de protección de las histonas y a los mínimos mecanismos de reparación que existen. Por lo tanto el daño al ADN mitocondrial es extenso incluso en condiciones normales, las mutaciones ocurren a una tasa de 5 ó 10 veces mayor a lo observado en el ADN nuclear. Ya que el ADN mitocondrial codifica algunas proteínas, incluyendo enzimas que participan en la cadena de transporte de electrones, las mutaciones pueden deteriorar la producción de energía e incrementar el escape de electrones, lo que agrava el estrés original (Richter *et al.*, 1988).

3.1.2.2. Peroxidación lipídica

La reacción completa de la peroxidación lipídica consta de 3 etapas: iniciación, propagación y terminación (**Fig. 3**). Una vez formados los radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) pueden ser reordenados por

La peroxidación de lípidos es autocatalítica y es terminada por la recombinación de dos radicales. El MDA puede reaccionar con las bases de ADN: adenina (A), guanina (G) y citosina (C), dando lugar a la formación de los aductos M₁G, M₁A y M₁C (**Fig. 3**) (Marnett, 1999). El M₁G ha sido detectado en cáncer de mama (tejido) por ³²P-post-labeling, también se ha encontrado en tejido de roedores con cáncer (Wang *et al.*, 1996). Experimentos sitio-específicos han confirmado el efecto mutagénico de M₁G en *E. Colli*, induciendo transversiones a timina y transiciones a adenina. La frecuencia de mutación para este aducto es similar a la reportada para 8-oxo-G en sistemas similares (Fink *et al.*, 1997).

La peroxidación causa deterioro en el funcionamiento de la membrana biológica. Disminuye la fluidez, inactiva las enzimas y receptores unidos a la membrana, y puede cambiar la permeabilidad inespecífica del ion calcio (Nicotera *et al.*, 1990).

3.1.2.3. Oxidación de proteínas

El daño oxidativo a proteínas *in vivo* puede afectar la función de receptores, enzimas, el transporte de estas, etc. Los productos del daño oxidativo a proteínas pueden generar un segundo daño a otras biomoléculas, por ejemplo: inactivación de las enzimas de reparación del ADN, pérdida de la fidelidad de la ADN polimerasa durante la replicación (Halliwell, 1978).

Las cadenas laterales de todos los residuos de aminoácidos son susceptibles a la oxidación por radiación ionizante, o bien por acción de las ERO/ERN (Stadtman, 2004). Los residuos de prolina, histidina, arginina, lisina y cisteína son altamente sensibles a la oxidación por metales redox. La oxidación mediada por metales redox (hierro y cobre) puede ser sitio-específica. Se cree que el Fe (II) se une a sitios de unión (alta y baja afinidad) de metales en las proteínas, en particular en las proteínas donde participan los aminoácidos que se mencionaron anteriormente. El complejo proteína-Fe (II) reacciona con H₂O₂ por medio de la reacción de Fenton, generando radicales OH[•]. Sin embargo, otros autores han propuesto que el radical hidroxilo representa la principal especie reactiva responsable de la oxidación de proteínas (Welch *et al.*, 2001).

Las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos más susceptibles a la oxidación por ERO/ERN generan los siguientes productos: arginina → semialdehído glutámico; glutamato → 4-

hidroxi-glutamato; histidina → 2-oxo-histidina; tirosina → 3,4-hidroxi fenilalanina, entrecruzamiento de aminoácidos Tyr-tyr, 3-nitro-tirosina; valina → 3,4 hidroxi-valina; cisteína → cis-S-S-cis, cis-S-S-R disulfuro; prolina → semialdehído glutámico, 2-pirrilidona-4-hidroxi-prolina; metionina → metionina sulfona y sulfóxido (Stadtman, 2004).

Ya que se generan grupos carbonilo en la cadena lateral de las proteínas. El contenido de grupos carbonilo, es el marcador general de oxidación de proteínas más empleado. La acumulación de carbonilos proteicos ha sido observada en varias enfermedades incluyendo, Alzheimer, diabetes, artritis y cáncer (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

3.1.3. Estrés oxidativo y señalización celular

Las células se comunican entre sí y responden a estímulos extracelulares a través de mecanismos biológicos llamados señalización celular o transducción de señal (Poli y Leonarduzzi, 2004; Thannickal y Fanburg, 2000). La transducción de señal es un proceso que permite, que la información pueda ser transmitida desde el exterior a elementos funcionales dentro de la célula. El proceso de comunicación se activa por señales extracelulares como hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y neurotransmisores (Hensley y Robinson, 2000). Estas señales son normalmente transmitidas al núcleo celular por una clase de proteínas llamadas factores de transcripción, los cuales mediante la unión a secuencias específicas de ADN regulan la actividad de la RNA polimerasa II. La señalización celular puede inducir diversas actividades biológicas como la contracción muscular, expresión de genes, crecimiento celular y transmisión nerviosa (Sah *et al.*, 2000).

Las ERO/ERN han sido implicadas predominantemente en el daño celular. Sin embargo, estas también desempeñan un papel fisiológico importante en la señalización y regulación intracelular (Palmer y Paulson, 1997). Se ha demostrado ampliamente que las ERO interfieren en la expresión de varios genes y en las vías de transducción de señales. Debido a la naturaleza oxidante de las ERO, estas pueden influir en el estado redox y por lo tanto de acuerdo a su concentración causar un efecto positivo (proliferación celular) o negativo (interrupción del crecimiento o muerte) (Lowenstein, 1994). Otros ejemplos incluyen la regulación de la concentración del calcio citosólico, regulación de

la fosforilación de proteínas y activación de ciertos factores de transcripción como es NF-κB y los factores de la familia AP-1 (Lowenstein, 1994).

Las ERO y los iones metálicos inhiben principalmente la fosfoserina/treonina, fosfotirosina y fosfatasa fosfolipídicas, probablemente por la interacción con su grupos sulfidrilos presentes en los residuos de cisteína. La oxidación tiene lugar en los enlaces disulfuro intra o intermoleculares (Thannickal y Fanburg, 2000). Estos cambios estructurales alteran la conformación de las proteínas, lo cual conduce a la desregulación de varias cascadas de señalización, entre las que destacan el factor de crecimiento quinasa, quinasa src/Abl, MAPK y la vía de señalización P13 dependiente de quinasa (Fig. 4). Estas cascadas de señalización conducen a la activación de varios factores de transcripción regulados por el estado redox (AP-1, NF-κB, p53, HIF-1, NFAT) (Valko *et al.*, 2006).

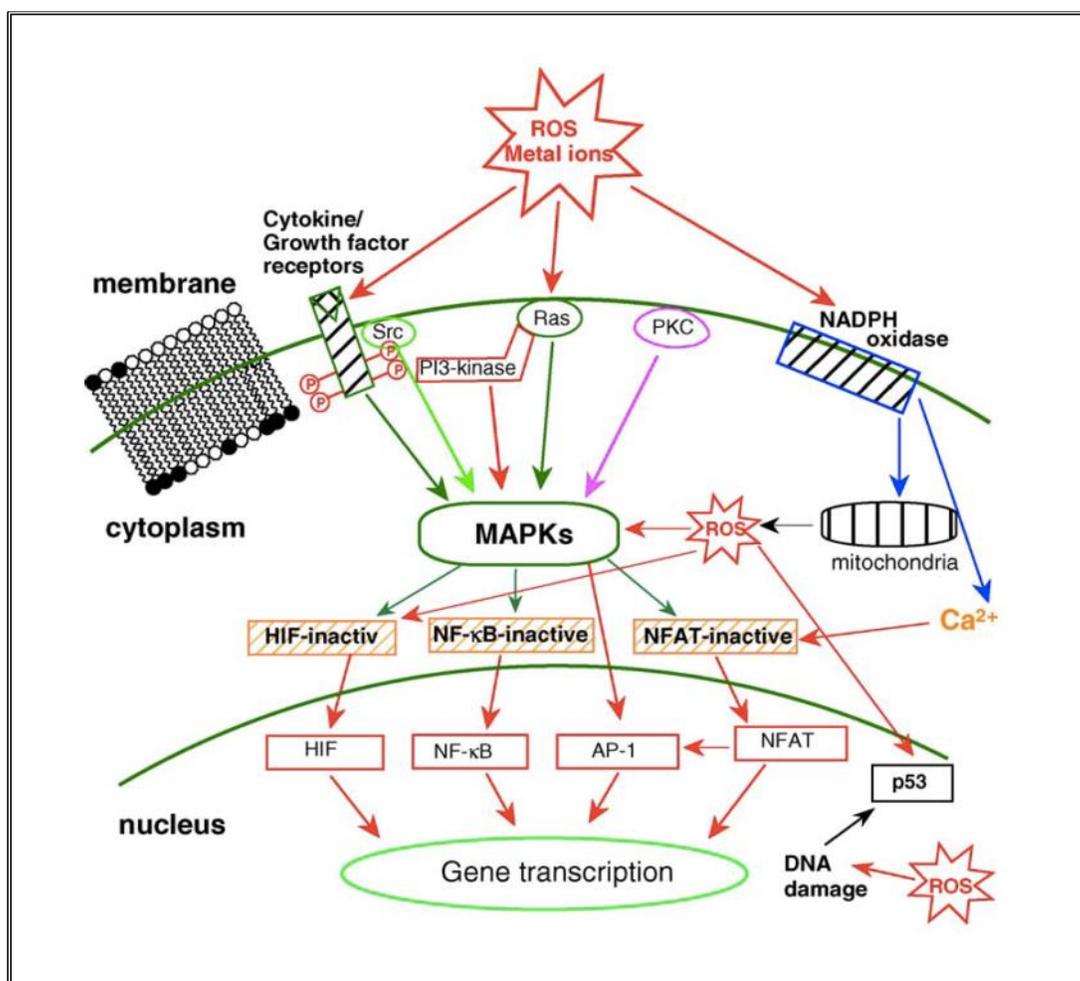


Figura 4.- Vías de señalización inducidas por EROS/iones metálicos
Adaptado de Valko *et al.*, (2006)

3.1.4. Defensa antioxidante

Los organismos aeróbicos han desarrollado un sistema de defensa sumamente eficiente contra las ERO/ERN a lo largo de su evolución. Los antioxidantes pueden ser definidos como aquel sustrato que estando presente a bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, es capaz de inhibir o retardar significativamente el proceso oxidativo (Halliwell, 1996). Algunos antioxidantes son proteínas y enzimas, mientras otros son pequeñas moléculas. Desde el punto de vista del mecanismo de acción, los antioxidantes puede ser clasificados como antioxidantes preventivos, secuestradores o reparadores (Niki, 2010).

Además de la clasificación anterior, los antioxidantes también se pueden clasificar de acuerdo a su localización, su origen (endógeno o exógeno) o bien a sus niveles de acción (Halliwell & Gutteridge, 1985).

3.1.4.1. Antioxidantes endógenos

Los antioxidantes enzimáticos están presentes en el organismo de los seres vivos y protegen frente a los EROs producidos durante el metabolismo. Dentro de éstos, tenemos 3 principales:

a) Superóxido dismutasa (SOD) (EC.1.15.1.1)

Es el antioxidante intracelular más efectivo. La SOD es una enzima que cataliza la reducción de O_2^{\bullet} , dando lugar a H_2O_2 (especie menos reactiva) (McCord y Fridovich, 1969). Esta enzima existe en varias isoformas, las cuales difieren en la naturaleza del metal de su centro activo y los aminoácidos próximos a este, así como también al número de subunidades y cofactores, entre otros. En humanos hay tres formas de SOD: citosólica Cu, Zn-SOD; mitocondrial Mn-SOD y extracelular EC-SOD. Posee velocidades de reacción altas. Actúa mediante una oxidación sucesiva y reducción del metal de transición presente en el sitio activo mediante un mecanismo tipo "Ping-pong" (Matés *et al.*, 1999).

De todas las isoformas de la SOD, sobresale la Mn-SOD ya que es la enzima antioxidante más eficiente con actividad antitumoral. Una serie de estudios con diferentes líneas celulares han confirmado que la sobreexpresión de Mn-SOD conduce a un retraso en el crecimiento de tumores (Storz, 2005).

b) Glutación peroxidasa (GPx)

Existen dos isoformas de esta enzima, una es independiente de selenio (Glutación S-transferasa, GST, EC. 2.5.1.18) mientras la otra es dependiente de este metal (GPx, EC.1.11.1.19) (Storz, 2005). Los humanos tienen 4 tipos diferentes de GPx. Se sabe que todas estas enzimas adicionan dos electrones para reducir peróxidos, mediante la formación de selenoles (Se-OH). GPx actúa en conjunción con el tripéptido glutación (GSH), el cual está presente en células a altas concentraciones (μM). El sustrato de la reacción catalítica de GPx es H_2O_2 y un peróxido orgánico ROOH. GPx descompone los peróxidos en agua (o alcohol) mientras el GSH es oxidado de forma simultánea. GPx compite con la catalasa por el H_2O_2 como sustrato (Valko *et al.*, 2006).

c) Catalasa

La catalasa (EC.1.11.1.6) es una enzima presente en las células de plantas, animales y bacterias aeróbicas (Matés *et al.*, 1999). La catalasa está localizada en el organelo celular llamado peroxisoma. Esta enzima promueve eficientemente la conversión de H_2O_2 a agua y oxígeno molecular. La catalasa posee una de las tasas de conversión más altas en todas las enzimas: una molécula de catalasa puede convertir ~ 6 millones de moléculas de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno molecular por minuto (Valko *et al.*, 2006).

Antioxidantes no enzimáticos

Uno de los antioxidantes no enzimáticos en las células es el Glutación (GSH), puede encontrarse en dos formas según su estado de óxido-reducción: como GSH o glutación reducido, o como GSSG o glutación oxidado. El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas (Viña, 1990), una de ellas es la de proteger a la célula contra los radicales libres, los peróxidos y otros compuestos tóxicos, así como proteger frente al efecto nocivo de las radiaciones. El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres sin necesidad de intervención enzimática o bien por medio de la glutación peroxidasa, enzima clave del ciclo redox del glutación. Cuando se da una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la glutación peroxidasa. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio de la enzima glutación reductasa. La glutación reductasa requiere NADPH como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6- fosfato deshidrogenasa. Tanto la glutación peroxidasa como la glutación reductasa se hallan predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad en la mitocondria

(Benítez, 2008). Entre este tipo de antioxidantes también destacan la coenzima Q10 y el ácido tióctico (Johansen y Harris, 2005).

3.1.4.2. Antioxidantes exógenos

Los antioxidantes exógenos son los que se obtienen mediante la dieta y se pueden obtener de frutas y vegetales principalmente. Dentro de éstos antioxidantes se puede mencionar a la Vitamina C y E, beta carotenos, fenoles, flavonoides y taninos, entre otros.

3.1.5. Etapas y mecanismo de la carcinogénesis

La carcinogénesis es un complejo proceso multi-secuencia que conduce a la transformación de una célula sana a un estado precanceroso y finalmente a una etapa temprana de cáncer (Trueba *et al.*, 2004). Existen varias teorías de la carcinogénesis que la describen como una “afectación de la diferenciación celular” ó “enfermedad de células madre”. Estas teorías parecen apuntar a un “origen unicelular” de dicha enfermedad (Trosko y Ruch, 2002).

Se han propuesto dos mecanismos para la inducción de cáncer. En el primero, un incremento en la síntesis de ADN y mitosis por carcinógenos no genotóxicos puede inducir mutaciones en células en proceso de división, por medio de errores en la reparación. Las mutaciones pueden ser expandidas por clonación, de un estado inicial preneoplásico a un estado celular neoplásico (Guyton y Kensler, 1993). El segundo mecanismo apunta a un equilibrio entre la proliferación y muerte celular. Si el daño a la célula es muy grande, existen procesos que eliminan las células alteradas de forma selectiva. Este proceso recibe el nombre de apoptosis. Durante la apoptosis, que es un proceso fisiológico normal, las células inician un mecanismo de suicidio programado que conduce a un conjunto de cambios morfológicos (Hengartner, 2000).

Durante la proliferación celular, la proteína p53 juega un papel primordial de control de integridad del ADN (Oren, 2003). Desencadena mecanismos que eliminan por ejemplo, las bases oxidadas de ADN que causan mutación. Cuando el daño celular es muy grande, p53 desencadena la muerte celular por apoptosis. La apoptosis descontrolada puede ser perjudicial para un organismo vivo, ya que destruye las células sanas (Hussain *et al.*, 2003). Por lo tanto, existe un mecanismo de

regulación que consiste de factores pro-apoptóticos (e.g. p53) y anti-apoptóticos. El proceso carcinogénico puede ser descrito como un desequilibrio entre la proliferación y muerte celular, a favor de la proliferación celular.

Además de estos mecanismos, se ha propuesto que la comunicación intercelular mediante uniones tipo “gap” (GJIC) también juega un papel importante en el control de la regulación del crecimiento celular, diferenciación y apoptosis de las células madre (Trosko, 2003). Diversos estudios de biología molecular han mostrado que existen genes activados (oncogenes) o inactivados (genes supresores de tumores), que contribuyen a la expansión clonal de la célula madre iniciada. Una serie de investigaciones sugieren que las células tumorales con oncogenes activados tienen disfuncionalidad GJIC. Recientes descubrimientos han ayudado a generar la teoría “oncogén/gen supresor de tumores”. La teoría más reciente es la denominada integradora o teoría del cáncer como “enfermedad de la homeostasis” (Trosko, 1993).

El desarrollo del cáncer es un proceso multietapa. La carcinogénesis química interfiere en varios estadios del proceso y actúa a través de modificaciones en eventos celulares o moleculares. La participación de los químicos en la carcinogénesis es muy diferente, por lo que se han introducido los términos “genotóxico” y “epigenético” (no genotóxico). Los agentes genotóxicos usualmente son químicos que actúan directamente en el ADN dañándolo, promoviendo mutaciones y/o cambios clastogénicos. La segunda categoría de compuestos carcinógenos (no-genotóxicos) actúan mediante mecanismos no relacionados o relacionados de forma indirecta con el ADN. Estos últimos modulan el crecimiento y muerte celular, sin embargo su modo de acción aun no es claro.

Un proceso multi-etapa como lo es el desarrollo del cáncer, se caracteriza por la acción acumulativa de múltiples eventos en una sola célula y puede ser descrito por tres estadios: iniciación, promoción y progresión. Las ERO/ERN pueden actuar en las tres etapas de la carcinogénesis (Klaunig y Kamendulis, 2004). Los tres estadios se muestran en la **Fig. 5**.

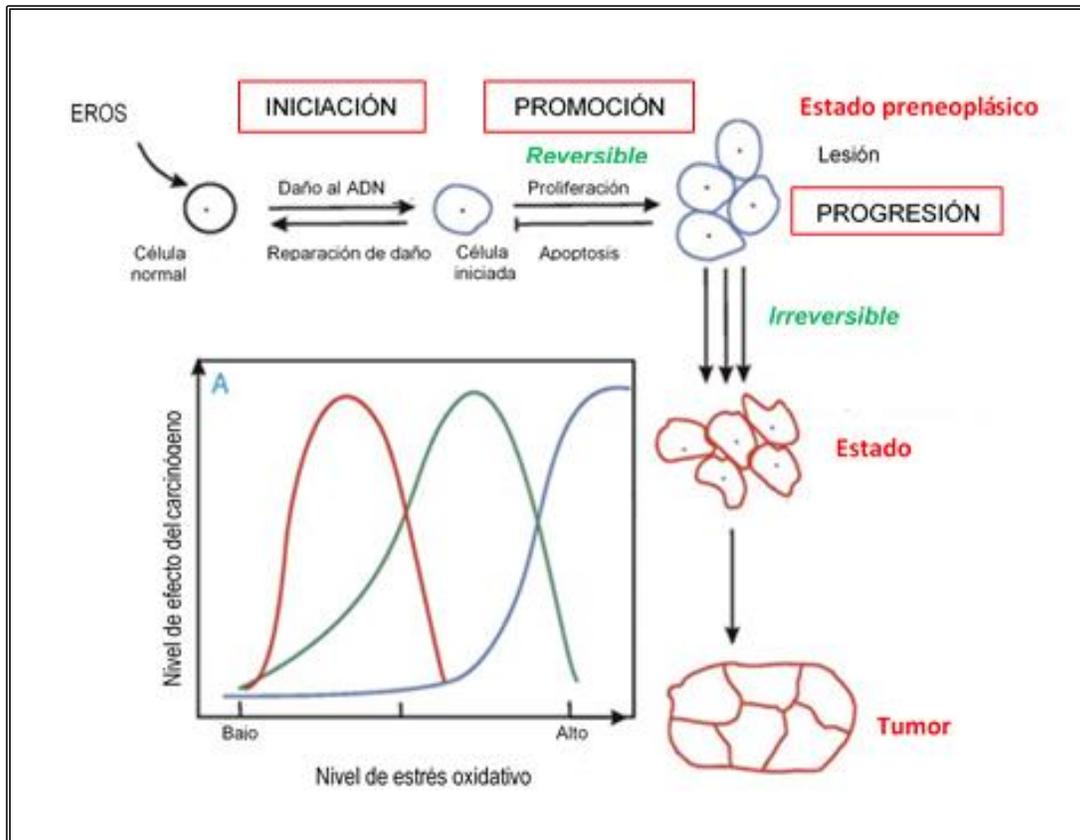


Figura 5.- Modelo de carcinogénesis de tres etapas y efecto del nivel de carcinógeno vs. nivel de radicales libres. Adaptado y modificado de Valko *et al.*, (2006)

La etapa de **iniciación** implica una mutación no letal en el ADN, la cual produce una célula alterada que requiere al menos de una etapa de síntesis para fijar el daño (e.g. 8-OH-G). Si las células en división son dañadas por cualquier razón, son capaces de interrumpir temporalmente su ciclo celular ya sea en G1, S ó G2 reparar el daño y continuar la división. Varios estudios en tumores benignos revelan una relación directa entre el tamaño del tumor y la cantidad de aductos 8-OH-G formados, la concentración de estos aductos podría determinar la transformación de un tumor benigno a maligno (Loft y Poulsen, 1996).

El estado de **promoción** se caracteriza por una expansión clonal de las células iniciadas por inducción de la proliferación celular y/o inhibición de la muerte celular programada (apoptosis). Este proceso origina la formación de una lesión focal identificable. Este estadio es dosis-dependiente, requiere continuamente la presencia de un estímulo que promueva el tumor, y es por lo tanto un

proceso reversible (Loft y Poulsen, 1996). Muchos promotores tumorales tienen un fuerte efecto inhibitorio sobre los sistemas de defensa antioxidantes celulares, tales como SOD, catalasa, glutatión, etc. Mientras que un alto nivel de estrés oxidativo es citotóxico a la célula y detiene la proliferación mediante la inducción de la apoptosis o incluso necrosis, un bajo nivel de estrés oxidativo puede estimular la división celular en la etapa de promoción y así estimular el crecimiento del tumor (Dreher y Junod, 1996). Esto implica que la producción de ERO durante esta etapa de la carcinogénesis es la línea principal de promoción de tumores.

La **progresión** es la tercera y última etapa del proceso carcinogénico. Esta etapa implica cambios celulares y moleculares que se producen desde el estado preneoplásico al neoplásico. Esta etapa es irreversible y se caracteriza por la acumulación de daño genético adicional que conduce a la transición de una célula benigna a maligna. Esta etapa se caracteriza por la inestabilidad genética y pérdida de la integridad cromosómica.

Un paso importante en el crecimiento de cualquier tumor es la generación de nuevos suministros sanguíneos que alimenten las células malignas (Carmeliet, 2000). La angiogénesis es un proceso de múltiples pasos que implica la degradación de la membrana basal de las células endoteliales, migración de células endoteliales al estroma perivascular y capilar de germinación. Anteriormente se sabía que el supresor de tumores p53 regulaba el proceso de angiogénesis a través de la activación de genes que inhibían la vascularización y la represión de genes que promovían el crecimiento. Sin embargo, con la identificación de p63 y p73 la regulación de la angiogénesis se ha vuelto más compleja.

3.2. Cáncer de colon

3.2.1. Incidencia y factores de riesgo

El cáncer de colon es un problema importante de salud pública a nivel mundial dada su incidencia y mortalidad. Se estima que el 5% de las personas desarrollarán cáncer en los próximos años, afectando de igual forma a hombres y mujeres (Pellegrini *et al.*, 2011).

La incidencia del cáncer de colon en México se ha triplicado en los últimos 10 años. Cifras del compendio de cáncer de la Secretaría de Salud revelan que cada día fallecen siete mexicanos por tumores en el colon, razón por la cual este padecimiento ha sido catalogado por las autoridades de salud como el segundo tipo de cáncer más agresivo en el país (INEGI, 2014).

El cáncer de colon es una patología que involucra tanto cambios genéticos como epigenéticos. Los cambios genéticos pueden ser somáticos y germinales, y definen los dos patrones observados: los síndromes esporádicos y los hereditarios. Los casos esporádicos cubren el 75 a 80% y son el resultado de acumulación de mutaciones somáticas en oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN. Dichas mutaciones probablemente son el resultado de factores ambientales, de dieta y envejecimiento. Se desarrolla en personas sin antecedentes familiares y mayores de 50 años. Los casos hereditarios se presentan en el 10% de los casos totales. Dentro de ellos encontramos la poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el síndrome hereditario no poliposo (HNPCC o síndrome de Lynch) (Pellegrini *et al.*, 2011).

3.2.2. Fisiología e histología del epitelio del colon

La función principal del epitelio intestinal del colon es actuar como una barrera selectiva. Así, permite la absorción de nutrientes de la dieta, electrolitos y agua desde el lumen intestinal hacia el interior celular y evita la entrada de sustancias perjudiciales, incluyendo antígenos extraños, microorganismos y sus toxinas (Groschwitz y Hogan, 2009). El epitelio del colon es simple columnar con invaginaciones en forma de dedo que se introducen en el tejido conectivo subyacente de la lámina propia para formar una unidad básica funcional, la cripta de Lieberkühn (Humphries y Wright, 2008) (**Fig. 6**).

Dentro de la cripta existen: los colonocitos, las células caliciformes, las endocrinas secretoras de hormonas peptídicas y las de Paneth, que principalmente se localizan en el intestino delgado, pero ocasionalmente también pueden ser encontradas en el colon ascendente (Humphries y Wright, 2008). Los colonocitos, las células endocrinas y las caliciformes se localizan en la parte superior de la cripta y se forman a partir de células madre multipotenciales localizadas en la base de la cripta. Las células madre se van auto-renovando por divisiones asimétricas, que dan lugar a una nueva célula madre y a una célula progenitora.

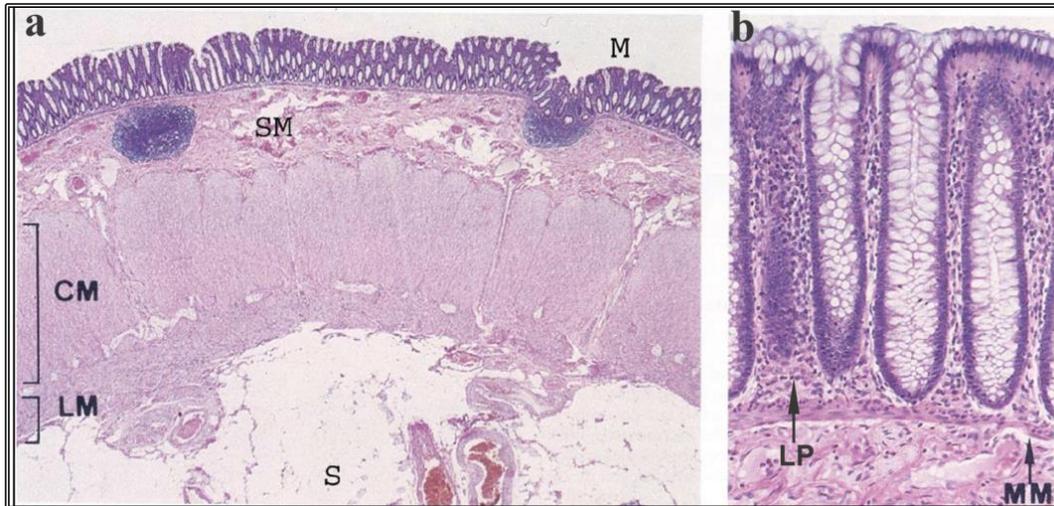


Figura 6.- Histología del colon Adaptado de Rodríguez (2013).

a) Representación de las diferentes capas presentes en la pared del colon (tinción hematoxilina-eosina): mucosa (M), integrada por el revestimiento epitelial superficial y que contiene las criptas de Lieberkühn; submucosa (SM) caracterizada por la presencia de vasos sanguíneos y linfáticos; la muscular, formada por una capa circular interna (CM) y una capa longitudinal externa (LM) y por último, la serosa (S). b) Ampliación de la mucosa del colon, donde destacan las criptas de Lieberkühn. Entre la mucosa y la submucosa hay una fina capa de fibras musculares denominada muscular de la mucosa (MM), que puede verse con claridad en la ampliación. Por último las criptas de Lieberkühn se encuentran sostenidas sobre tejido conjuntivo, denominado lámina propia (LP)

Las células progenitoras están destinadas a diferenciarse en las células de la pared de la cripta a medida que van migrando hacia la parte superior de la misma. Por otro lado, las células Paneth cuando están presentes, se diferencian migrando hacia la base de la cripta donde residen situándose por debajo de las células madre (Khalek *et al.*, 2010)

Los colonocitos o células de absorción constituyen el 80% del epitelio intestinal. Están altamente polarizados y se caracterizan por la presencia en la superficie apical de microvellosidades que constituyen un borde en cepillo que da al lumen del intestino. Las células epiteliales están conectadas unas a otras a través de distintos tipos de uniones. Esta integridad estructural mantiene una polaridad apical-basolateral y regula el flujo de agua y electrolitos. Una capa de glicoproteínas cubre el borde en cepillo actuando como barrera que limita el paso desde la luz del intestino a proteínas y microorganismos (Groschwitz y Hogan, 2009). Las células caliciformes representan del 4-16% del total de las células de las paredes del colon y secretan una barrera protectora de mucus, principalmente constituida por mucina, que protege frente a posibles daños y actúa como lubricante.

Las células endocrinas y las células Paneth constituyen menos del 1%, secretan respectivamente hormonas gastrointestinales (serotonina, sustancia P y secretinas) y lisozimas defensivas o antimicrobianos que controlan la flora colónica (Circu y Aw, 2011). Las células epiteliales del intestino se renuevan cada 3-5 días aproximadamente, constituyendo uno de los tejidos con mayor proliferación del organismo. Este proceso de continua renovación del epitelio está controlado por señales de proliferación y de apoptosis que actúan antagónicamente. Así, la base de la cripta se caracteriza por presentar una activa señalización de proliferación que estimula la mitosis, la migración y la diferenciación de las células madre (expansión clonal) desde la base de la cripta a la parte superior. De este modo las células se van diferenciando a medida que van ascendiendo en el eje basal apical, para dar lugar a las células diferenciadas que constituyen la pared de la parte superior de la cripta. La parte superior de la cripta está controlada por señales que inhiben la proliferación y activan la apoptosis de las células, favoreciendo el recambio de las células diferenciadas más antiguas que son desechadas al lumen (Vereecke *et al.*, 2011) (Fig. 7).

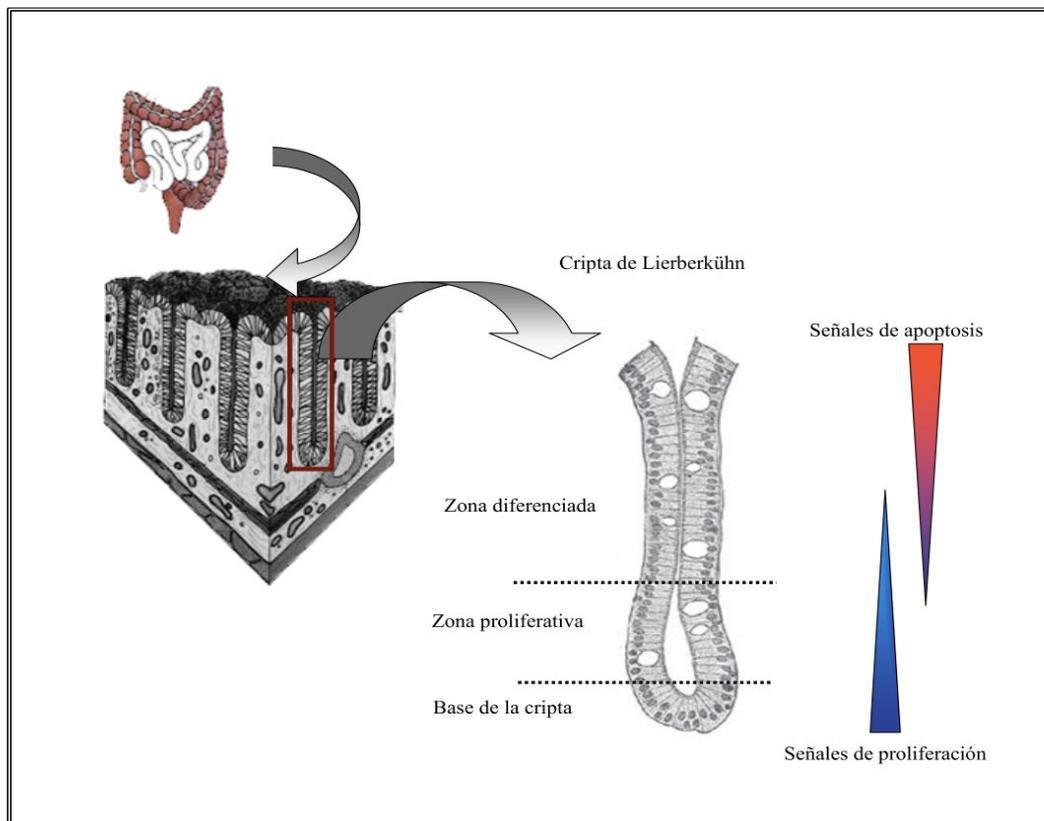


Figura 7.- Efecto antagónico de las señales celulares de proliferación y apoptosis en la cripta del colon. Adaptado de Rodríguez (2013)

3.2.3. Efecto del estrés oxidativo en el epitelio del colon

Numerosos estudios han demostrado que los desequilibrios redox en la mucosa intestinal producidos por algunos tóxicos disminuyen los niveles del glutatión (GSH) celular y de las defensas antioxidantes, aumentando en consecuencia la generación de las ERO intracelulares (Circu y Aw, 2011). Estos desequilibrios pueden comprometer la integridad de la barrera intestinal tanto directa como indirectamente. Por un lado, el daño directo producido por el exceso de ERO causa la formación de peróxidos lipídicos y de grupos carbonilos que pueden llegar a romper las uniones de las membranas celulares (Rezaie *et al.*, 2007). Por otro lado, las ERO's pueden modular las vías de señales sensibles a cambios redox aumentando la tasa de apoptosis (Perricone *et al.*, 2009).

3.2.4. Carcinogénesis de colon

El estrés oxidativo y la inflamación son dos de los más importantes factores de riesgo del cáncer y en específico el de colon. Estudios epidemiológicos muestran que más del 40% de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal desarrollan cáncer. Durante la inflamación, los mastocitos y leucocitos son dirigidos al sitio dañado, lo que conduce a un "estallido respiratorio" debido a un incremento en el consumo de oxígeno, generando un aumento y acumulación de las EROS liberadas en el área dañada (Hussain *et al.*, 2003).

El concepto actual de carcinogénesis de colon implica una cascada de fallos genéticos que afectan a genes reparadores del ADN, oncogenes y genes supresores de tumores. Vogelstein *et al.*, (1988) propuso un modelo que comienza con la displasia del epitelio normal, seguido de la formación de un adenoma temprano, adenoma tardío, carcinoma y metástasis; dichos cambios son causados por alteraciones genéticas que tardan normalmente décadas en producirse, de ahí la frecuencia de aparición de la patología en edad avanzada (**Fig. 8**).

Vogelstein *et al.*, (1998) consideraron que la acumulación de todas las mutaciones son más importantes que el orden en el que se generen. La primer mutación en el epitelio normal es la delección de un fragmento del brazo largo del cromosoma 5 que incluye al gen APC (Adenomatous Poliposis Coli). La inactivación de la proteína APC es el paso necesario para el inicio de la proliferación celular, la cual puede dar lugar a adenomas pequeños (<1 cm).

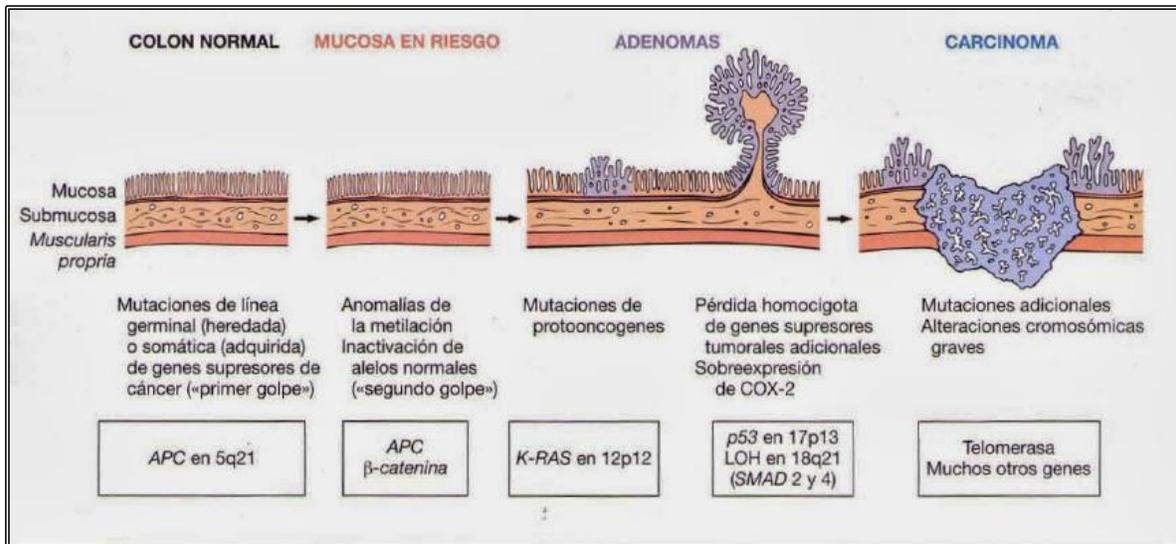


Figura 8.- Cambios morfológicos y moleculares en la secuencia adenoma-carcinoma. Adaptado de Rodríguez (2013).

En ellos, la hipometilación del ADN favorece la expresión aberrante de genes previamente silentes, se producen aneuploidías como resultado de la distribución de cromosomas durante la mitosis y pérdidas alélicas de genes supresores.

En adenomas grandes mayores de 1 cm aparece hasta en un 50% de casos, una mutación en el gen *K-Ras* que mutado origina una proteína atrapada en su estado activo, que envía de forma continua señales mitóticas que impiden la apoptosis. Esto favorece el crecimiento del adenoma y la posible expansión clonal de alguna célula inicialmente alterada. En esta fase, se puede observar sobreexpresión del oncogén *bcl-2* en un 70% y alteraciones en *c-myc* (**Fig. 8**). A medida que progresa la evolución desde adenoma, se pierden algunas alteraciones pero persisten las de *K-ras* y *APC*, se producen deleciones en 18q y 17p entre otras regiones que implican los genes *DCC* (Deleted in Colon Carcinoma) y *p53*. La mutación en estos 2 genes provoca la aparición de carcinomas invasivos. Alteraciones posteriores en *Rb* o *c-myc* confieren malignidad. Por tanto, el comportamiento clínico del cáncer de colon resulta de interacciones a muchos niveles (Leslie y Carey, 2002).

La progresión de la carcinogénesis de colon involucra acumulación de mutaciones genéticas, así como también la alteración de diversos eventos morfológicos en la célula. La progresión de esta

enfermedad se caracteriza por distintos cambios histológicos: hiperplasia de las criptas colónicas, displasia, adenoma, adenocarcinoma y metástasis (Roncucci *et al.*, 2000).

3.2.5. Quimioprevención en cáncer de colon

El término “quimioprevención de cáncer” fue acuñado por el Dr. Michel B. Sporn en 1976 y lo definió como “el uso de agentes específicos para revertir, suprimir o prevenir el proceso carcinogénico a cáncer invasivo (Sporn, 1976). Los focos de criptas aberrantes (FCA), han sido utilizados como biomarcadores de cáncer de colon en diversos estudios de quimioprevención con animales (Zamorano *et al.*, 2008). Los focos de criptas aberrantes displásicos son agrupaciones microscópicas de un pequeño número de criptas anormales y son considerados el estadio detectable más temprano en la formación del proceso carcinogénico (Humphries y Wright, 2008).

El uso de FCA como biomarcadores en roedores, ha tenido éxito en los estudios de quimioprevención debido principalmente al hecho de que son: (a) lesiones preneoplásicas; (b) morfológicamente distinguibles de las criptas normales; (c) inducibles en varios modelos animales; (d) similares entre humanos y roedores; (e) rápidamente detectables; (f) fácilmente modificados por cambios genéticos o intervenciones farmacológicas/dietéticas; (g) susceptibles a ensayos experimentales de corto plazo; (h) clasificables según su progresión; y (i) generalmente se presentan poblaciones grandes (Raju, 2008).

Diversos estudios han evidenciado similitudes entre el modelo de inducción de carcinogénesis química y el cáncer de colon humano a nivel molecular. En ambos casos, se observa expresión aberrante del gen APC, además de mutaciones y localización celular alterada de β -catenina y desregulación demostrada de algunas vías de señalización, como es el caso del oncogén celular de mielocitomatosis ciclina D1 y quinasas dependientes de ciclina. Al igual que como se ha descrito en el cáncer de colon humano, el sistema de inducción química también promueve un funcionamiento desregulado del proto-oncogén K-ras y niveles elevados de óxido nítrico sintetasa y ciclooxigenasa-2 (Roncucci *et al.*, 2000).

Desde hace dos décadas, se utilizan potentes carcinógenos específicos de colon como el 1,2-dimetilhidracina (DMH) y su metabolito el azoximetano (AOM), para inducir la formación de FCA en roedores (Raju, 2008). Las lesiones pre-neoplásicas producidas por estos carcinógenos, como ya se

mencionó anteriormente comparten muchas características histopatológicas con los tumores humanos (Corpet y Pierre, 2005). Este hecho ha permitido utilizar este modelo en estudios de toxicidad y control/prevención del cáncer. De esta manera, se ha estudiado el efecto quimiopreventivo de numerosos compuestos en relación con su capacidad para suprimir o disminuir la formación de los focos de criptas aberrantes (FCA). En este tipo de experimentos, el carcinógeno suele ser administrado mediante inyección intraperitoneal. Cuando el carcinógeno es metabolizado en el hígado produce un compuesto genotóxico y cancerígeno, el metilazoximetanol (**Fig. 9a**). Este último, es muy inestable y genera a su vez con gran facilidad un subproducto de alta reactividad electrofílica, el ion metildiazonio que induce estrés oxidativo en el hígado y en el colon (Al-Numair *et al.*, 2011). Como consecuencia del metabolismo del AOM se produce una gran cantidad de mutaciones en el ADN que dan paso a la aparición de los FCA en el colon de los roedores (Raju, 2008).

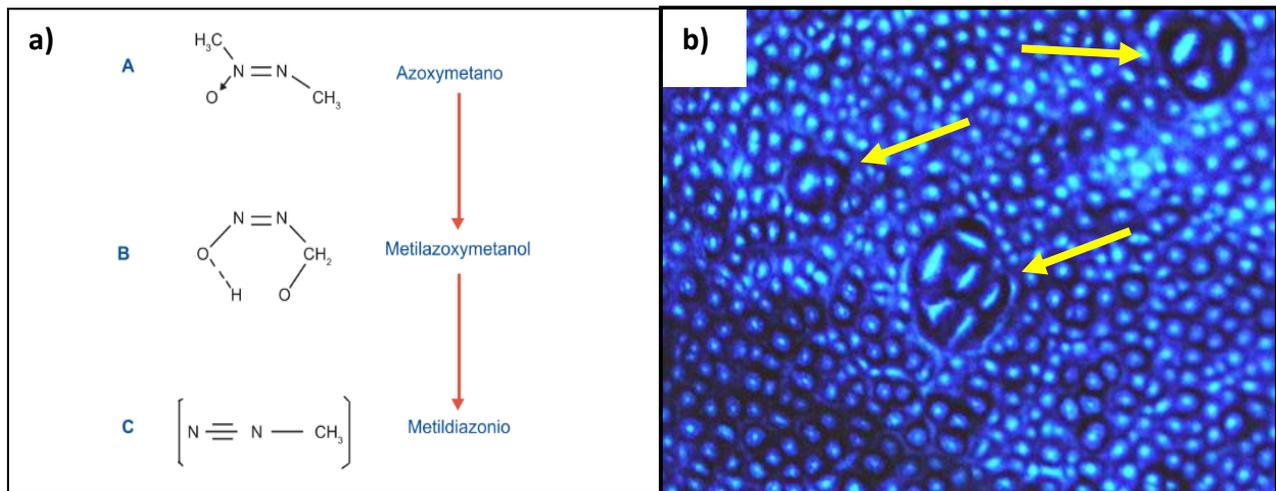


Figura 9.- a) Transformación del azoximetano. **b)** Micrografía a $\times 10$ de mucosa de colon de ratón tratado con AOM, se observan 3 FCA. Modificado de Neufert *et al.*, (2007).

Los FCA presentan las siguientes características distintivas: 1) muestran un mayor tamaño que las criptas normales que los rodean, 2) poseen un espacio pericriptal más grande que los separa de las criptas normales y 3) a menudo poseen un epitelio engrosado que se tiñe más, 4) generalmente poseen aberturas ovals en vez de circulares como en el caso de las criptas normales (McLellan y

Bird, 1988). En la **Fig. 9b** se muestra una micrografía donde se pueden apreciar focos de criptas aberrantes (FCA).

En el modelo del AOM se suelen utilizar ratones de la cepa ICR/Ha, BALB/cj o AKR/J de aproximadamente 5-6 semanas de vida (Rosenberg *et al.*, 2009). Dependiendo de la susceptibilidad de la cepa de ratones empleada, se utilizan dosis de AOM entre 7 y 15 mg/kg, aunque también se reporta desde 5 mg/kg (Ching *et al.*, 2011; Lai *et al.*, 2011). Cuando se pretende determinar la eficacia de prevención de una dieta frente a la aparición y desarrollo de los FCA, las inyecciones son practicadas al mismo tiempo o después de comenzar a alimentar a los animales con la dieta objeto de estudio (Zamorano, 2008).

Se han empleado modelos de AOM de corto plazo (6-8 semanas) y largo plazo (12-54 semanas). La severidad de las lesiones pre-neoplásicas va aumentando en función del tiempo que se prolongue el tratamiento con el AOM, así como de la dosis administrada, aunque también influyen otros factores como el sexo, la edad y la especie del animal. De forma general, entre las 2 y las 8 semanas después de la última inyección, una parte de las células epiteliales del colon comienzan a entrar en fase de iniciación, observándose una enorme población de FCA (que presentan de 1-3 criptas por foco). En las semanas siguientes, en torno a las 12 semanas después de la última inyección, las criptas aberrantes continúan creciendo clonalmente y expandiéndose hacia morfologías que permiten clasificar a los FCA como intermedios, con 4-6 criptas por foco. En este momento, la morfología de los FCA se clasifica en la fase de promoción. Finalmente, a partir de las veinticuatro semanas después de la última inyección, la incidencia del carcinógeno alcanza el máximo encontrándose lesiones avanzadas, correspondientes al estado de progresión del cáncer de colon (Raju, 2008).

3.2.5.1. Estudios de quimiopreención en cáncer de colon

Durante la progresión del cáncer de colon, procesos moleculares específicos han sido el objetivo de la quimiopreención, incluyendo inflamación crónica, vías de señalización de proliferación, diferenciación y apoptosis. Así como también los receptores de factores de crecimiento, involucrados en angiogénesis y metástasis (Pan *et al.*, 2011).

En los últimos años ha cobrado gran importancia la investigación enfocada en el potencial de sustancias dietarias tanto para la prevención como para el control de cáncer de colon a través de estrategias de quimioprevención. Estudios epidemiológicos y de laboratorio sugieren que el consumo de frutas y vegetales está relacionado con la disminución del riesgo de cáncer de colon. Muchos compuestos naturales se han aislado y se ha demostrado que presentan propiedades promotoras de salud. Entre los compuestos que sobresalen en los estudios de quimioprevención de cáncer de colon están los flavonoides, flavolignanós, proantocianidinas, compuestos fenólicos, carotenoides y ácidos grasos (Pan *et al.*, 2011). En otros estudios se ha establecido una probable correlación entre la actividad antioxidante y la inhibición de la proliferación (Wang *et al.*, 2011).

Otra fuente dietaria en la que se han enfocado algunos trabajos sobre quimioprevención de cáncer de colon son las proteínas. La actividad antioxidante de las proteínas depende fundamentalmente de su composición de aminoácidos y estructura terciaria. En general, la hidrólisis puede incrementar la actividad antioxidante de las proteínas, mediante la liberación de aminoácidos y péptidos con actividad antioxidante (De Mejia y Dia, 2010).

3.3 Péptidos bioactivos

Las proteínas de los alimentos son consideradas como fuente de energía y de aminoácidos esenciales, necesarios para el crecimiento y mantenimiento de las funciones fisiológicas. Recientemente ha aumentado el interés por identificar y caracterizar péptidos bioactivos de plantas y animales. Estos son considerados fragmentos específicos de proteínas que se encuentran inactivos dentro de la secuencia de las proteínas nativas, pero que después de su liberación por hidrólisis, pueden ejercer varias funciones fisiológicas (Sarmadi y Ismail, 2010).

Basado en sus propiedades estructurales, composición de aminoácidos y secuencia, estos péptidos pueden ejercer varios efectos, ya que se ha observado que pueden funcionar como: opioide, quelante, inmunomodulatorio, antimicrobiano, antioxidante, antitrombótico, hipocolesterolémico y antihipertensivos. Sin embargo, se ha encontrado que algunos péptidos poseen propiedades multifuncionales (Meisel y FitzGerald, 2003).

Los péptidos bioactivos pueden ser liberados de las proteínas por hidrólisis enzimática (exógenas o endógenas), durante el procesamiento de alimentos, por fermentación o durante la digestión gastrointestinal (Korhonen y Pihlanto, 2003).

3.3.1. Péptidos con actividad antioxidante

La mayoría de los péptidos antioxidantes derivados de proteínas de alimentos tienen pesos moleculares entre 500 a 1800 Da (Je *et al.*, 2005; Je *et al.*, 2004). Generalmente contienen de 5 a 16 residuos de aminoácidos (Chen *et al.*, 1995) y son considerados seguros, de bajo costo y de fácil absorción. Se sabe que en general los 20 aminoácidos pueden interactuar con los radicales libres, si la energía del radical es alta (e.g., radical hidroxilo). Sin embargo, los aminoácidos libres no se han encontrado como antioxidantes efectivos en alimentos y sistemas biológicos (Chan y Decker, 1994). La alta actividad de los péptidos comparada con los aminoácidos libres, es atribuida a las únicas propiedades físicas y químicas conferidas por su secuencia de aminoácidos, especialmente por la estabilidad de los radicales del péptido resultante (Elias *et al.*, 2008).

El mecanismo de acción exacto de la actividad de los péptidos antioxidantes no se conoce. Sin embargo, varios estudios han demostrado que son inhibidores de la peroxidación lipídica, secuestradores de radicales libres (Moure *et al.*, 2006) y quelantes de metales de transición (Rajapakse *et al.*, 2005). También se ha observado que los péptidos antioxidantes mantienen a salvo a células de daño por ROS a través de la inducción de genes (Fu, 2003).

Los péptidos con actividad antioxidante a menudo incluyen residuos de aminoácidos hidrofóbicos como Val o Leu en el extremo N-terminal del péptido y Pro, His, Tyr, Trp, Met y Cys en su secuencia (Chen *et al.*, 1995; Elias *et al.*, 2008). Los aminoácidos hidrofóbicos pueden incrementar la presencia de los péptidos en la interfaz agua-lípido, y por lo tanto facilitar el acceso para secuestrar los radicales libres generados en la fase lipídica (Ranathunga *et al.*, 2006). Aunque la relación estructura – actividad antioxidante de los péptidos que contiene His no se ha definido claramente, la actividad se puede atribuir a su capacidad de donar hidrógeno, atrapar el radical peroxil lipídico, y/o a la habilidad de quelar metales del grupo imidazol (Chan y Decker, 1994).

Por otro lado, los aminoácidos con residuos aromáticos pueden donar protones o electrones a los radicales deficientes, lo que mejora las propiedades antioxidantes de los péptidos (Rajapakse *et al.*,

2005). El grupo SH de la cisteína tiene una acción crucial independiente debido a su interacción directa con los radicales (Qian *et al.*, 2008)

En adición a la presencia del propio aminoácido, su correcta posición en la secuencia del péptido juega un papel importante en la actividad de este. Saito *et al.*, (2003) reportan que un cambio en el arreglo de los aminoácidos en la secuencia de un tripéptido origina actividades antioxidantes diferentes. Por otro lado, la configuración del péptido también puede afectar la actividad antioxidante. Chen y Muramoto (1996), encontraron que la sustitución de L-His por D-His en un péptido antioxidante conduce a una reducción de la actividad. La correcta posición del grupo imidazol en un factor clave en la actividad antioxidante.

Aparte de lo que se ha mencionado, otros factores pueden influenciar la actividad antioxidante de los péptidos, por ejemplo las condiciones operacionales aplicadas en la elaboración del aislado proteico, grado de hidrólisis, tipo de proteasa, estructura y concentración del péptido (Sarmadi y Ismail, 2010).

3.4. *Spirulina* (*Arthrospira maxima*)

La *Spirulina* es una cianobacteria clasificada como alga verde. Para su cultivo comercial, además de requerir periodos prolongados de luz natural, se necesitan temperaturas superiores a 35°C para su óptimo crecimiento, por lo que este cultivo se restringe a zonas tropicales y subtropicales (Richmond y Cheng-Wu, 2001). La *Spirulina* ha sido producida en gran escala para ser utilizada como suplemento alimenticio, fuente de energía y productos farmacéuticos, bioquímicos y fertilizantes (Henrikson, 1994).

La *Spirulina* tiene alto valor nutricional debido a su contenido de nutrientes esenciales como: vitaminas, minerales, proteínas y ácidos grasos poliinsaturados (Miranda, 1998). A continuación se describe a detalle la composición de la *Spirulina*.

Proteínas: Contiene entre 55 y 70% de proteína por peso seco, dependiendo de la fuente (Phang *et al.*, 2000). Contiene todos los aminoácidos esenciales, aunque tiene cantidades reducidas de metionina, cisteína y lisina, comparado con proteínas de carne, huevo o leche. Sin embargo, en *Spirulina* el contenido de estos aminoácidos es superior al de todas las proteínas vegetales.

Ácidos grasos esenciales: La *Spirulina* tiene una alta cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's), 1.5 – 2.0% del 5-6% total de lípidos. En particular, es rica en ácido γ -linolénico (ALA, 36% del total de PUFA's), también provee ácido linoleico (LA, 36% del total), ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (AA).

Vitaminas: La *Spirulina* contiene vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (nicotinamida), B6 (piridoxina), B9 (ácido fólico), B12 (cianocobalamina), vitamina C, vitamina D y vitamina E.

Minerales: Es una fuente rica de potasio, también contiene calcio, cromo, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fosforo, selenio, sodio y zinc.

Pigmentos fotosintéticos: La *Spirulina* contiene pigmentos que incluyen: clorofila a, xantofilas, beta caroteno, equinenona, mixoxantofila, zeaxantina, cantaxantina, diatoxantina, 3-hidrixiquinona, beta-criptoxantina, oscilaxantina, además de las ficobiliproteínas (ficocianina y aloficocianina).

Estudios clínicos sugieren que los compuestos de la *Spirulina* tienen funciones terapéuticas, por ejemplo: los polisacáridos (Ca-Sp) presentan efectos antiinflamatorios (Matsui y Muizzuddin, 2003), los ácidos grasos tienen propiedades antibacterianas y antifúngicas (Borowitzka, 1995). También calcio-spirulan, que inhibe la metástasis pulmonar en los seres humanos (Mishima *et al.*, 1998). Otras características que se han atribuido a la biomasa de la *Spirulina* son reducción de colesterol en sangre, inactivación parcial del VIH (Hirahashi *et al.*, 2002), estimulación del sistema inmunológico y lactobacilos intestinales, reducción de hiperlipidemia, obesidad y efectos negativos de la radiación, drogas y metales pesados (Costa, 2004; Cossi *et al.*, 2003). A la *Spirulina* también se le ha atribuido actividad antioxidante debido a su contenido de ácidos fenólicos, tocoferoles, β -caroteno (Miranda, 1998) y ficobiliproteínas (Besco y Fresno, 2001).

3.4.1. Caracterización y estructura de las ficobiliproteínas

3.4.1.1. Ficobilisomas

Los ficobilisomas son complejos supramoleculares (3-7 MDa) presentes en cianobacterias y algas rojas que se ensamblan en forma de estructuras regulares en la superficie externa de las membranas tilacoidales (**Fig. 10 a, b**). Su función es capturar energía lumínica que será luego

traspasada a la clorofila durante la fotosíntesis (Glazer, 1989). Los ficobilisomas están organizados en dos dominios estructurales, el núcleo y las barras (**Fig. 10 c**). Cada uno de estos dominios contiene polipéptidos pigmentados y no pigmentados (Grossman, 2003).

3.4.1.2. Ficobiliproteínas

Todos los ficobilisomas tienen cromoproteínas (ficobiliproteínas), aloficocianina (APC), ficocianina (PC) y en algunos casos ficoeritrina (PE) o ficoeritrocianina (Grossman, 2003). El color de las ficobiliproteínas es consecuencia de los cromóforos asociados con las apoproteínas. Los cuales son cadenas tetrapirrólicas abiertas que se unen por enlace tioéter a residuos específicos dentro de la cadena polipeptídica. Los cromóforos pueden ser clasificados de acuerdo a su estructura como ficoeritrobilina (PEB), ficocianobilina (PCB), ficoviobina (PVB) o ficourobilina (PUB) (Jiang *et al.*, 2001).

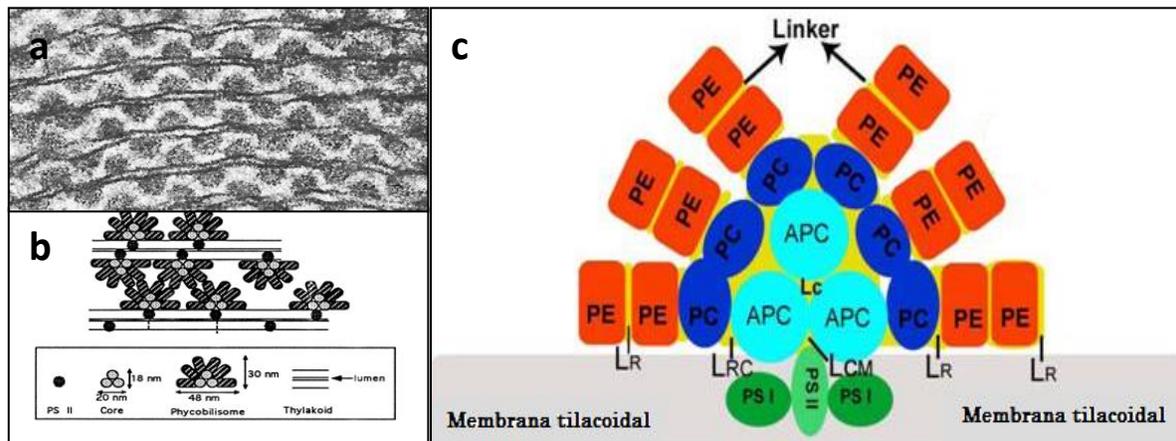


Figura 10.- a) Imagen al microscopio de transmisión electrónica del tilacoide de rhodophyta, mostrando un arreglo regular de los ficobilisomas (Bar: 0.05 μm). **b)** Representación esquemática de la organización de los ficobilisomas en el tilacoide. Fuente: Olive *et al.*, (1997). **c)** Modelo estructural de un ficobilisoma. Los tres círculos azul cielo representan el núcleo tricilíndrico de APC, los dos círculos inferiores se unen a la membrana tilacoidal (rectángulo gris). Seis barras están formadas por PC (círculo azul marino) y PE (círculo rojo). LC, LR, LCM y LRM son los polipéptidos de unión (color amarillo). Adaptado de Guan *et al.*, (2007).

Las ficobiliproteínas presentan actividad antioxidante, la cual es atribuida principalmente a sus grupos cromóforos. La estructura química de la ficocianobilina es similar a la bilirrubina (**Fig. 11**), antioxidante natural en el plasma que se une a la albumina y protege a los lípidos de la oxidación. Este parecido, se debe a que ambas proteínas son sintetizadas a partir de biliverdina (Stocker *et al.*, 1987).

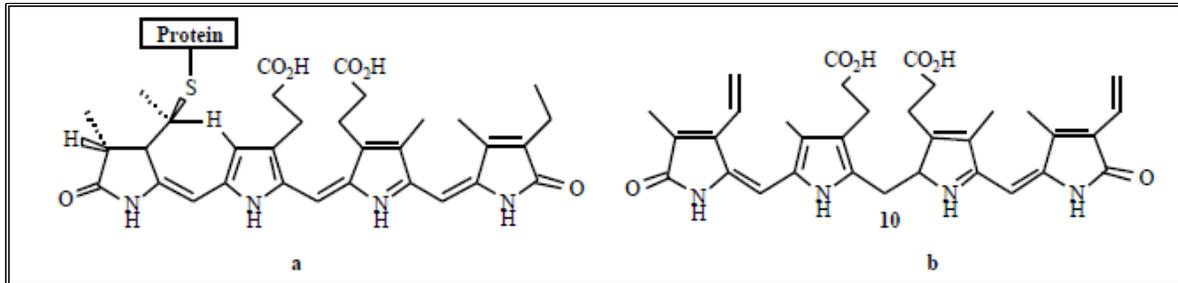


Figura 11.- Estructura química del cromóforo ficocianobilina (a) y bilirrubina (b).

La alta homología en sus secuencias de aminoácidos y sus estructuras cristalinas semejantes, indican que todas las ficobiliproteínas son descendientes de una misma proteína ancestral. La estructura molecular de la PC es similar a la de todas las ficobiliproteínas reportadas (Kikuchi *et al.*, 2000).

El monómero de ficocianina está formado por dos subunidades (α y β), que de acuerdo a la estructura obtenida por cristalografía presentan un plegamiento similar, predominantemente α -hélice y presentan dos dominios (**Fig. 12a**). Un dominio que se pliega de forma similar a la globina y que está compuesto por siete hélices (A, B, E, F, F', G and H), y otro con dos hélices adicionales (X y Y) en el extremo N-terminal de cada cadena (Padyana *et al.*, 2001). El dominio X-Y sirve como pegamento de las dos subunidades (**Fig. 12b**), el ángulo que se forma entre los dos dominios es determinante en la estructura simétrica C₃ de la ficocianina (Kikuchi *et al.*, 2000).

Todas las ficobiliproteínas se generan por el mismo proceso asociativo: ($\alpha\beta$) monómero \rightarrow ($\alpha\beta$)₃ asociación trimérica \rightarrow ($\alpha\beta$)₆ asociación hexamérica \rightarrow barras.

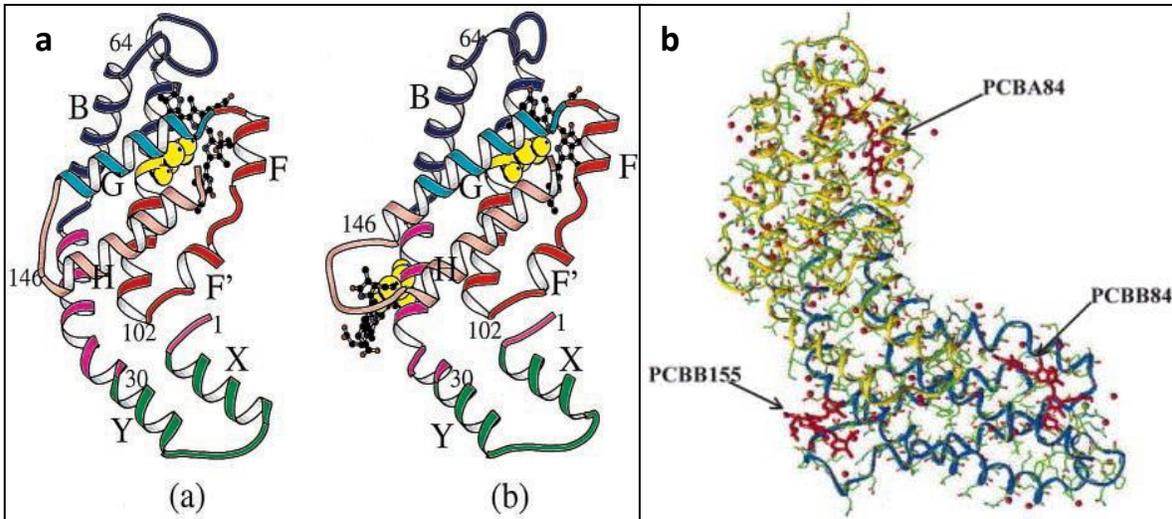


Figura 12. a) Estructura tridimensional de la α -subunidad (a) y β -subunidad (b) de C-ficocianina, los cromóforos se simbolizan con esferas y palos, se muestran ambos dominios de las subunidades. b) Representación esquemática del monómero de ficocianina, la subunidad α en amarillo y la β en azul, las ficocianobilinas se representan en rojo y las moléculas de agua como esferas rojas. Adaptado de Adir *et al.*, (2001).

Los dos primeros pasos de asociación involucran interacciones estables y no requieren proteínas de unión (Adir *et al.*, 2001). Se han identificado zonas de grandes interacciones polares durante la formación de monómeros y trímeros (**Fig. 13**).

Dos trímeros de ficocianina ($\alpha\beta$)₃ se ensamblan cara a cara en hexámero, a través de contactos hechos en las unidades α . Después se agregan como barras a través de contactos en las unidades β . Las barras y núcleo del ficobilisoma contienen diferentes péptidos de unión para su ensamblaje (Sato *et al.*, 2010). La agregación trimérica de las ficobiliproteínas deja un hueco central con un diámetro entre 25 y 50 Å, y se ha propuesto que es donde se localizan los péptidos de unión (Adir *et al.*, 2001).

Las ficobiliproteínas pueden existir en diferentes formas *in vitro* aunque las más comunes son como ($\alpha\beta$)₃ y ($\alpha\beta$)₆, dependiendo de la fuente de obtención, concentración y condiciones de aislamiento (Jiang *et al.*, 2001).

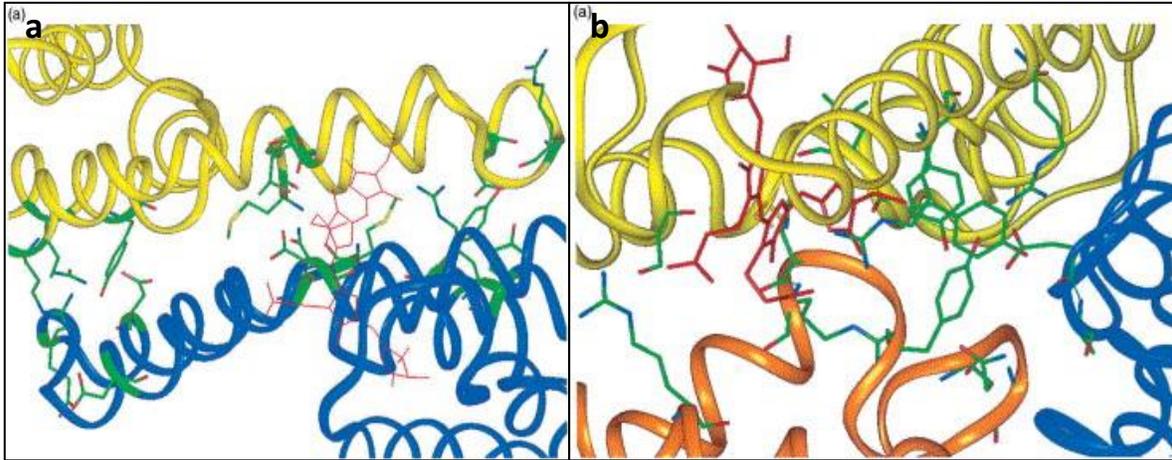


Figura 13.- a) Interfaz de la asociación monomérica en PC. Subunidad α en amarillo, la subunidad β en azul; los residuos formando las interacciones en palos y el cromóforo como líneas rojas. **b)** Interfaz de la asociación trimétrica $(\alpha\beta)_3$ en PC. Subunidad α en amarillo, la subunidad β en azul, la subunidad β' del monómero $(\alpha\beta)$ adyacente en naranja, los residuos formando las interacciones en palos y el cromóforo como líneas rojas. Adaptado de Adir *et al.* (2001).

3.4.1.3. Péptidos de unión en ficobilisomas

Marsac y Cohen (1977), fueron los primeros en demostrar la presencia de varios polipéptidos incoloros por SDS-PAGE en los ficobilisomas de siete especies de cianobacterias. Se estima que de 12 a 15% del total de proteínas que componen el ficobilisoma son péptidos de unión (Gantt, 1980).

Glazer, (1984) propuso un sistema de abreviación para caracterizar a los péptidos de unión. Este sistema de clasificación ampliamente usado, define a los polipéptidos de unión con respecto a su localización y masas moleculares. L_y^x . Se refiere al polipéptido de unión (L) con peso molecular aparente de y kDa, localizado en la posición x en el ficobilisoma, donde x puede ser R (barra), C (núcleo), RC (unión barra-núcleo) o CM (unión núcleo-membrana) (**Cuadro 2**).

Usando este sistema de clasificación, los polipéptidos de unión se pueden dividir en cuatro grupos de acuerdo a su función y localización en el ficobilisoma: Grupo I o polipéptidos L_R , que tienen PM entre 27 y 35 kDa (incluyendo pequeños péptidos de 10 kDa) y participan en el ensamblaje de la estructura periférica de las barras. En este grupo se incluyen los polipéptidos que unen PE/PC de trímeros a hexámeros y su unión con otros hexámeros.

Cuadro 2.- Características de los principales péptidos de unión

Proteína	Símbolo	Aminoácidos	MW (kDa)	pI	Anotación
CpeC	PE _{LR}	285-294	31.8-33.1	9.6	Péptido asociado con PE
CpeD	PE _{LR}	249-255	27.9-28.4	8.2-8.6	Péptido asociado con PE
CpeE	PE _{LR}	244-254	27.1-28.4	9.7	Péptido asociado con PE
PecC	PEC _{LR}	278-279	31.3-31.5	9.6-9.7	Péptido asociado con PEC
CpcC	PC _{LR}	219-291	24.8-32.6	9.5-9.6	Péptido asociado con PC
CpcD	PC _{LR}	70-87	7.8-9.9	9.8-10.5	Asociado con el núcleo
CpcG	L _{RC}	231-279	26.8-31.9	9.3-9.6	Unión barra-núcleo
CpcH	L _{RC}	271-273	30.4-30.8	8.8-9.7	Unión barra-núcleo
Cpci	L _{RC}	288	32.7	8.9	Unión barra-núcleo
ApcC	L _C	66-69	7.7-7.8	10.9-11.4	Péptido asociado con APC
ApcE	L _{CM}	683-1155	76.5-129.8	9.5-9.7	Unión núcleo-membrana

Fuente: Liu *et al.*, (2005), PE: ficoeritrina, PEC: ficoeritrocianina, PC: ficocianina y APC: aloficocianina.

El grupo II, polipéptidos L_{RC} que tienen pesos moleculares entre 25-27 kDa, están involucrados en la unión de las barras al núcleo de APC. El grupo III o polipéptidos L_C, que poseen pesos moleculares pequeños y forman parte de la composición del núcleo, ayudan al ensamblaje de la subestructura del mismo. Finalmente el grupo IV o L_{CM}, con pesos moleculares que varían entre 70 y 120 kDa dependiendo del organismo del que se aísla, están involucrados en la unión del ficobilisoma a la membrana (Liu *et al.*, 2005).

La secuencia de aminoácidos de las proteínas de unión indican que tienen un carácter básico con punto isoeléctrico de 8 a 9, a diferencia de las ficobiliproteínas que son proteínas relativamente ácidas (pI < 5.0). Basados en el análisis de secuencias y experimentos de proteólisis de los polipéptidos de unión, Parbel y Scheer (2000) propusieron un modelo para el ensamblaje de las barras del ficobilisoma. Ellos proponen que los péptidos de unión tienen dos dominios distintos (**Fig. 14**). Se cree que el dominio N-terminal se encuentra en la cavidad central del trímero y es protegido de la proteólisis, mientras el dominio C-terminal sobresale del hexámero.

El trímero de las ficobiliproteínas está compuesto por tres subunidades α y tres β , formando un disco aplanado (~ 11 nm) con una cavidad central. El complejo hexamérico de ficobiliproteínas está

formado por dos trimeros ordenados “cara” a “cara” con una cavidad interna y un diámetro aproximado de 3.5 nm, este espacio es ocupado por péptidos de unión (Liu *et al.*, 2005).

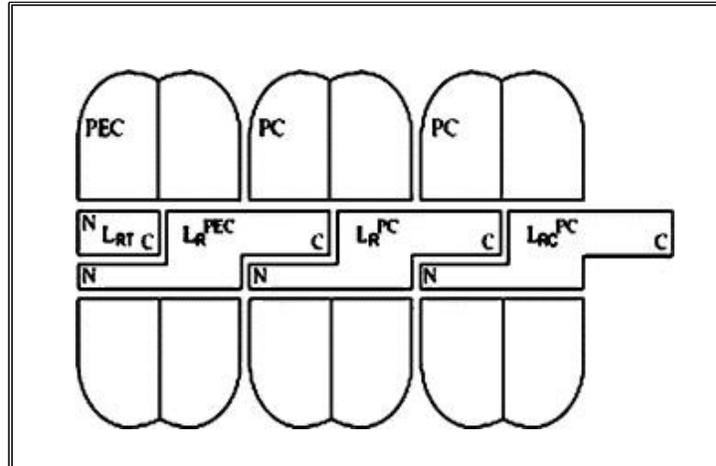


Figura 14.- Modelo de ensamblaje de los péptidos de unión (la barra contiene un hexámero de ficoeritrocianina y dos discos hexaméricos de ficocianina. Las proteínas de unión se generalizan como LRT (péptido de unión terminal de la barra), L_R^{PEC}, L_R^{PC} y L_{RC}^{PC} respectivamente, “N” representa el extremo N-terminal y “C” el C-terminal. Se propone que los polipéptidos de unión sobresalen de un disco del ficobilisoma y entran en el vecino. Adaptado de Parbel *et al.*, (2000).

En la **Fig. 15a**, se comparan los volúmenes de la cavidad interna del hexámero y del péptido de unión. En el núcleo del ficobilisoma también se encuentran péptidos de unión que se localizan en el interior de la cavidad central del trímero de aloficocianina (**Fig. 15b**) (Liu *et al.*, 2005).

Las superficies de las proteínas de unión no se parecen a la de las ficobiliproteínas, ya que estas son más hidrofóbicas. Además de que tienen carga positiva y las ficobiliproteínas carga negativa, esto sugiere que los péptidos de unión y las ficobiliproteínas interactúan por una combinación de múltiples interacciones de carga e hidrofobicidad (Glazer, 1984; Füglistaller y Rübli, 1984; Wilk y Harrop, 1999).

Los péptidos de unión juegan dos funciones en el ficobilisoma: 1) proveen la conexión estructural entre las ficobiliproteínas adyacentes y estabilizan la estructura del ficobilisoma y 2) modulan las propiedades de absorción y fluorescencia, facilitando o participando directamente en la transferencia

de energía de las barras al núcleo y eventualmente a la clorofila contenida en la membrana del tilacoide de las células fotosintéticas.

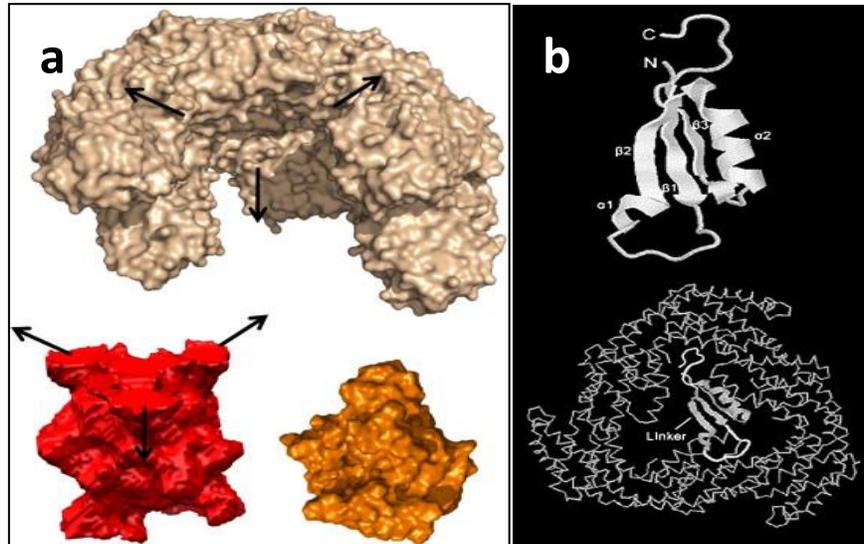


Figura 15.-a) Comparación del volumen de la cavidad hexamérica y el péptido de unión. Se visualiza el volumen de la cavidad central (color rojo) del hexámero de PC (superficie beige, se removieron dos monómeros para exponer la superficie interna) usando el 3V: Voss Volumen Voxelator server. Se calculó el volumen del péptido de unión LR (color naranja) para poder comparar. **b)** En la imagen superior se muestra la estructura terciaria de la proteína de unión L_C^{7-8} en el ficobilisoma y en la imagen inferior el mismo péptido dentro la cavidad central del trímero de aloficocianina. Adaptado de Liron *et al.*, (2011) y Reuter *et al.*, (1999).

El ensamblaje del ficobilisoma es mediado por los péptidos de unión y cada subensamblaje trimérico o hexamérico contiene por lo menos un polipéptido de unión específico. Que determina el tipo, localización y estado de agregación de la ficobiliproteína dentro del núcleo o barra y también modulan las propiedades espectroscópicas (Liu *et al.*, 2005).

3.4.2. Ficobiliproteínas y péptidos de unión en *Spirulina*

En el caso de *Arthrospira maxima* solo están presentes dos ficobiliproteínas. La mayor es la ficocianina (PC), mientras que la aloficocianina (APC) se encuentra en menor cantidad. Juntas representan más del 60% del contenido total de proteína celular (Yan *et al.*, 2010).

La PC está compuesta por dos cadenas α y β con un peso molecular entre 17000 y 19500 Da respectivamente, con un grupo cromóforo unido a la subunidad α (α 84) y dos unidos a la subunidad β (β 84 y β 155) (Liao *et al.*, 2011).

La APC también posee dos subunidades α y β , ambas subunidades tienen un peso molecular de 17000 Da y un grupo cromóforo unido al residuo 81 (RCSB, Protein Data Bank). La PC presenta una absorción máxima a 620 nm, los grupos cromóforos le confieren un color azul brillante y fluorescencia roja (Sekar y Chandramohan, 2007). APC presenta una absorción máxima a 652 nm, presenta color púrpura y fluorescencia roja (Eriksen, 2008). Se ha observado que cuando la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de estas proteínas se desnaturalizan, las bandas de absorción visible y las fluorescentes bajan de intensidad (Berns, 1989).

Con respecto a los péptidos de unión, aunque ya se han secuenciado varios en cianobacterias, en el caso específico de *Spirulina* se han secuenciado siete, la información obtenida de la base de datos de UniprotKB (www.uniprot.org) se puede resumir en el siguiente **Cuadro 3**.

Cuadro 3.- Polipéptidos de unión secuenciados en *Spirulina*

No. de acceso	Nombre de la proteína	No. aminoácidos	kDa	Característica
P72506	LC7.8	67	7.8	Asociado con la unión del núcleo de APC
B2X2E3	cpCH	76	8.084	Unión de barras
Q95430	CpCD	87	9.792	Unión de barras
D42UF5	cpcG	254	29.411	Unión de barras con núcleo
Q95432	CpcH	271	30.76	Unión de barras
Q95431	Cpcl	288	32.659	Unión de barras
D42W3	apCE	914	101.984	Unión del ficobilisoma con la membrana

Fuente: www.uniprot.org

IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer no solo se ha convertido en un problema de salud en México, si no también representa un serio desafío al sistema de salud público. Los recursos económicos disponibles para el tratamiento de esta enfermedad cada vez resultan más insuficientes. La mayoría de casos de cáncer de colon se diagnostican en las etapas más avanzadas, y son precisamente estas, las que implican un mayor costo. La detección temprana pero sobre todo la prevención son las alternativas más efectivas en términos de costos económicos, sociales pero fundamentalmente en costos de vidas humanas.

La mayoría de estudios de quimioprevención de cáncer de colon se han centrado en compuestos como los son flavonoides, flavolignanós, proantocianidinas, compuestos fenólicos, carotenoides y ácidos grasos. Estableciendo una probable relación entre su actividad antioxidante y el efecto quimiopreventivo mostrado. Otra fuente dietaria de compuestos bioactivos, son las proteínas, pues se sabe que en su secuencia de aminoácidos se encuentran encriptados fragmentos bioactivos con diferentes efectos biológicos. Entre estos compuestos destacan los péptidos bioactivos con actividad antioxidante, dicha actividad la ejercen después de ser liberados de su secuencia primaria por medio de hidrólisis química o enzimática.

El alto contenido de proteína, composición y secuencia de aminoácidos hacen de la *Spirulina* una fuente potencial de péptidos con actividad antioxidante, por lo que se obtuvieron hidrolizados proteicos a partir de ella.

El azoximetano es un carcinógeno específico de colon que produce el desarrollo de lesiones preneoplásicas en colon a través de la inducción de estrés oxidativo, por lo que se usó este modelo de carcinogénesis en ratón para evaluar si la actividad antioxidante de hidrolizados proteicos de *Spirulina* representan un mecanismo de quimioprevención.

V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1 Hipótesis

Por la secuencia de las ficobiliproteínas, el alto contenido de proteína y composición de aminoácidos de la *Spirulina*, la hidrólisis secuencial con pepsina-pancreatina liberara péptidos con actividad antioxidante, incrementando la capacidad de inhibición de radicales libres, quelación de metales y donación de electrones en hidrolizados proteicos de *Spirulina*, convirtiéndolos en agentes potencialmente quimioprotectores.

5.2. Objetivo general

Evaluar la capacidad antioxidante y quimiopreventiva de hidrolizados proteicos de *Spirulina* en ensayos *in vitro* y en un modelo de carcinogénesis de colon en ratón.

5.3. Objetivos específicos

- Caracterizar las proteínas de *Spirulina* a través de la determinación de su contenido, composición de aminoácidos, potencial bioactivo y perfil electroforético.
- Obtener hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas, caracterizarlos por grado de hidrólisis y electroforesis.
- Evaluar *in vitro* el perfil antioxidante de hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf) obtenidos a diferentes tiempos de hidrólisis.
- Evaluar el efecto antioxidante y quimiopreventivo del hidrolizado proteico de extracto de ficobiliproteínas (Exf) en un modelo de carcinogénesis de colon en ratón, determinar si el azoximetano produce oxidación en hígado.

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la **Fig. 16**, se muestra el diagrama general que se siguió en este trabajo, el trabajo experimental se dividió en cuatro bloques.

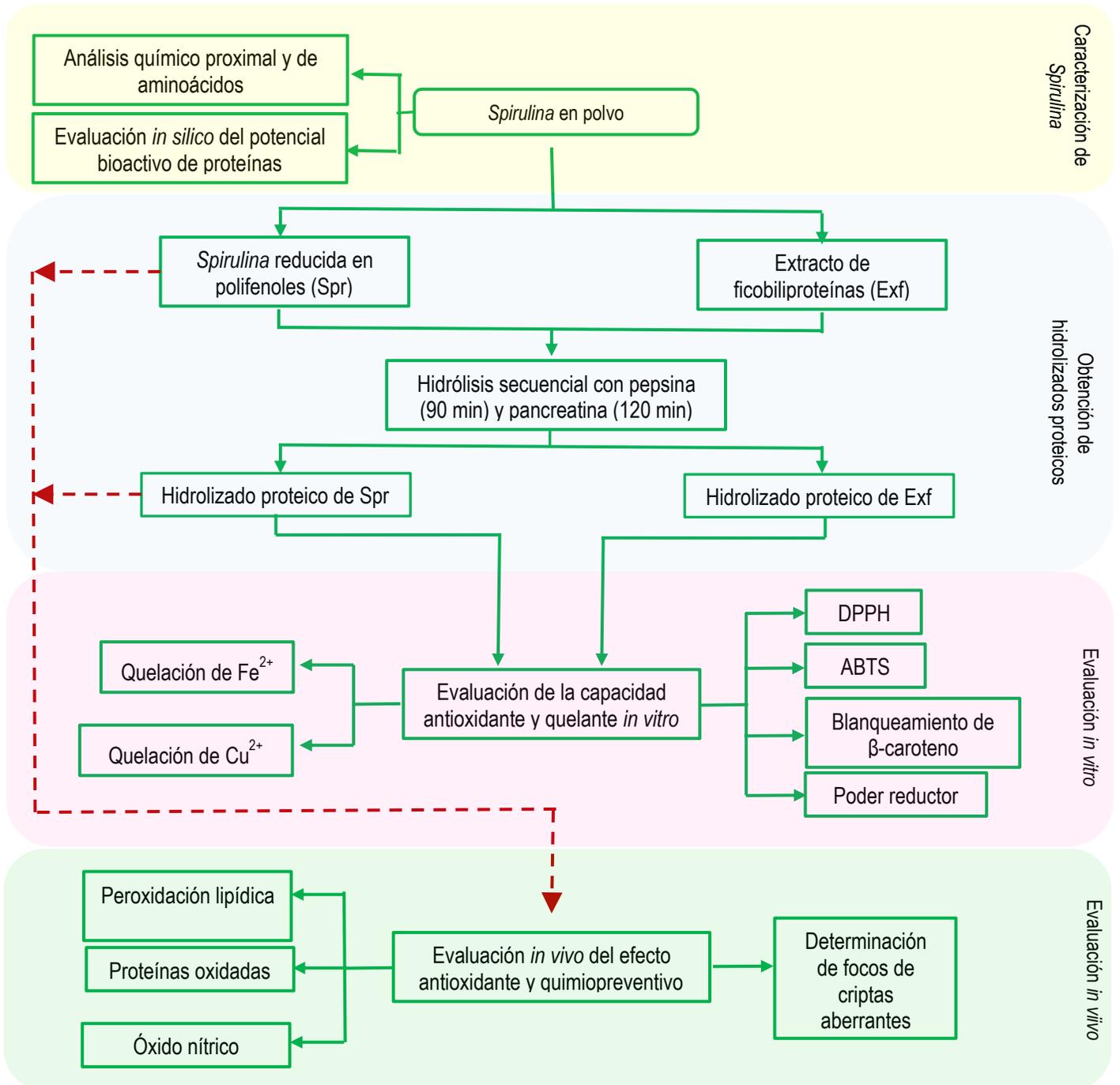


Figura 16.- Diagrama experimental general. Las líneas discontinuas en color rojo indican cuales fueron las muestras empleadas en el estudio *in vivo*.

VII. MATERIALES

7.1. Material vegetal, reactivos y animales

Spirulina maxima en polvo, marca "LOS ANDES" (República del Ecuador). Para la obtención de hidrolizados se utilizaron preparaciones comerciales de las enzimas: Pepsina A (E.C. 3.4.23.1, PP-77163, de la mucosa gástrica porcina; actividad específica 800-2500 unidades/ mg sólido), pancreatina (P-1750, de páncreas porcino, 4XUSP), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Los reactivos DPPH (2,2 difenil-1 picrilhidrazil), ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)], trolox (ácido (±)-6-hidroxi- 2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico), acetona, Ferrocina, pirocatecol violeta, β-caroteno, tween 20, K₃Fe(CN)₆, FeCl₃, FeCl₂, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), BHT (butil hidroxitolueno tetrahidratado), ácido linoléico, ácido sinápico, TNBS (ácido 2, 4, 6-trinitrobencenosulfónico), SDS (dodecil sulfato de sodio), TBH (ter-butyl hidroxiperóxido), ácido D,L-α-aminobutírico y la DCFH-DA (2'7'-dichlorofluoresceina diacetato) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). En la evaluación *in vivo* se utilizaron 110 ratones macho de la cepa ICR, con 5-6 semanas de edad (Harlan Laboratorios, México). Los reactivos azoximetano, dimetil sulfóxido, suero fetal bovino, ácido tricloroacético, ácido tiobarbiturico, N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro, sulfanilamida, nitrito de sodio, ácido clorhídrico, dinitrofenilhidrazina, guanidina hidrociorada, formalina y azul de metileno también fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

VIII. MÉTODOS

8.1. Análisis de la composición químico proximal y aminoácidos de *Spirulina*

Se evaluó la composición proximal de acuerdo a los procedimientos descritos en el AOAC (2002), para la determinación de humedad (Método 925.23, método rápido en termobalanza), grasa cruda (Método 920.39), cenizas (Método 923.03) y proteína a través de la determinación del contenido de nitrógeno por Kjeldahl (Método 954.01) utilizando un factor de conversión de 6.25.

Perfil de aminoácidos de *Spirulina*

El análisis de aminoácidos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC por sus siglas en inglés), en un sistema Beckman-Coulter (Brea, CA, EUA) con una columna de fase reversa Novapack C18 (300 mm x 3.9 mm i.d., 4 μ m; Waters, Milford, MA, EUA). Los aminoácidos se analizaron después de una hidrólisis ácida en la que la *Spirulina* (40 μ g) y D,L- α -aminobutírico (8 μ L) utilizado como estándar interno fueron hidrolizados con 1 mL de HCl 6 N en tubos sellados con N₂ a 110°C durante 24 h, posteriormente se derivatizaron con dietil etoximetilmalonato de acuerdo al método de Alaiz *et al.*, (1992).

8.2. Evaluación *in silico* de las ficobiliproteínas de *Spirulina* para la predicción de fragmentos bioactivos

Se obtuvieron las secuencias de las ficobiliproteínas de *Spirulina* en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con los siguientes números de acceso ZP_03271568, ZP_03271569, ZP_03274524 y ZP_03271327 para ficocianina subunidad α , ficocianina subunidad β , aloficocianina subunidad α y aloficocianina subunidad β respectivamente.

Las secuencias de las proteínas se introdujeron en el programa BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia>) y se evaluó el perfil de actividad biológica mediante la ecuación de frecuencia de ocurrencia de péptidos con actividad biológica (Ec. 1).

$$A = \frac{a}{N} \dots \dots \dots \text{Ec. 1}$$

Donde “a” es el número de fragmentos con una actividad biológica en específico y “N” es el número de residuos de aminoácidos de la proteína. Este valor es computado automáticamente por BIOPEP, dentro de la herramienta “ANALYSIS” del menú “bioactive peptides”.

8.3. Obtención de los hidrolizados proteicos de *Spirulina*

De la *Spirulina* comercial se obtuvo *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y un extracto de ficobiliproteínas (Exf), los cuales fueron sometidos a hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina

para dar lugar a los hidrolizados proteicos correspondientes. A continuación se detalla el procedimiento de obtención de cada uno.

8.3.1. *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr)

Con el propósito de evaluar la influencia o posible interferencia de los compuestos fenólicos en la actividad antioxidante de los péptidos, se redujeron los compuestos fenólicos por medio de seis extracciones con acetona al 75% a 4°C. Se empleó una relación muestra-disolvente de 0.5/5 w/v. Cada extracción se realizó por 30 min en agitación y baño de hielo, después de este tiempo se eliminó todo el disolvente y se cambió. Se tomó muestra del disolvente en cada extracción para determinar el contenido total de polifenoles.

8.3.1.1. Determinación del contenido total de polifenoles

El contenido de compuestos fenólicos totales en Spr se determinó de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu modificado para su uso en microplaca (Singleton *et al.*, 1999), los compuestos fenólicos fueron cuantificados a 765 nm. Se elaboró una curva tipo de ácido gálico (0 a 0.5 mg/mL), los resultados obtenidos se reportaron como mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra (mg GAE/g *Spirulina*).

8.3.2. Obtención del extracto de ficobiliproteínas de *Spirulina* (Exf)

Las condiciones para la solubilización de las ficobiliproteínas de *Spirulina* se establecieron de acuerdo a Silveira *et al.*, (2007), se empleó una relación biomasa-disolvente (agua) de 0.08 g/mL a 25 °C por 24h en agitación. Posteriormente, para la obtención del extracto de ficobiliproteínas se aplicó el método descrito por Bermejo *et al.*, (2008). La mezcla obtenida después de la solubilización de las ficobiliproteínas se centrifugó (2500 g, 30 min, 4°C) y el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 50%. Para recuperar las ficobiliproteínas precipitadas se realizó una segunda centrifugación (2500 g, 30 min, 4°C) y se eliminó el sobrenadante. El precipitado azul obtenido se disolvió en agua destilada, se dializó por 24h y se liofilizó.

Con el fin de incrementar las relaciones de pureza de la ficocianina y aloficocianina se realizaron las siguientes modificaciones al método de obtención del extracto de ficobiliproteínas arriba descrito.

- Se agregó carbón activado después de la extracción con agua destilada a una concentración de 50 g/L durante 5 min, posteriormente se centrifugó a 9000 rpm por 30 min, el carbón activado absorbe impurezas y aumenta la pureza de las ficobiliproteínas (Herrera *et al.*, 1989).
- El extracto crudo se fraccionó con sulfato de amonio al 25% y después al 60%, con este último se trabajó, ya que es donde se encuentra la mayor cantidad de PC y APC (Zhang y Chen, 1999).

La pureza de los extractos obtenidos por el método con y sin modificaciones se calculó de acuerdo a las siguientes ecuaciones (Bennett y Bogorad en 1973).

$$PFC = \frac{A_{620}}{A_{280}} \dots\dots\dots Ec.2$$

$$PAFC = \frac{A_{652}}{A_{280}} \dots\dots\dots Ec.3$$

Donde:

PFC = Relación de pureza de la ficocianina

PAFC = Relación de pureza de la aloficocianina

A₆₂₀ = Absorbancia ficocianina

A₂₈₀ = Absorbancia proteínas

A₆₅₂ = Absorbancia aloficocianina

8.3.3. Hidrólisis enzimática de Spr y Exf

La *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y el extracto de ficobiliproteínas (Exf) se hidrolizaron de forma secuencial con pepsina (90 min) y pancreatina (120 min) de acuerdo a Megias *et al.* (2008). En ambos casos se preparó una suspensión de proteína en agua (5% w/v) que se ajustó a pH de 2.5 con HCl, la pepsina se agregó en una relación 1:20 w/w enzima-sustrato. Después de 90 min de

reacción, el pH se modificó a 7.5 con NaOH y se adicionó la pancreatina en la misma proporción que la pepsina. Durante la hidrólisis enzimática la temperatura (37 °C) y el pH (2.5 ó 7.5) de la solución proteica se mantuvo constante, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se calentó a ebullición por 10 min para inactivar la enzima. Los hidrolizados proteicos obtenidos se conservaron a -60 °C para la posterior determinación de actividad antioxidante *in vitro*.

8.3.4. Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis se determinó por el método del ácido tricloroacético (TCA). Una alícuota de 2 ml de hidrolizado proteico y 2 ml de TCA 20% se mezclaron. La mezcla se agitó y después se centrifugó, el contenido total de nitrógeno se determinó en el sobrenadante por el método de micro Kjeldahl. El cálculo del grado de hidrólisis se realizó utilizando la Ec.4.

$$\% \text{ Grado de hidrólisis} = \frac{\text{Nitrógeno soluble en TCA 20\%}}{\text{Nitrógeno total}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Ec. 4}$$

8.4. Electroforesis (Microchips)

Para la evaluación electroforética de las proteínas de la *Spirulina*, SpR, Exf y sus hidrolizados se utilizó un equipo Bioanalyzer 2100 de Agilent, que está basado en los principios de la electroforesis tradicional en gel, pero en formato de chip. Este equipo reduce el tiempo de corrimiento y la cantidad de muestra, además de proveer la información en forma digital. El chip contiene gel, un estándar externo (marcador) y pozos para las muestras (interconectados con microcanales). Durante la preparación del chip los microcanales se llenan con un polímero y un colorante fluorescente, que lo convierten en un circuito eléctrico integrado. Los electrodos del cartucho del equipo están dispuestos de modo que encajan en los pozos del chip. Cada electrodo cuenta con una fuente de poder independiente que provee control y flexibilidad. Las muestras de proteína corren por una diferencia de voltaje, similar a la electroforesis convencional. Las moléculas migran de acuerdo a su carga, forma y tamaño, siendo las pequeñas las que migran más rápido. Las proteínas se identifican por fluorescencia y los datos se trasladan a imágenes de gel (bandas) y electroferogramas (picos) con

ayuda del marcador que contiene fragmentos con tamaño y concentración conocida (Bioanalyzer 2100 de Agilent, 2100 Expert User's Guide. Edition November 03).

8.5. Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante y quelante de los hidrolizados proteicos de *Spirulina*

8.5.1. Determinación de actividad antioxidante por el radical DPPH

Se determinó de acuerdo al método descrito por Shimada *et al.*, (1992) con algunas modificaciones. 200 µL de hidrolizado se mezclaron con 2000 µL de DPPH (125 µM en metanol al 80%), la mezcla se guardó en oscuridad a temperatura ambiente por 60 min. Posteriormente se agitaron los tubos y se leyeron a 520 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la Ec. 5.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{problema}}}{A_{\text{control}}} \dots\dots\dots \text{Ec. 5}$$

Donde: A_{control} es la absorbancia del blanco y A_{problema} es la absorbancia de los hidrolizados.

8.5.2. Determinación de actividad antioxidante por el ensayo TEAC (ABTS)

Se determinó por el ensayo de decoloración (Re *et al.*, 1999) con algunas modificaciones. Primero se generó el radical ABTS⁺ mezclando una solución 7mM de ABTS y 2.45mM de persulfato de potasio. Después de 12 a 16h de reacción, la solución de color verde-azul con excesiva acumulación de radicales libres se diluyó en metanol absoluto hasta una absorbancia 0.70 ± 0.02 a 734 nm. La actividad antioxidante se determinó mezclando 10 µL de hidrolizado (a la menor concentración de proteína) y 990 µL de solución diluida de ABTS⁺. Se tomó lectura de la absorbancia a los 0 y 6 min. La actividad antirradical se calculó como porcentaje de inhibición del radical (Ec. 6).

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_{\text{muestra } t_0} - A_{\text{muestra } t_6}}{A_{\text{muestra } t_0} - \left(\frac{A_{\text{blanco } t_0} - A_{\text{blanco } t_6}}{A_{\text{blanco } t_0}} \right)} \times 100 \dots\dots\dots \text{Ec. 6}$$

La actividad antirradical ABTS (% inhibición) de los hidrolizados proteicos se expresó como valor TEAC ($\mu\text{mol Trolox/ mg proteína}$) con ayuda de una curva tipo (50, 100, 250, 500 y 1000 mM) de Trolox.

8.5.3. Inhibición de la decoloración de β -caroteno (Pastor-Cavada *et al*, 2009)

Solución de β -caroteno:

Se pesaron 2 mg de β -caroteno y se disolvieron con 1 mL de cloroformo en un tubo de ensaye mediante agitación con vórtex. A esta solución se le adicionó 200 mg de Tween-20 (200 μL) y 20 mg de ácido linoleico (20 μL), la mezcla se agitó con vórtex y cuando la solución se observó totalmente cristalina se eliminó el cloroformo por medio de nitrógeno.

Por otro lado, se preparó agua enriquecida de oxígeno (la cual actuó como oxidante del ácido linoleico, los productos de dicha oxidación son los responsables de la degradación del β -caroteno). En un matraz se colocaron 100 mL de agua destilada y se burbujeó aire a través de una pipeta Pasteur durante 30 min.

Ensayo:

Se mezcló la solución de β -caroteno con 20 mL de agua rica en oxígeno. Esta mezcla madre se usó para ensayar la actividad antioxidante de los hidrolizados. La mezcla se diluyó (con el agua rica en oxígeno) a 1.2-1.3 (200 $\mu\text{L/pozo}$) a A_{450} . Se adicionaron 50 μL de la muestra y se tomó lectura a los 0 y 60 min de reacción.

Los resultados se expresan como actividad antioxidante (AA) con la siguiente fórmula:

$$AA = \left(\frac{DR_{control} - DR_{sample}}{DR_{control}} \right) \times 100 \dots \dots \dots \text{Ec. 7}$$

Donde DR es la velocidad de degradación:

$$DR = \left(\text{Ln} \frac{\text{Abs at 0 min}}{\text{Abs at 60 min}} \right) / 60 \dots \dots \dots \text{Ec. 8}$$

8.5.4. Determinación de poder reductor

La capacidad de los hidrolizados proteicos para reducir Fe^{3+} se determinó por el método de Yildirim *et al.*, (2001) con algunas modificaciones. Se mezcló 100 μL de hidrolizado con 50 μL de regulador de fosfatos 0.2 M (pH 6.6) y 50 μL FeCNK 1%, la mezcla se incubó a 50°C por 20 min. Después de la incubación, se agregaron 50 μL de ácido tricloroacético y 10 μL de FeCl_3 , la mezcla se volvió a incubar por 10 min a 50°C y se midió la absorbancia a 700 nm usando un lector de micro placa (Multiskan Spectrum, ThermoLab Systems, MA, USA). Altas absorbancias indican alto poder reductor.

8.5.5. Determinación de actividad quelante de hierro

Se determinó midiendo la formación de complejos Fe^{2+} - ferrozina (Carter, 1971). 100 μL de hidrolizado se mezclaron con 250 μL de buffer de acetatos pH 4.9 y 30 μL de FeCl_2 (w/v). Después se agregó la ferrozina previamente incubada por 30 min a temperatura ambiente. La unión de los iones fierro con la ferrozina generaron un complejo que se midió a 562 nm, se usó un lector de micro placa (Multiskan Spectrum, ThermoLab Systems, MA, USA). El EDTA se usó como control positivo. La actividad quelante de hierro se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Quelación de hierro} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \dots\dots\dots \text{Ec. 9}$$

8.5.6. Determinación de actividad quelante de cobre

La actividad quelante de Cu^{2+} se determinó de acuerdo a Saiga *et al.* (2003). 290 μL de regulador de acetatos (pH 6, 50 mM), 6 μL de pirocatecol violeta (4 mM) preparado en el mismo regulador y 1 μg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ se mezclaron con 100 μL de hidrolizado. La absorbancia a 632 nm se midió usando un lector de micro placa (Multiskan Spectrum, ThermoLab Systems, MA, USA). La actividad quelante de hierro se calculó, como la anterior.

8.6. Evaluación *in vivo* de la capacidad antioxidante y el efecto quimiopreventivo del hidrolizado proteico de Spr

De acuerdo a los resultados obtenidos en las determinaciones de actividad antioxidante *in vitro*, se seleccionó el hidrolizado proteico de Spr para la evaluación *in vivo* de su capacidad antioxidante y efecto quimiopreventivo. Sin embargo, con el fin de observar y comparar el efecto de la hidrólisis también se evaluó Spr. El procedimiento que se siguió para obtener Spr es el que se describe en el apartado 7.3.1 y para la obtención del hidrolizado proteico Spr se sometió a lo descrito en 7.3.3. Ambas muestras fueron liofilizadas para ser administradas a los ratones a través de la preparación de soluciones a las dosis indicadas.

8.6.1. Animales y Diseño experimental

Este estudio fue realizado en el laboratorio de Genética del Departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Se usaron 110 ratones macho de la cepa ICR (Harlan Laboratorios, México) con 5-6 semanas de edad y peso entre 22-25 g, los cuales se colocaron en cajas de policarbonato y se mantuvieron con ciclos de luz/oscuridad (12/12 h), temperatura de 28 ± 2 °C y con acceso libre a agua y alimento (Rodent lab Chow). Después de una semana de aclimatación los animales fueron asignados al azar en 10 grupos experimentales (n=11). En la **Fig.17** se muestra el diseño experimental que se siguió en esta evaluación, se probaron dos dosis de Spr y su hidrolizado proteico. La dosis baja se estableció de acuerdo a las recomendaciones de consumo de *Spirulina* (3g/día) y la alta se fijó de acuerdo a una revisión realizada en la que se sugieren dosis altas (>35 g/día) para lograr efectos terapéuticos (University of Maryland, medical center), dichos valores dan lugar a las dosis de 40 y 400 mg/kg después de ser extrapolados al peso promedio de un ratón.

En la Fig. 17 se observa la forma en la que se distribuyeron los diferentes grupos experimentales, el diseño conto con un testigo positivo al cual solo se le administró AOM y un testigo negativo al que se le administró el vehículo (agua inyectable). Por otro lado, se probó el efecto de Spr y su hidrolizado a la dosis baja y alta de forma separada y combinada con el carcinógeno (AOM). A partir de la primer semana se administró Spr o su hidrolizado proteico a las diferentes dosis, se realizó diariamente por medio de una cánula esofágica para roedores procurando mantener constante la hora de dosificación.

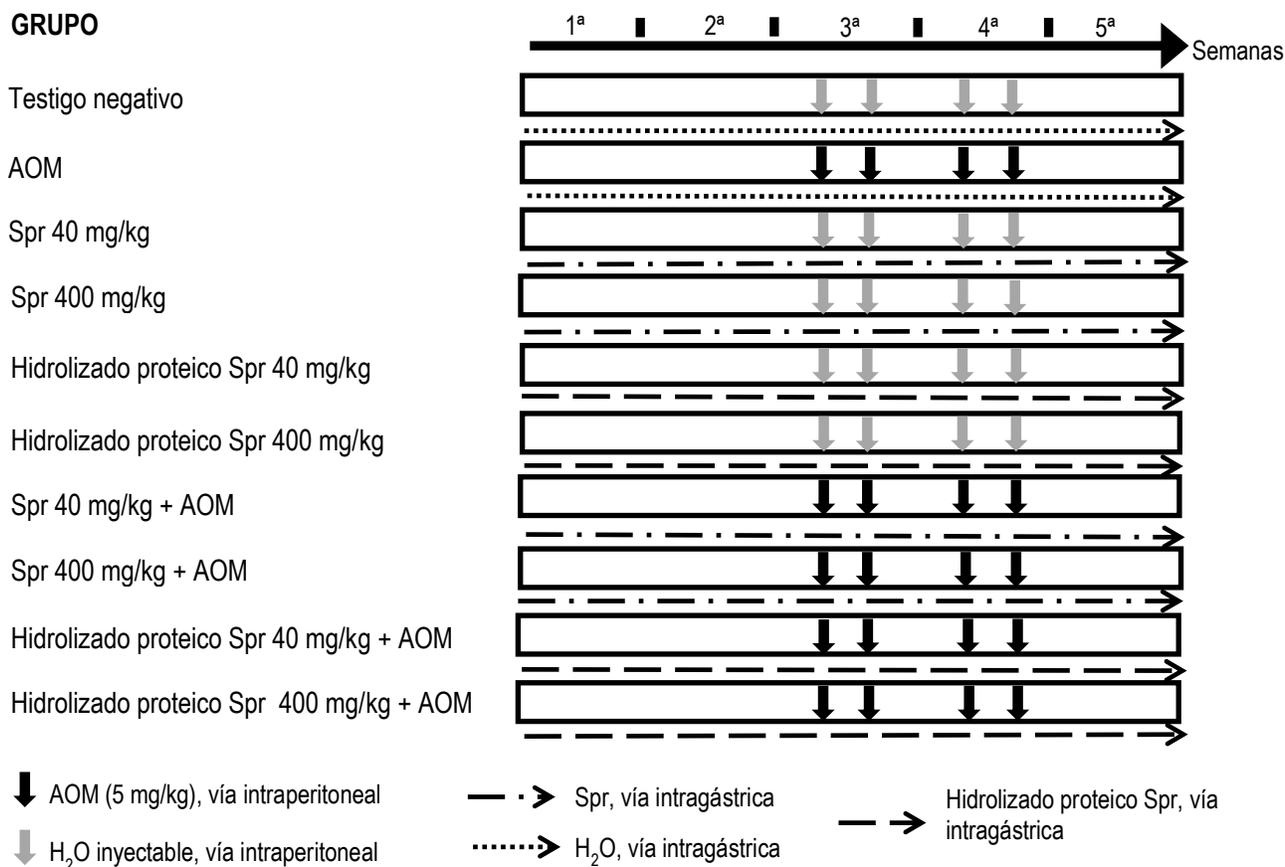


Figura 17.- Diseño experimental de la evaluación *in vivo* de la capacidad antioxidante y el efecto quimiopreventivo de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y su hidrolizado proteico en un modelo de carcinogénesis de colon inducido con azoximetano (AOM)

El carcinógeno (AOM) se administró a la tercer y cuarta semana (dos veces por semana) en una dosis de 5 mg/kg. A lo largo del ensayo, se observó el estado de salud general de los animales y se registró su peso. Al final del ensayo (5 semanas), los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajo el colon e hígado. Durante la extracción de los órganos y la preparación de las muestras biológicas se trabajó a -4°C.

De los 11 animales de cada grupo, se tomaron 5 para la determinación de los marcadores de estrés oxidativo en hígado y colon. En el caso del hígado, se trabajó únicamente con el lóbulo derecho. 1/3 se cortó, perfundió (con una jeringa y PBS) y guardó en suero fetal bovino con dimetil sulfoxido (DMSO) al 15%, el tejido se conservó a -60°C para la posterior determinación de óxido nítrico. 2/3

partes fueron homogenizadas utilizando PBS en una relación 1:10 (por cada 500 mg de tejido, 5 mL de PBS) mediante un vórtex, esta mezcla fue usada para la determinación de proteína total, peroxidación lipídica y proteínas oxidadas.

En el caso del colon, se abrió longitudinalmente y la parte proximal fue tratada de la misma forma que el hígado para la posterior determinación de óxido nítrico (en este caso, se omitió la perfusión). Las fracciones correspondientes a las partes media y distal del colon, se emplearon para la elaboración del homogenizado en una relación de 1:10 con PBS, al igual que en el hígado esta mezcla se usó para la determinación de proteína total, peroxidación lipídica y proteínas oxidadas.

Para la determinación del efecto quimiopreventivo, se destinaron 6 ratones de cada grupo. Después de extraer el colon, este se lavó con PBS y abrió longitudinalmente. El resto del procedimiento se detalla en el apartado de determinación de focos de criptas aberrantes (7.6.6).

8.6.2. Determinación de proteína total en hígado y colon

Se tomaron 100 μ L del homogenizado 1:10, se centrifugó a 900 rpm por 20 min y se colocó 10 μ L del sobrenadante en un tubo de ensaye de vidrio, se adicionó 90 μ L de H₂O desionizada, la mezcla se agitó con un vórtex. Después de 5 min de reacción las muestras fueron leídas a 595 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. A la par de las muestras, se corrió un blanco, el cual constó de 100 μ L de H₂O desionizada y 2.5 mL de reactivo de Bradford. Se empleó una curva tipo de albumina sérica bovina, en un intervalo de concentración de 0.1-1.0 mg/mL.

8.6.3. Evaluación de marcadores de oxidación en hígado y colon

8.6.3.1. Determinación de peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se estimó en términos de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) usando MDA (malondialdehído) como estándar, por el método de Buege y Aust (Ernster y Nordenbrand, 1967). A 500 μ L del homogenizado 1:10 se le adicionaron 2 mL del reactivo TCA-TBA-HCl (15% w/v – 0.375 w/v – 0.25 N) en tubos ámbar de plástico. La mezcla se sometió a ebullición por 15 min, se enfrió en baño de hielo durante 10 min y se centrifugó a 4000 rpm durante

10 min. El sobrenadante fue leído a 532 nm, las muestras se leyeron contra un blanco de reactivos. La concentración del malondialdehído se calculó usando un coeficiente de extinción de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y se expresó como nmol MDA/mg proteína.

8.6.3.2. Determinación de proteínas oxidadas

La oxidación de proteínas se determinó mediante la cuantificación del contenido de grupos carbonilo, de acuerdo a la técnica descrita por Levine *et al.*, (1990). Se colocaron 200 μL del homogenizado en tubos eppendorf, se adicionaron 500 μL de dinitrofenilhidrazina (DNFH) 10 mM en HCl 2M. La mezcla se incubó a oscuridad por 1h a temperatura ambiente. Las hidrazonas generadas por las proteínas fueron precipitadas con 500 μL de TCA al 20%. El precipitado fue lavado tres veces con 1 mL de acetato de etilo-etanol 1:1. Durante cada lavado, el pellet se sometió a agitación y se dejó en la solución de lavado durante 10 min a temperatura ambiente antes de la centrifugación. El pellet final fue resuspendido en 1mL de guanidina hidrociorada 6M, se incubó durante 15 min a 37°C y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min. Para cada muestra se corrió un blanco de reactivos, que siguió el mismo procedimiento, solo que se adicionaron 500 μL de HCl 2M en lugar de la DNFH y se leyó a 350-375 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. La concentración de grupos carbonilo fue calculada usando un coeficiente de absorbancia molar de 22000 M/cm y expresada como nmol CO /mg proteína.

8.6.3.3. Determinación de óxido nítrico

El óxido nítrico se evaluó de forma indirecta, mediante la determinación de nitrito por medio de la reacción de Griess (Miranda *et al.*, 2001). El reactivo de Griess se preparó mezclando una solución de N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro (0,1% p/v en 5% de HCl) con una solución de sulfanilamida (2% p/v en 5% HCl). Ambas soluciones son estables por varios meses a 4 °C protegidas de la luz, éstas se mezclaron inmediatamente antes de realizar la reacción colorimétrica.

Los tejidos de colon e hígado fueron descongelados y lavados con PBS frío. A partir de cada muestra se preparó en frío un homogenado con PBS en una relación 1:4, por medio de un homogeneizador de mano. La mezcla obtenida se sometió a centrifugación (4000 rpm, 20 min), la determinación se realizó con 100 μL del sobrenadante obtenido, adicionándole 300 μL del reactivo

de Griess y 600 μL de agua destilada, estableciéndose su absorbancia a 540 nm. Como estándar se utilizó NaNO_2 0.1 mM, en un intervalo entre 0.9 μmoles y 10 μmoles . La concentración se expresó como $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{g}$ tejido.

8.6.4. Evaluación del efecto quimiopreventivo

8.6.4.1. Determinación de focos de criptas aberrantes (FCA)

El número de FCA en la mucosa del colon se contó de acuerdo al procedimiento descrito por Bird, (1995). Las muestras de colon fueron colocadas en placas de parafina con alfileres y fijadas con formalina al 10% en PBS por 24 h a temperatura ambiente, después se tiñeron con azul de metileno al 0.25% en PBS y se guardaron en tubos de plástico con formalina para la posterior determinación de FCA. Las criptas aberrantes se contaron bajo un microscopio de luz a un aumento de $\times 10$ con la mucosa del colon hacia arriba, se distinguieron de las criptas normales circundantes por su mayor tamaño, mayor espacio pericriptal, epitelio más engrosado y mayor tinción. Los FCA fueron contados de acuerdo al número de criptas aberrantes, es decir como criptas aberrantes simples y focos de criptas aberrantes.

8.7. Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó con el programa estadístico SPSS para Windows. A los datos obtenidos se les aplicó pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas, se realizó análisis de varianza (ANOVA) unifactorial o bifactorial (según el caso) para medidas repetidas con prueba post-hoc Student-Newman-Keuls (SNK). En todos los análisis, $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Composición químico proximal y de aminoácidos de *Spirulina*

Los resultados obtenidos en la determinación de la composición químico proximal de la *Spirulina* se presentan en el **Cuadro 4**. La proteína representa el 67.25% de su composición, siendo superior al de otros alimentos como por ejemplo, carne (43%), huevo (47%), leche (26%), arroz (8%), soya (37%) y también al de otras algas comestibles, entre las que destacan *Dunaliella* (57%), *Chlorella* (51-58%) y *Haematococcus* (48%) (Chacón y González, 2010).

Cuadro 4.- Composición químico proximal de *Spirulina*

Composición proximal en g/100g de peso seco	
Humedad	7.42 ± 0.02
Cenizas	8.29 ± 0.14
Lípidos	2.24 ± 0.26
Proteína	67.25 ± 0.7
Carbohidratos	14.8 ± 0.3

Los resultados representan la media de tres determinaciones independientes ± error estándar

Por otro lado, de acuerdo a los resultados obtenidos en la determinación de la composición de aminoácidos (**Cuadro 5**), la *Spirulina* además de poseer un alto contenido de proteína tiene todos los aminoácidos esenciales (Ile, Leu, Lys Met, Phe, Thr, Trp, Val, His, Tyr y Cys). Sin embargo, los aminoácidos Lisina (Lys) y triptófano (Trp) resultaron estar en menor proporción de acuerdo a las recomendaciones de la FAO, cubriendo respectivamente solo el 80 y 60% de los requerimientos. El espectro de aminoácidos muestra que el valor biológico de las proteínas en *Spirulina* es bueno y que un producto óptimo puede alcanzarse con la suplementación de una fuente adecuada de Lys y Trp.

De acuerdo a los resultados observados, la *Spirulina* es una fuente de proteína de buena calidad, pues además de tener un alto contenido proteico con un perfil adecuado de aminoácidos presenta valores de digestibilidad entre 83 y 90% (Habib *et al.*, 2008).

En el Cuadro 5, también se muestran a los aminoácidos de *Spirulina* clasificados de acuerdo a su carga. Se observa que los aminoácidos hidrofóbicos se encuentran en mayor proporción (37%),

este hecho puede ser atribuido a que la estabilidad del arreglo hexamérico de las ficobiliproteínas se mantiene principalmente mediante interacciones hidrofóbicas, y a que los péptidos de unión que se encargan del ensamblaje de las diferentes ficobiliproteínas para dar lugar al ficobilisoma son altamente hidrofóbicos (Lundell *et al.*, 1981). De acuerdo a Ranathunga *et al.*, (2006) el alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos podría favorecer la capacidad de los péptidos para secuestrar radicales libres generados en fases lipídicas como las membranas celulares, después de someter a las proteínas de *Spirulina* a hidrólisis enzimática.

Cuadro 5.- Composición de aminoácidos (g/100g de proteína) de *Spirulina*

Aminoácido	FAO/WHO (1985)		<i>Spirulina</i>	Aminoácido	FAO/WHO (1985)		<i>Spirulina</i>
	Niños	Adultos			Niños	Adultos	
Asp+Asn			12.7 ± 0.1	Tyr + Phe	6.3	1.9	8.0 ± 0.1
Glu+Gln			15.1 ± 0.4	Val	3.5	1.3	4.85 ± 0.1
Ser			6.2 ± 0.6	Met + Cys	2.5	1.7	2.5 ± 0.1
His			1.4 ± 0.0	Lys	5.8	1.6	5.1 ± 0.1
Gly			5.8 ± 0.1	Ile	2.8	1.3	4.4 ± 0.0
Thr	3.4	0.9	5.5 ± 0.3	Trp	0.8	0.5	0.5 ± 0.0
Arg			7.2 ± 0.3	Leu	6.6	1.9	9.55 ± 0.1
Ala			9.0 ± 0.1				
Pro			2.2 ± 0.1				
Aminoácidos apolares (hidrofóbicos)			37.0 %				
Aminoácidos polares sin carga			21.6 %				
Aminoácidos básicos			13.7 %				
Aminoácidos ácidos			27.8 %				

Los resultados representan la media de tres determinaciones independientes ± error estándar

Después de los aminoácidos hidrofóbicos, los que se encuentran en mayor proporción son los aminoácidos ácidos, la presencia de este tipo de aminoácidos podría favorecer la actividad antioxidante de hidrolizados proteicos de *Spirulina*, a través de la liberación de péptidos que los contengan. Pues se ha observado con cierta regularidad la presencia de aminoácidos de esta naturaleza en péptidos con actividad antioxidante (Samaranayaka y Li-chan, 2011).

Además de la proteína, el análisis químico proximal realizado a la *Spirulina* indica que contiene 8.29% de cenizas, 2.24% de lípidos y 14.8% de carbohidratos, dentro de los cuales de acuerdo a la

literatura (Hosseini *et al.*, 2013; Nuhu, 2013; Kulshreshtha *et al.*, 2010), están distribuidos compuestos que le confieren diferentes aplicaciones nutricionales y terapéuticas.

9.2. Evaluación *in silico* de las ficobiliproteínas de *Spirulina* para la predicción de fragmentos bioactivos

En la Fig. 18 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación *in silico* de las secuencias de las ficobiliproteínas de *Spirulina* como precursoras de péptidos bioactivos. En el eje de las ordenadas se encuentra la frecuencia de ocurrencia de los fragmentos bioactivos (A) y en el de las abscisas las diferentes actividades encontradas por BIOPEP (Inhibidor ECA, mediador de proteólisis, antianestésico, antioxidativo, antitrombótico, hipotensivo, inmunomodulador, inhibidor, regulador, opioide, neuropéptido y estimulador).

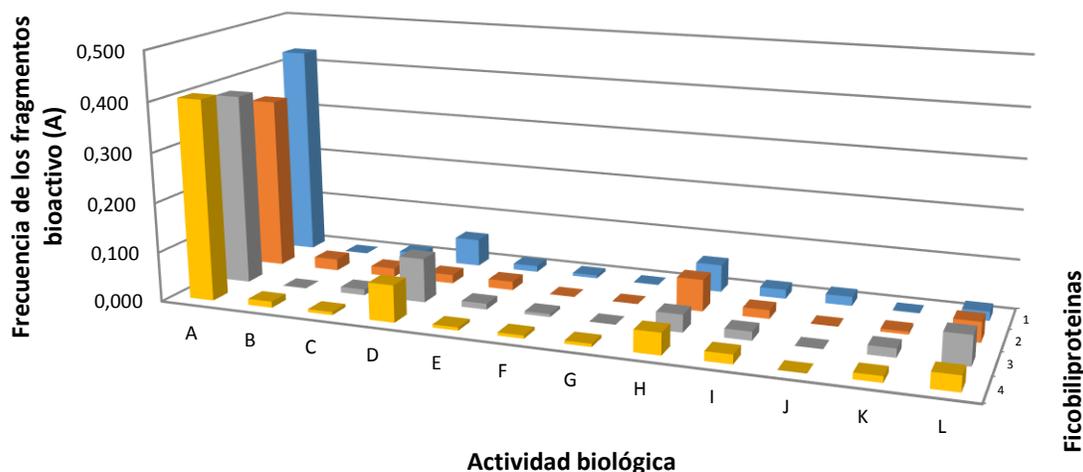


Figura 18.- Predicción de los perfiles de actividad biológica de las ficobiliproteínas de *Spirulina* de acuerdo a BIOPEP. En el gráfico se observa la frecuencia de las secuencias bioactivas (eje y), contra las actividades biológicas específicas (A-K eje x) y las proteínas (1-4, eje z). Proteínas: 1-ficocianina subunidad α , 2-ficocianina subunidad β , 3-aloficocianina subunidad α y 4-aloficocianina subunidad β . Actividades A-inhibidor ECA, B-estimador de proteólisis, C-antianestésico, D-antioxidativo, E-antitrombótico, F-hipotensivo, G-inmunomodulador, H-inhibidor, I-regulador, J-opioide, K-neuropéptido, L-estimulador.

En general, las dos actividades biológicas que presentaron una mayor frecuencia de ocurrencia tanto en la cadena α como β de ficocianina y aloficocianina fueron la actividad inhibitoria de la enzima

convertidora de la angiotensina (ECA) y la antioxidante, aunque en menor proporción la última. Esto se debe en gran medida a que la actividad ECA es la más estudiada en el área de los péptidos bioactivos, y por lo tanto existe un mayor número de fragmentos con esta actividad registrados en la base de datos de BIOPEP (Iwaniak y Dziuba, 2011). Por lo que no se descarta que puedan existir más fragmentos con actividad antioxidante que aún no han sido secuenciados y registrados.

Por otro lado, las ficobiliproteínas representan el 60% del contenido proteico de *Spirulina*. Aunque no fue posible el análisis *in silico* del otro 40% de proteínas, porque no se han secuenciado, es muy probable que también existan fragmentos con actividad antioxidante, incrementado su frecuencia de ocurrencia.

De acuerdo a los resultados obtenidos del contenido de proteína, composición de aminoácidos y el análisis *in silico*, la probabilidad de que se encuentren péptidos con actividad antioxidante en las secuencias de las proteínas de *Spirulina* es alta, siendo sus hidrolizados proteicos los que ejercerán dicha actividad.

9.3. Obtención de hidrolizados proteicos de *Spirulina*

9.3.1. Obtención de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf)

Para la obtención de Spr, la *Spirulina* se sometió a una reducción de su contenido de polifenoles, en el **Cuadro 6** se presentan los resultados obtenidos en cada una de las seis extracciones con acetona al 75%. Se observa que la mayor reducción de compuestos fenólicos ocurrió en la primera extracción, donde se logró eliminar el 37 % del total de fenoles de *Spirulina*. En las posteriores extracciones, la cantidad de compuestos fenólicos eliminados disminuyó, alcanzando una extracción de solo el 5 % en la última, esto se debe a que la diferencia en el gradiente de concentración es proporcional a la difusión. Al final de las seis extracciones se logró eliminar 3.77 mg GAE (equivalentes de ácido gálico) por g de *Spirulina*, que representan el 91% del contenido total de compuestos fenólicos, una eliminación completa de estos compuestos puede resultar complicada porque algunos polifenoles podrían estar presentes en forma de complejos con las proteínas (Ozidal *et al.*, 2013).

Cuadro 6.- Contenido de polifenoles (mg GAE/g) de *Spirulina* durante el proceso de extracción

		mg GAE/g <i>Spirulina</i>
Contenido inicial		4.14 ± 0.14
No. de extracción	1	1.55 ± 0.08
	2	0.76 ± 0.09
	3	0.58 ± 0.08
	4	0.38 ± 0.08
	5	0.30 ± 0.06
	6	0.21 ± 0.06
Eficiencia de extracción		91%

Los resultados representan la media de tres determinaciones independientes ± error estándar

Fue posible la obtención de *Spirulina* reducida (91%) en compuestos fenólicos. De esta forma la actividad antioxidante del hidrolizado proteico de Spr puede ser atribuida principalmente a la liberación de péptidos con dicha actividad y no a los compuestos fenólicos. Pues diversos estudios (El-Baky *et al.*, 2009; Colla *et al.*, 2007) reportan actividad antioxidante de estos compuestos en *Spirulina*.

En el caso de la obtención del extracto de ficobiliproteínas, se realizaron algunas modificaciones al método propuesto por Bermejo *et al.*, (2008), con el fin de incrementar la relación de pureza de la ficocianina y aloficocianina. En el **Cuadro 7** se muestran los resultados obtenidos con el método original y el modificado. Se observa que la adición de carbón activado y el fraccionamiento con sulfato amonio (método modificado) tuvieron un efecto positivo en las relaciones de pureza de la ficocianina y aloficocianina, pues se generó un incremento de estos parámetros con respecto a los valores obtenidos con el método sin modificar.

Se obtuvo una relación de pureza para ficocianina de 0.521 y para aloficocianina de 0.153, estos valores son similares a lo reportado por Estrada *et al.*, (2001) donde se alcanzó una relación de 0.520 para ficocianina durante la obtención de un extracto de ficobiliproteínas. Por otro lado, el rendimiento y la concentración final de proteína no se afectaron con las modificaciones realizadas al método, ya que no se observó diferencia significativa entre las dos metodologías probadas.

Cuadro 7.- Comparación de los métodos empleados para la obtención del extracto de ficobiliproteínas (Exf)

	Método	
	Sin modificaciones	Con modificaciones
% Rendimiento	21.4 ± 0.2	19.2 ± 0.3
PFC^a	0.37 ± 0.03	0.521 ± 0.02 ^a
PAFC^b	0.19 ± 0.01	0.153 ± 0.01 ^a
Concentración de proteína (%)	72.09 ± 0.21	73.65 ± 0.32

Los resultados representan la media de tres determinaciones independientes ± error estándar. ^a P<0.05 versus método sin modificaciones.

^aPFA: Relación de pureza de la ficocianina (Ec. 2)

^bPAFC: Relación de pureza de la aloficocianina (Ec. 3)

De acuerdo a los resultados, la metodología que se empleó para la obtención del extracto de ficobiliproteínas (Exf) que se utilizó a lo largo de este trabajo fue la modificada, que comprende el método propuesto por Bermejo *et al.*, (2008) más la adición de carbón activado y el fraccionamiento con sulfato de amonio.

9.3.2. Caracterización electroforética de Spr y Exf

Las proteínas *Spirulina* comercial, *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y el extracto de ficobiliproteínas (Exf) fueron caracterizadas electroforéticamente, en la **Fig. 19** se muestra el gel obtenido. La extracción de compuestos fenólicos en Spr no afectó las proteínas, puesto que el perfil electroforético de Spr y *Spirulina* es semejante. Por otro lado, el perfil electroforético de Exf mostró una mayor concentración de ficobiliproteínas.

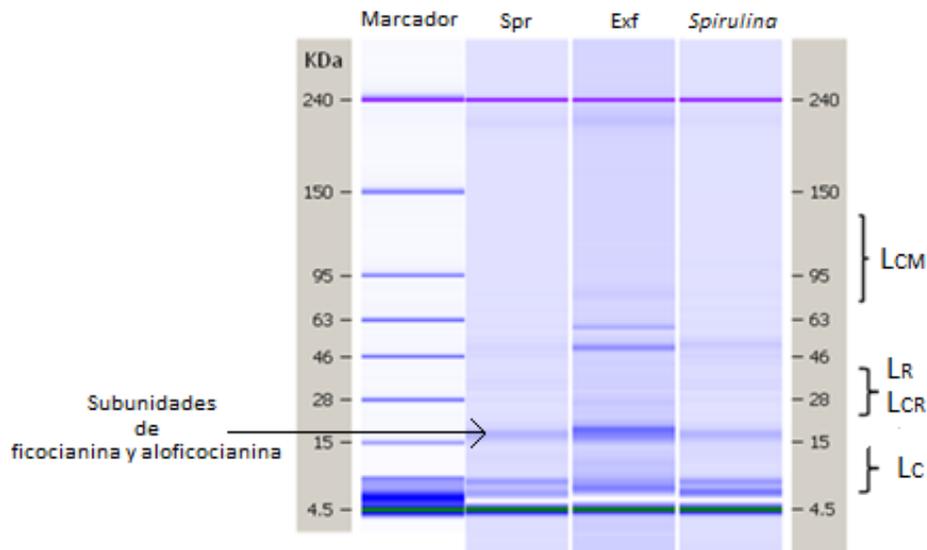


Figura 19. Perfil electroforético de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr), extracto de ficobiliproteínas (Exf) y *Spirulina*. L_{CM}: péptidos de unión núcleo-membrana; L_R: péptidos de unión de barras; L_{CR}: péptidos de unión barra-núcleo; L_C: péptidos de unión del núcleo.

Para todas las muestras se observa una banda de aproximadamente 20 kDa que probablemente corresponda a las subunidades α y β de la ficocianina y aloficocianina, sin embargo debido a la similitud de sus pesos moleculares (ficocianina: 21.5 kDa y 19.0 kDa; aloficocianina: 19.6 kDa y 17.7 kDa), se generó superposición de las proteínas y no fue posible distinguir una de otra. De acuerdo al software empleado para esta determinación, la concentración de proteínas en esta banda para Exf fue de 1620.3 ng/ μ L, mientras que para *Spirulina* y Spr fue de 348 y 435 ng/ μ L respectivamente, de ahí que la intensidad de la banda para Exf sea mayor. La concentración de ficobiliproteínas en Exf es cuatro veces mayor y conforme a los resultados obtenidos en las relaciones de pureza de ficocianina y aloficocianina, la ficocianina se encuentra en mayor proporción.

Además de la banda característica de las ficobiliproteínas, en todos los perfiles electroforéticos se observan más bandas que podrían corresponder a los péptidos de unión responsables del ensamblaje de las ficobiliproteínas dentro del ficobilisoma, ya que de acuerdo a Lundell *et al.*, (1980) los péptidos de unión se mantienen unidos a las ficobiliproteínas a menos de que se les someta a condiciones desnaturalizantes, como la que se empleó en la realización de esta electroforesis. Los pesos moleculares de los péptidos de unión es muy amplio (L_C<10 kDa, L_{RC} 25-27kDa, L_R 27-35 kDa

y L_{CM} 70-120 kDa), por lo que es probable que se encuentren distribuidos en gran parte del gel, en la Fig. 19 se muestra su posible localización.

Para todas las muestras, pero en especial Exf donde la concentración de ficobiliproteínas es mayor, se observa una banda por debajo del marcador de 240 kDa que podría corresponder al arreglo hexamérico de estas proteínas (≈ 232 kDa). Este fenómeno puede atribuirse a los efectos de agregación y disociación que sufren las ficobiliproteínas en solución (Jiang *et al.*, 2001), donde el arreglo hexamérico tiende a protegerse de la desnaturalización debido a que es la unidad funcional *in vivo* (Chaiklahan *et al.*, 2012).

Por último, cabe recordar que las ficobiliproteínas representan solo el 60% del contenido proteico de *Spirulina*, por lo que en especial Spr y Exf pueden contener bandas correspondientes a proteínas diferentes a las ficobiliproteínas, que también influirán en la obtención de los hidrolizados proteicos.

9.3.3. Obtención y caracterización de los hidrolizados proteicos de Spr y Exf

Los hidrolizados proteicos de Spr y Exf obtenidos por la acción secuencial de la pepsina y la pancreatina fueron caracterizados mediante la determinación del grado de hidrólisis y electroforesis. En la Fig. 20 se muestran los resultados obtenidos en la determinación del grado de hidrólisis, se puede observar que las dos muestras mostraron grados de hidrólisis diferentes en los mismos tiempos de reacción, siendo mayor en el hidrolizado proteico de Exf (36.7 %) que en Spr (31.4 %). Lo anterior indica que las ficobiliproteínas son más susceptibles a la acción proteolítica de la pepsina y la pancreática, pues la concentración de estas proteínas en Exf es cuatro veces mayor.

De acuerdo al análisis estadístico realizado, el hidrolizado proteico de Spr mostró un aumento continuo a lo largo de toda la hidrólisis secuencial, siendo mayor entre los 90 y 105 min que corresponde al cambio de enzima (pepsina-pancreatina). Esto se debe a que la hidrólisis previa de las proteínas con pepsina facilitó la acción de la pancreatina al aumentar la disposición de los sitios de corte de esta última, que por ser una mezcla de enzimas son mayores a los de la pepsina.

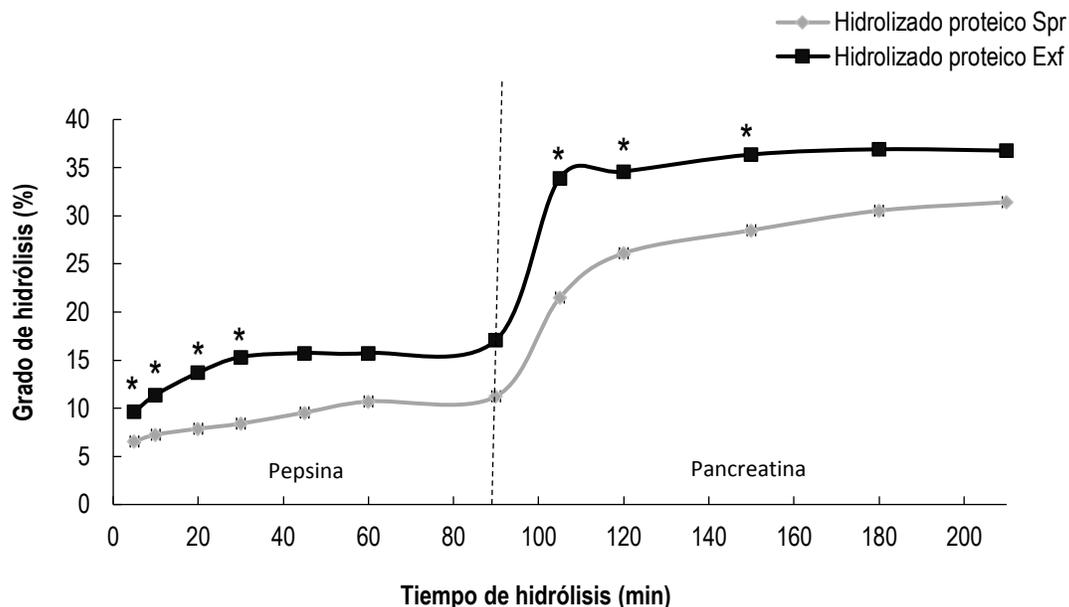


Figura 20.- Grado de hidrólisis de los hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf). Los resultados representan la media de tres determinaciones independientes \pm error estándar, * $P < 0.05$ entre los tiempos de hidrólisis en la misma muestra. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA bifactorial con prueba post-hoc SNK.

En el caso del hidrolizado proteico de Exf a diferencia de Spr, el análisis estadístico indicó que en los 45, 60 y 90 min (hidrólisis con pepsina) y, 180 y 210 min (hidrólisis con pancreatina) no se observó un aumento significativo en el grado de hidrólisis. Lo cual indica que la hidrólisis de las proteínas se dio en los primeros 30 min de acción de la pepsina y en los 45 min después de adicionar la pancreatina, agotando los sitios activos (enlaces peptídicos) susceptibles a hidrólisis en los tiempos posteriores.

La hidrólisis proteica de Spr y Exf fue corroborada mediante electroforesis. En la **Fig. 21** se muestra el perfil electroforético del hidrolizado proteico de Spr a diferentes tiempos de hidrólisis, en el tiempo 0 (sin hidrolizar) se observa la presencia de bandas de aproximadamente 20 kDa que pueden corresponder a las ficobiliproteínas y bandas más nítidas que por sus pesos moleculares pueden ser péptidos de unión. También se observa que a partir de los 5 min de hidrólisis la banda característica de las ficobiliproteínas desaparece y se observa la aparición de bandas < 10 kDa, confirmando la hidrólisis enzimática.

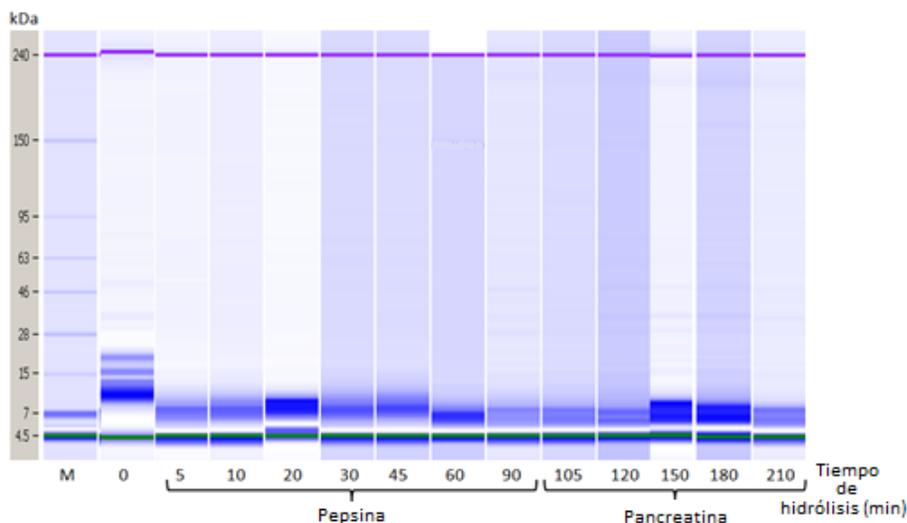


Figura 21.- Perfil electroforético del hidrolizado proteico de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr). Obtenido mediante la acción secuencial de pepsina (0, 5, 10, 20, 30, 45, 60 y 90 min) y pancreatina (105, 120, 150, 180 y 210 min). M: marcador de pesos moleculares (kDa).

En la **Fig. 22** se muestra el perfil electroforético del hidrolizado proteico de Exf en los diferentes tiempos de hidrólisis, al igual que en el gel anterior se confirma la hidrólisis enzimática por la desaparición de la banda característica de las ficobiliproteínas desde el inicio de la hidrólisis (5 min) y la consiguiente aparición de bandas de menor peso molecular < 10 kDa.

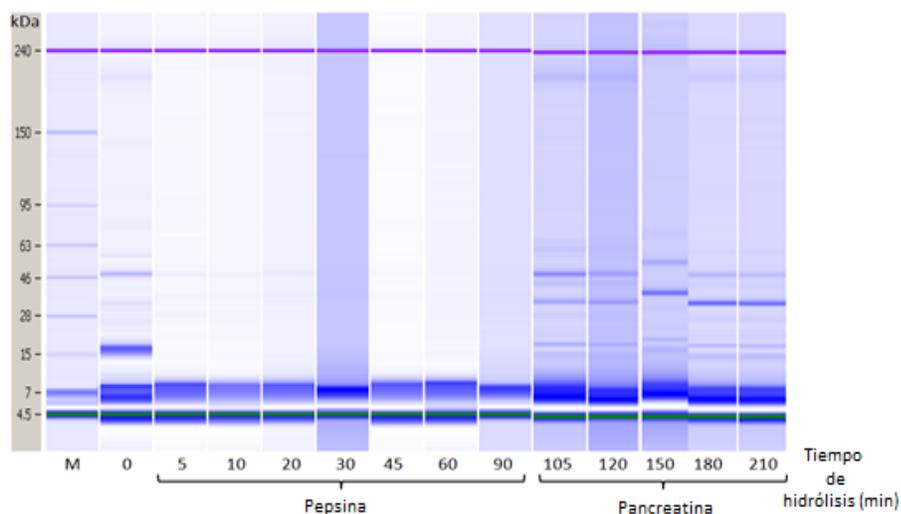


Figura 22.- Perfil electroforético de hidrolizado proteico de extracto de ficobiliproteínas (Exf). Obtenido mediante la acción secuencial de pepsina (0, 5, 10, 20, 30, 45, 60 y 90 min) y pancreatina (105, 120, 150, 180 y 210 min). M: marcador de pesos moleculares (kDa).

En la figura anterior (22), así como en el gel del hidrolizado proteico de Spr se observa la aparición de bandas (14.9, 18.5, 27.7, 35.1, 44.0 48.9 y 61 kDa) en los tiempos correspondientes a la pancreatina, que podrían corresponder a agregados proteicos generados por la hidrólisis enzimática. La formación de estos, puede atribuirse a la gran cantidad de residuos hidrofóbicos que poseen las ficobiliproteínas y los péptidos de unión que al ser expuestos por acción de la hidrólisis, se agregaron de forma irreversible mediante interacciones hidrofóbicas. Y debido a que se logró una mayor exposición de residuos hidrofóbicos con la pancreatina, la aparición de los agregados se dio con esta enzima, siendo más evidente en el hidrolizado de Exf que en el de Spr por la mayor concentración de ficobiliproteínas presente.

9.4. Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante y quelante de los hidrolizados proteicos de Spr y Exf

9.4.1. DPPH

Los radicales DPPH son estables en etanol con absorbancia máxima a 517 nm, cuando encuentran alguna sustancia donadora de protones como un antioxidante, los radicales se estabilizan disminuyendo su absorbancia. En la **Fig. 23**, se muestran los resultados obtenidos con esta determinación en los hidrolizados proteicos de Spr y Exf. En ambas muestras se observó un incremento en el % de inhibición por efecto de la hidrólisis, sugiriendo que la formación de péptidos de menor tamaño favoreció la estabilización de los radicales DPPH, probablemente porque pudieron tener mejor acceso a ellos, ya que de acuerdo a Huang *et al.*, (2005) la estructura química que rodea a estos radicales representa un impedimento estérico para moléculas grandes.

El porcentaje de inhibición de los hidrolizados proteicos de Spr y Exf fue diferente en todos los tiempos de hidrólisis, siendo mayor el de Exf en los tiempos correspondientes a la pepsina y el de Spr con pancreatina. La diferencia observada en ambos hidrolizados se atribuye a la distinta concentración de proteínas en especial de ficobiliproteínas que fueron hidrolizadas, pues en el caso de Exf su concentración es cuatro veces mayor.

El porcentaje máximo de inhibición alcanzado por el hidrolizado proteico de Spr fue de 61% y se mantuvo constante a los 150, 180 y 210 min de hidrólisis, mientras que para el de Exf fue de 41% y se obtuvo a los 120, 180 y 210 min.

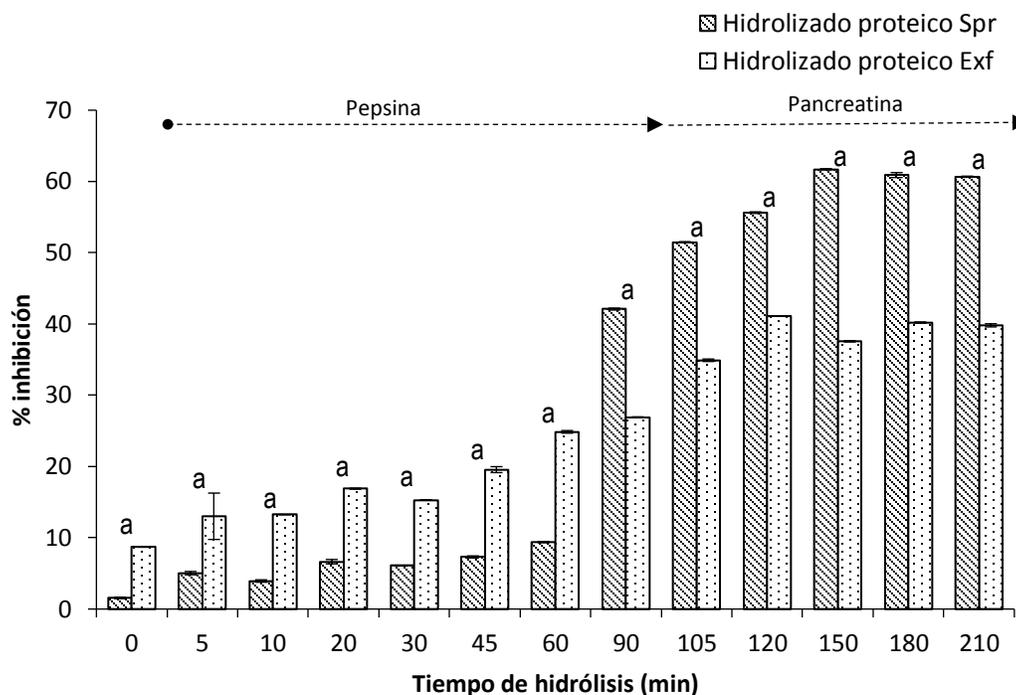


Figura 23.- Actividad antioxidante determinada por el método de DPPH de los hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf). Los hidrolizados fueron obtenidos por acción secuencial pepsina-pancreatina, los valores se presentan como la media de tres determinaciones independientes \pm error estándar. ^aP<0.05 entre muestras en los mismos tiempos de hidrólisis, los datos fueron analizados mediante un ANOVA bifactorial con prueba post-hoc SNK.

El radical DPPH es usado con frecuencia en la evaluación de la eficiencia antirradical de hidrolizados proteicos. Memarpoor *et al.* (2012) reportan 37 y 50% de inhibición en hidrolizados de huevo (lisozima) obtenidos con tripsina y papaína respectivamente y Zhu *et al.*, (2006) reportan 40 % de inhibición en hidrolizados proteicos de germen de trigo preparados con alcalasa. Por lo tanto, los resultados mostrados por los hidrolizados proteicos de Spr y Exf indican que son buenos inhibidores de radicales libres y que podrían ayudar a limitar el daño oxidativo en sistemas vivos.

9.4.2 Ensayo TEAC (ABTS)

En la **Fig. 24** se muestran los resultados obtenidos en el ensayo TEAC que se fundamenta en la decoloración de los radicales ABTS, la actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf) se expresan como μ m de Trolox/ mg proteína.

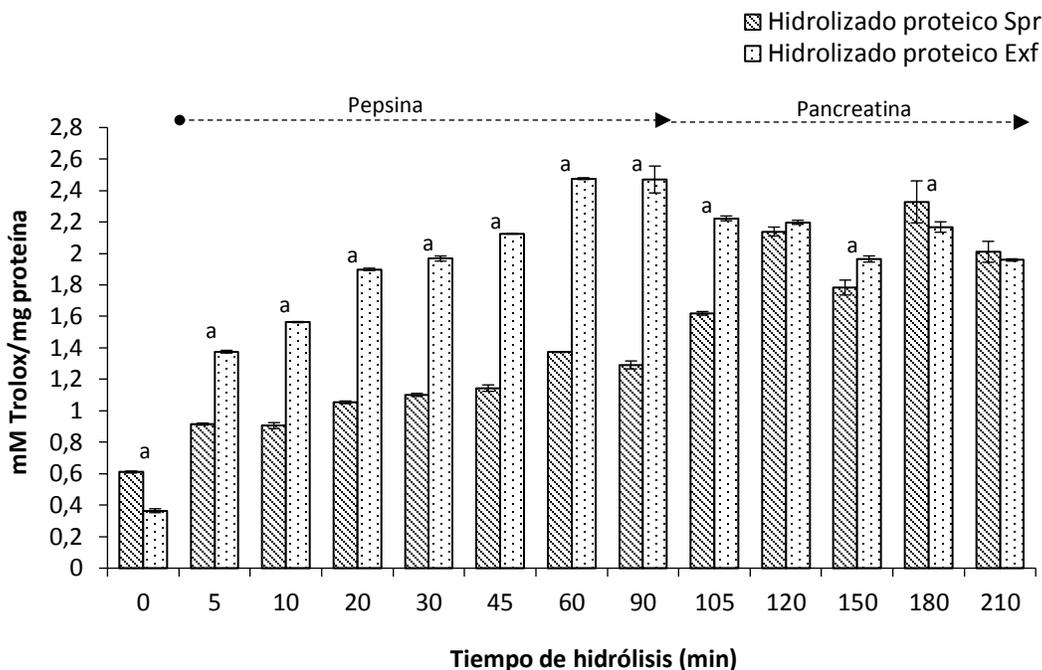


Figura 24.- Actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf) determinada por el radical ABTS (TEAC). Los hidrolizados fueron obtenidos por acción secuencial pepsina-pancreatina, los valores se presentan como la media de tres determinaciones independientes \pm error estándar. $^aP < 0.05$ entre muestras en los mismos tiempos de hidrólisis, los datos fueron analizados mediante un ANOVA bifactorial con prueba post-hoc SNK.

Al igual que con la técnica de DPPH, se observó un aumento en la actividad antioxidante por efecto de la hidrólisis enzimática, ya que se obtuvieron valores TEAC ($\mu\text{mol Trolox/mg proteína}$) superiores en los diferentes tiempos de hidrólisis con respecto al tiempo 0 (sin hidrólisis) tanto en el hidrolizado proteico de Spr como de Exf.

El incremento en la actividad antioxidante del hidrolizado proteico de Spr durante la acción de la pepsina fue gradual hasta los 60 min. Al adicionar la pancreatina se volvió a registrar un aumento hasta los 120 min y después de una ligera disminución a los 150 min, se alcanzó la actividad antioxidante más alta ($2.32 \mu\text{mol Trolox/mg proteína}$) a los 180 min de hidrólisis. Ma *et al.*, (2010) también reportar mayor actividad antioxidante (medida por ABTS) en los últimos tiempos de una hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina de harina de trigo, sugiriendo que los péptidos de menor tamaño estabilizan a los radicales ABTS de forma más eficiente.

A diferencia de lo observado en el hidrolizado proteico de Spr, aunque también hubo un aumento en la actividad antioxidante del hidrolizado proteico de Exf hasta los 60 min de hidrólisis (alcanzando valores superiores a los del hidrolizado de Spr), la actividad antioxidante disminuyó al agregar la pancreatina obteniéndose valores TEAC similares a los obtenidos por el hidrolizado proteico de Spr, los agregados proteicos formados en los tiempos correspondientes a la pancreatina en este hidrolizado pudieron haber limitado su actividad antirradical. De tal forma que a los 120 y 210 min de hidrólisis se obtuvo la misma actividad antioxidante en los dos hidrolizados proteicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos y a las características de la técnica, los hidrolizados proteicos de Spr y Exf fueron capaces de inhibir los radicales DPPH pudiendo actuar como antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, hecho que añade valor, pues en sistemas biológicos existen ambas condiciones.

9.4.3. Poder reductor

El poder reductor es una medida que provee una estimación de la habilidad de los compuestos para reducir el ion férrico a ion hierro. Las muestras con alto poder reductor son más capaces de donar protones o electrones y por lo tanto interrumpir la reacción en cadena de los radicales libres. En la **Fig. 25**, se observa el poder reductor de los hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf) a diferentes tiempos de hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina.

De acuerdo al análisis estadístico realizado, el único incremento que se observó en el poder reductor del hidrolizado proteico de Spr fue a los 120 min de hidrólisis, manteniéndose hasta el final de la hidrólisis, donde se verificó un aumento del 19% con respecto al tiempo 0.

En el hidrolizado proteico de Exf, la hidrólisis con pepsina (0-90 min) provocó una ligera disminución en el poder reductor, sin embargo al adicionar la pancreatina se produjo un incremento considerable que permaneció constante hasta los 210 min de hidrólisis (los valores de absorbancia obtenidos no mostraron diferencia significativa entre ellos), siendo 280% superior al del tiempo 0.

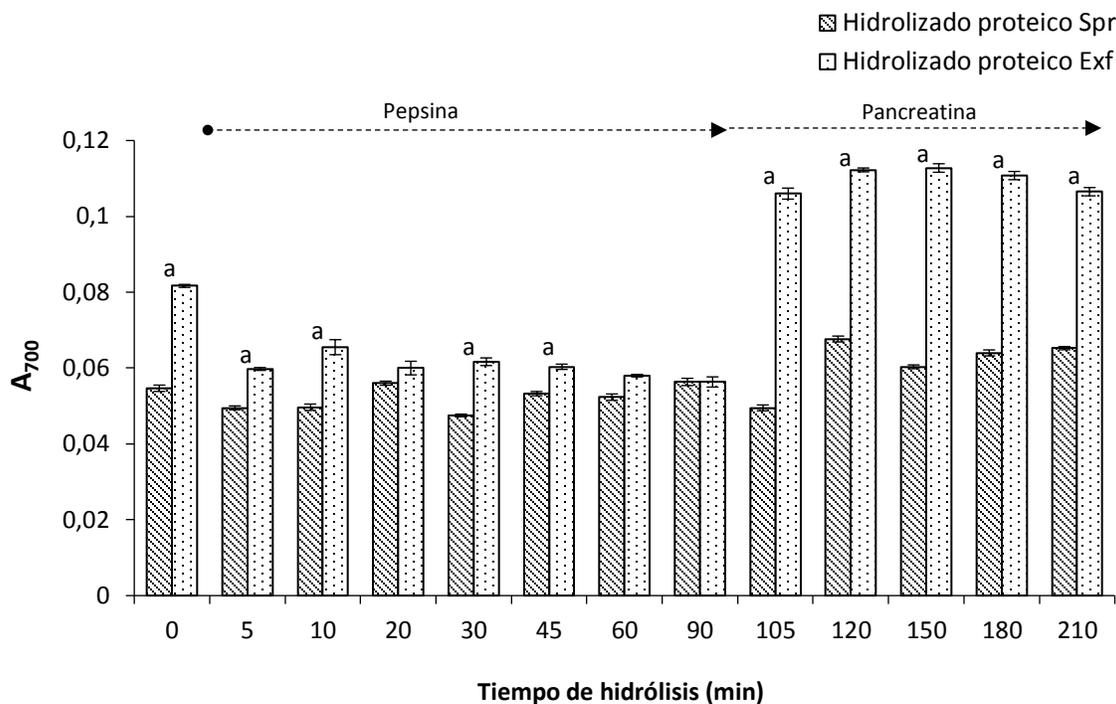


Figura 25.- Poder reductor como medida de la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf). Los hidrolizados fueron obtenidos por acción secuencial pepsina-pancreatina, los valores se presentan como la media de tres determinaciones independientes \pm error estándar. ^aP<0.05 entre muestras en los mismos tiempos de hidrólisis, los datos fueron analizados mediante un ANOVA bifactorial con prueba post-hoc SNK.

De acuerdo a los resultados obtenidos, hubo un incremento en el poder reductor de los hidrolizados proteicos de Spr y Exp obtenidos a los 210 min de hidrólisis con respecto al tiempo 0, siendo mayor en el de Exf. Aunque en diferente grado, ambos hidrolizados fueron capaces de donar protones o electrones al Fe^{3+} mostrando su probable potencial antioxidante. La diferencia observada en ambos hidrolizados puede ser atribuida a la distinta mezcla de péptidos y aminoácidos libres generados por la hidrólisis, ya que el contenido proteico de Spr y Exf es diferente.

9.4.4. Inhibición del blanqueamiento de β -caroteno

Otra técnica que se utilizó para determinar la actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos fue la inhibición del blanqueamiento del β -caroteno, en la **Fig. 26** se muestran los resultados obtenidos a diferentes tiempos de la hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina.

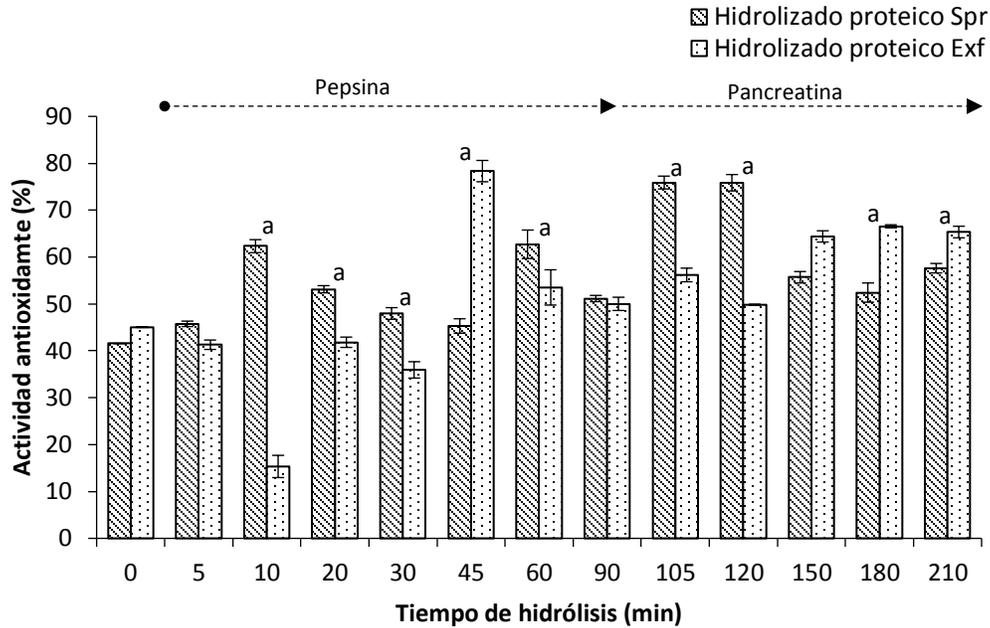


Figura 26.- Actividad antioxidante determinada por el método de inhibición del blanqueamiento del β -caroteno, de los hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf). Los hidrolizados fueron obtenidos por acción secuencial pepsina-pancreatina, los valores se presentan como la media de tres determinaciones independientes \pm error estándar. ^aP<0.05 entre muestras en los mismos tiempos de hidrólisis, los datos fueron analizados mediante un ANOVA bifactorial con prueba post-hoc SNK.

De acuerdo al análisis estadístico realizado, la actividad antioxidante del hidrolizado proteico de Spr aumentó solo a los 10, 20, 60, 105, 120, 150 y 210 min de hidrólisis, los valores obtenidos en los otros tiempos de reacción no mostraron diferencia significativa con respecto al tiempo 0 (sin hidrólisis). El mayor incremento se observó a los 105 y 120 min de hidrólisis con un valor 82% mayor al del tiempo 0, al final de la hidrólisis secuencial (210 min) el aumento en la actividad antioxidante fue de 39%.

Con respecto al hidrolizado proteico de Exf, se observó un incremento en la actividad antioxidante por efecto de la hidrólisis a los 45, 150, 180 y 210 min y a diferencia del hidrolizado proteico de Spr, hubo una disminución en la actividad antioxidante a los 10 min. El mayor incremento en la actividad antioxidante por efecto de la hidrólisis fue de 73% y se dio a los 45 min de proteólisis enzimática y un aumento de 45 % se produjo al final de la hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina.

En ambos hidrolizados se observó variación en la actividad antioxidante obtenida a diferentes tiempos de hidrólisis. Esto se puede atribuir a la formación de mezclas complejas de péptidos y aminoácidos libres en el hidrolizado, que conforme transcurre la hidrólisis se modifican dando lugar a efectos sinérgicos y antagónicos en la actividad antioxidante (Kim *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2003; Suetsuna *et al.*, 2000). La actividad antioxidante de los hidrolizados de Spr y Exf fue la misma a los 0, 5, 90 y 150 min de hidrólisis.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los hidrolizados proteicos de Spr y Exf fueron capaces de secuestrar los radicales peroxilo, impidiendo la decoloración del β -caroteno. Un aumento en la actividad antioxidante de los hidrolizados se observó al final de la proteólisis, así como también en algunos tiempos de la hidrólisis secuencial. Ya que esta determinación *in vitro* es un modelo de peroxidación lipídica, los hidrolizados proteicos de Spr y Exf podrían ser capaces de inhibir la oxidación de lípidos en sistemas biológicos.

9.4.5. Actividad quelante de Fe²⁺

En la **Fig. 27** se muestran los resultados que se obtuvieron en la determinación de quelación de Fe²⁺ en los hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf) a diferentes tiempos de hidrólisis. De acuerdo al análisis estadístico realizado, el único incremento en la actividad quelante fue a los 90 min de hidrólisis, siendo solo de 11 y 7% para el de Spr y Exf respectivamente.

La actividad quelante del hidrolizado Spr permaneció constante hasta los 60 min y después del aumento observado a los 90 min, disminuyó gradualmente hasta el final de la hidrólisis donde se obtuvo 36.4 % de quelación. En el hidrolizado proteico de Exf se presentó disminución de la actividad quelante a los 45 y 60 min de hidrólisis y al igual que en el hidrolizado Spr, hubo una notable reducción de la quelación a partir de los 105 min de hidrólisis, alcanzando al final de la proteólisis 6.3 %, que representa 83% menos que lo obtenidos al tiempo 0.

Entre las diversas propiedades atribuidas a la *Spirulina* esta la de concentrar metales. La capacidad de quelación de la *Spirulina* se ha atribuido a los grupos funcionales presentes en la superficie celular, principalmente a los grupos carboxilo y cadenas laterales de aminoácidos como histidina, cisteína, ácido aspártico y glutámico de sus proteínas (Ashmead *et al.*, 1985), de acuerdo a lo

anterior, la disminución en la capacidad quelante observada en este trabajo puede estar relacionada con la modificación de las proteínas a consecuencia de la hidrólisis enzimática.

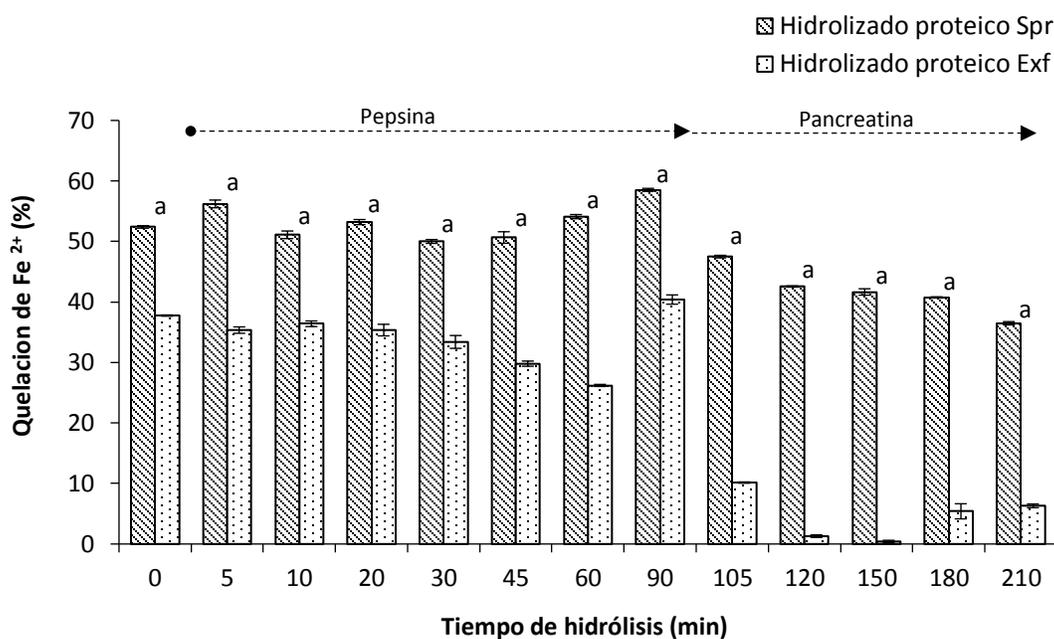


Figura 27.- Actividad quelante de hierro de los hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf). Los hidrolizados fueron obtenidos por acción secuencial pepsina-pancreatina, los valores se presentan como la media de tres determinaciones independientes \pm error estándar. ^aP<0.05 entre muestras en los mismos tiempos de hidrólisis, los datos fueron analizados mediante un ANOVA bifactorial con prueba post-hoc SNK.

Al final de la hidrólisis secuencial (210 min), el hidrolizado proteico de Spr presentó 36.4% de quelación de hierro, valor similar a lo reportado por Memarpour *et al.* (2012) en un hidrolizado proteico de lisozima de huevo obtenido con tripsina, con el que obtuvieron 40% de quelación de Fe^{2+} . El hidrolizado proteico de Spr podría actuar como antioxidante a través de la quelación del hierro, impidiendo la formación de radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton, y de peroxilo en la oxidación lipídica donde puede actuar como catalizador (Jomova y Valko, 2011).

9.4.6. Actividad quelante de Cu^{2+}

En la **Fig. 28** se muestran los resultados obtenidos en la determinación de quelación de cobre de los hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf) obtenidos a diferentes tiempos de hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina. De acuerdo al análisis estadístico realizado, los dos hidrolizados presentaron la misma quelación de Cu^{2+} a 60 y 105 min de hidrólisis.

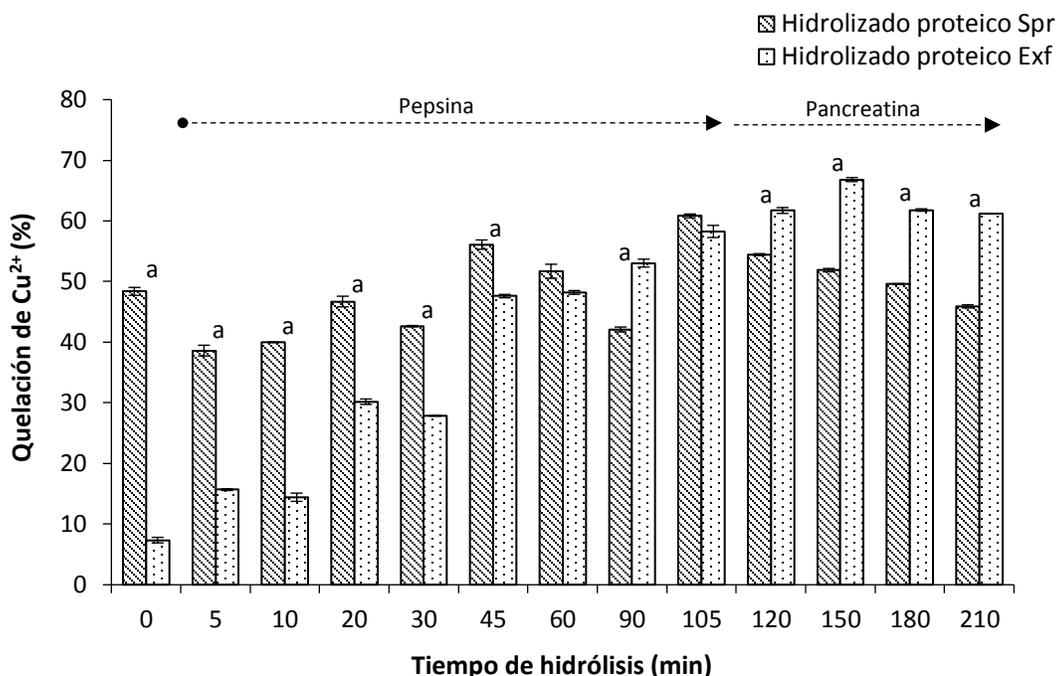


Figura 28.- Actividad quelante de cobre de los hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf). Los hidrolizados fueron obtenidos por acción secuencial pepsina-pancreatina, los valores se presentan como la media de tres determinaciones independientes \pm error estándar. ^aP<0.05 entre muestras en los mismos tiempos de hidrólisis, los datos fueron analizados mediante un ANOVA bifactorial con prueba post-hoc SNK.

La quelación de cobre en el hidrolizado proteico de Spr solo aumento a los 45 y 105 min de hidrólisis, observándose una constante variación de los resultados en los diferentes tiempos de proteólisis, que puede ser atribuida a las diferentes mezclas de péptidos que se generan a cada instante. La hidrólisis a los 210 min no afecto el porcentaje de quelación de cobre, pues no se observó diferencia significativa entre el valor obtenido (46 %) y el del tiempo 0 (sin hidrólisis).

Por otro lado, los valores de quelación de cobre obtenidos a diferentes tiempos de hidrólisis del hidrolizado proteico de Exf fueron mayores al del tiempo 0, en este caso la hidrólisis favoreció la quelación de este metal probablemente por la liberación de péptidos con dicho potencial. El porcentaje más alto de quelación de cobre fue de 67% y se obtuvo a los 105 min de hidrólisis. Al final de la hidrólisis (210 min) se presentó una ligera disminución, alcanzándose 61% de quelación de Cu^{2+} .

Se obtuvo 46 y 67% de quelación de cobre al final de la hidrólisis (210 min) para el hidrolizado proteico de Spr y Exf respectivamente, Carrasco *et al.* (2012) reportan 50% de quelación de Cu^{2+} en un hidrolizado proteico de frijol (*Phaseolus vulgaris*) obtenido por acción secuencial de pepsina-pancreatina. Al igual que el hierro, el cobre puede inducir la formación de especies reactivas de oxígeno vía la reacción de Fenton (Barbusisnski, 2009), por lo que de acuerdo a los resultados obtenidos, los hidrolizados proteicos de Spr y Exp podrían evitar la generación de estrés oxidativo a través de la quelación de Cu^{2+} , impidiendo el desarrollo de enfermedades como el cáncer, en el que se han documentado altos niveles de cobre en las etapas iniciales de carcinogénesis (Roberts *et al.*, 2010).

En el **Cuadro 8** se muestran los resultados obtenidos en las determinaciones de actividad antioxidante y quelante de los hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf) obtenidos por hidrólisis secuencial con pepsina-pancreatina. A excepción del método de TEAC (ABTS), los hidrolizados proteicos a los 210 min de hidrólisis mostraron diferencia significativa en los resultados de las diferentes determinaciones realizadas, obteniéndose valores más altos con el hidrolizado proteico de Spr en DPPH y quelación de hierro; y de poder reductor, β -caroteno y quelación de cobre con el de Exf. Además de las diferencias en los mecanismos y condiciones de reacción de los métodos probados, la variación de los resultados puede atribuirse a la distinta composición y concentración de proteínas en Spr y Exf mostrada en su perfil electroforético (Fig. 19), que al hidrolizarse de forma diferente (siendo mayor el grado de hidrólisis en el hidrolizado proteico de Exf) generó una mezcla diversa de péptidos y aminoácidos libres al final de la proteólisis.

Cuadro 8. Capacidad antioxidante y quelante de los hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y extracto de ficobiliproteínas (Exf) obtenidos por hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina (210 min).

Determinación	Hidrolizado proteico	
	Spr	Exf
DPPH (% inhibición)	60.7 ± 0.1^a	39.8 ± 0.2 ^a
TEAC (ABTS) (µm Trolox/mg proteína)	2.01 ± 0.07	1.96 ± 0.01
Poder reductor (A ₇₀₀)	0.065 ± 0.001 ^a	0.107 ± 0.001^a
Inhibición del blanqueamiento de β-caroteno (% actividad antioxidante)	57.6 ± 1.0 ^a	65.3 ± 1.2^a
Quelación de Fe ²⁺ (%)	36.5 ± 0.3^a	6.3 ± 0.3 ^a
Quelación de Cu ²⁺ (%)	45.9 ± 0.3 ^a	61.2 ± 0.2^a

Los valores se presentan como la media ± error estándar. ^aP<0.05 entre hidrolizados en la misma determinación, en negro se marca el hidrolizado proteico que obtuvo mejores resultados en cada determinación.

La obtención de Exf para la elaboración de su hidrolizado proteico implica un rendimiento bajo (19.2%) y por otro lado, el poder de quelación de hierro obtenido después de la hidrólisis secuencial fue casi abatido, comprometiendo su actividad antioxidante a través de este mecanismo. Con el hidrolizado proteico de Spr además de obtener una mayor capacidad de quelación de Fe²⁺ y de inhibición de radicales DPPH, se obtuvieron valores adecuados de poder reductor, inhibición del blanqueamiento del β-caroteno y quelación de cobre, correspondientes a 61, 88 y 75% de lo obtenido con el hidrolizado proteico de Exf.

De acuerdo a lo anterior, el hidrolizado proteico de Spr presentó actividad antioxidante *in vitro* a través de diversos mecanismos como la inhibición de radicales libres, donación de protones o electrones y quelación de metales de transición, que lo convierten en un potencial antioxidante a ser probado en sistemas biológicos. Por lo tanto, se empleó este hidrolizado para la evaluación de su efecto antioxidante como mecanismo de acción en la quimioprevención de carcinogénesis de colon en ratón.

9.5. Evaluación antioxidante y quimiopreventiva del hidrolizado proteico de Spr

9.5.1. Peso corporal de los animales de experimentación

En la Fig. 29 se observa la ganancia acumulada en los días de tratamiento, del peso promedio de los ratones distribuidos en los diferentes grupos experimentales. De acuerdo a los resultados obtenidos, el AOM a la dosis de 5 mg/kg no presentó efecto tóxico, puesto que no se observó diferencia significativa entre la ganancia de peso acumulada del tesigo negativo y positivo. Al igual que en este trabajo, se ha observado que el AOM a la dosis de 5 mg/kg no afecta la ganancia de peso de ratones cepa ICR (Lai *et al.*, 2011), ni de otras diferentes (Segunpta *et al.*, 2005; Torzas *et al.*, 1996).

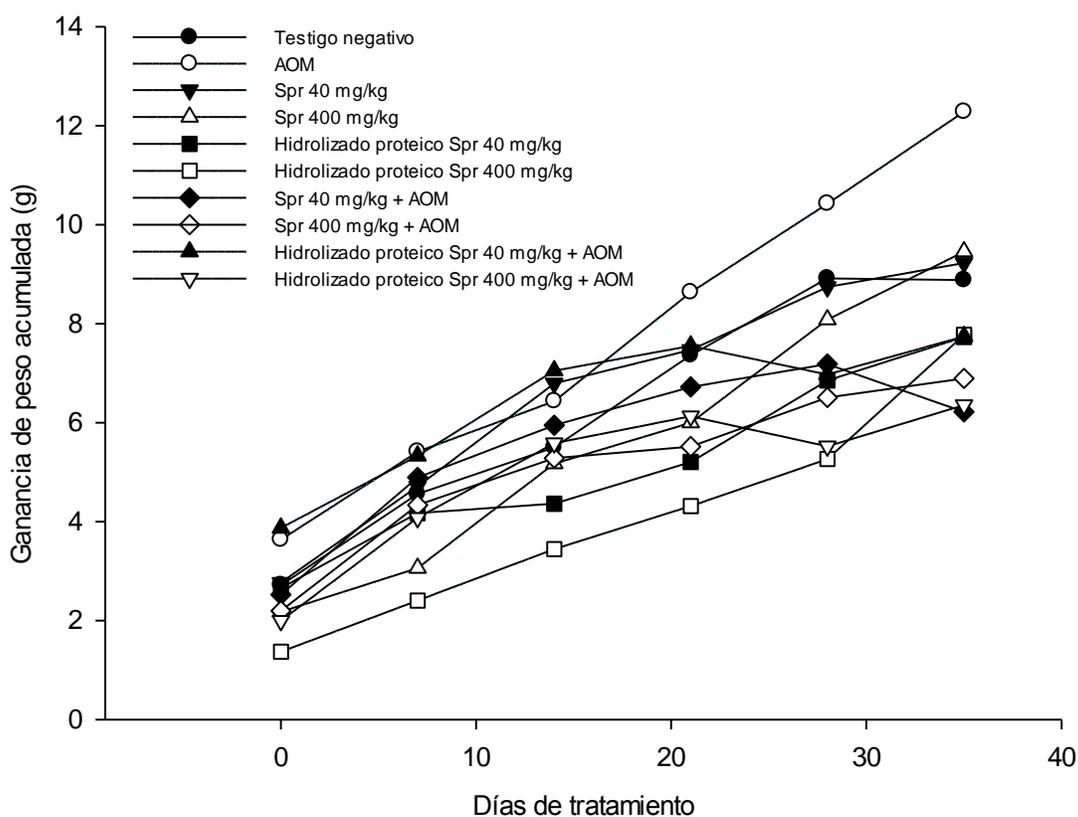


Figura 29.- Ganancia de peso corporal acumulado (g) a lo largo del ensayo, en los diferentes grupos experimentales tratados con *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr), hidrolizado proteico de Spr y azoximetano (AOM). Los valores se presentan como la media \pm error estándar y fueron analizados mediante un ANOVA bifactorial con prueba post-hoc SNK.

Sin embargo, dosis más altas del carcinógeno (10 mg/kg) si han presentado efecto tóxico en ratones al disminuir su peso corporal (Ravinder *et al.*, 2009; Au *et al.*, 2006).

El hidrolizado proteico de Spr a la dosis de 400 mg/kg disminuyo la ganancia de peso tanto en el grupo tratado unicamente con el hidrolizado como en el combinado con azoximetano, ya que estos grupos presentaron diferencia significativa al ser comparados con su respectivo grupo testigo. Este efecto puede ser atribuido a la generación de péptidos tóxicos por acción de la hidrólisis, que al encontrarse en mayor concentración a diferencia del hidrolizado a la dosis baja (40 mg/kg) provocó algún efecto toxico que se reflejó en una menor ganancia de peso corporal. La generación de péptidos tóxicos por hidrólisis enzimática ha sido reportada (Katoa *et al.*, 2007).

Por otro lado, el hidrolizado a la dosis baja, asi como tambien Spr a ambas dosis no afectaron la ganancia de peso acumulado al ser administrados solos o en combinación con el carcinógeno. En teoría, el efecto producido por Spr y su hidrolizado proteico a las mismas dosis tendría que ser semejante, ya que la única diferencia entre ambas muestras es la hidrólisis secuencial con pepsina-pancreatina y como dicha hidrólisis simula la digestión gastrointestinal, las proteínas de Spr al pasar por el tracto digestivo de los ratones tendrían que generar una mezcla de péptidos y aminoácidos libres similar a la obtenida *in vitro* en el hidrolizado proteico. Por otro lado, el contenido proteico del hidrolizado ya no tendría que ser modificado al administrarse a los animales, puesto que la hidrólisis *in vitro* se realizó de forma extensiva y todos los enlaces peptídicos que pudieron estar sujetos a corte durante la digestión de las proteínas fueron escindidos previamente. La diferencia observada sugiere que la hidrólisis realizada *in vitro* generó una serie de péptidos y aminoácidos diferentes a los que se generaron de forma "natural" a través de la digestión gastrointestinal, lo cual es entendible debido a la complejidad que comprende la digestión gástrica (Kong y Singh, 2008). Aunado a esto, se sabe que la hidrólisis proteica implica además de cambios en la estructura de las proteínas, cambios de carácter físico químico como pH, viscosidad, fuerza iónica e hidrofobicidad que pudieron haber interferido en el proceso digestivo del hidrolizado proteico.

9.5.2. Evaluación de la capacidad antioxidante del hidrolizado proteico de Spr

9.5.2.1. Peroxidación lipídica

En la Fig. 30 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de lipoperoxidación en tejido de colon e hígado, de los ratones macho cepa ICR distribuidos en los diferentes grupos experimentales. Los valores se presentan como nanomoles del principal producto de la peroxidación lipídica (malonildialdehído) sobre miligramo de proteína.

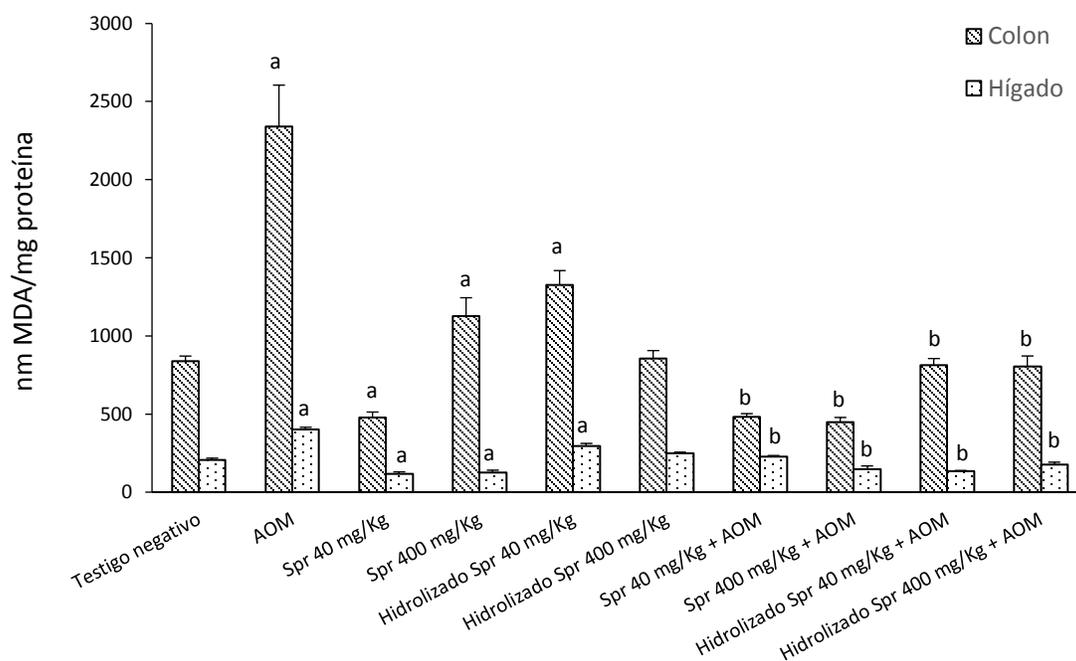


Figura 30.- Lipoperoxidación en tejido de colon e hígado de ratones macho cepa ICR administrados con *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr), hidrolizado proteico de Spr y azoximetano (AOM). Los valores se presentan como la media \pm error estándar. ^aP<0.05 versus testigo negativo, ^bP<0.05 versus testigo positivo, los datos fueron analizados mediante un ANOVA unifactorial con prueba post-hoc SNK.

El AOM aumentó los niveles de MDA tanto en colon como hígado. En colon la peroxidación lipídica se elevó casi al triple con respecto al valor basal obtenido (testigo negativo), y en hígado aunque en general los valores de lipoperoxidación fueron menores, el carcinogénó también provocó oxidación de lípidos, alcanzando el doble del nivel basal observado en este tejido. Los resultados reportados

en otros trabajos son contradictorios, por ejemplo Attaallah *et al.*, (2012) no observaron cambio significativo en los niveles de peroxidación lipídica en tejido de colon e hígado de ratas Wistar después de 27 semanas de tratamiento con AOM más DSS (dextran sulfato de sodio), mientras que Sengupta *et al.*, (2003) encontraron un aumento de más del doble en los niveles de peroxidación lipídica en tejido de colon e hígado de ratas Sprague-Dawley después de 12 semanas de la primer administración de AOM. Las diferencias observadas además de ser atribuidas al diferente metabolismo de ratas y ratones, pueden ser atribuidas a la dosis y tiempo de exposición del carcinógeno.

Por otro lado, Spr a la dosis de 40 mg/kg disminuyó los niveles basales de lipoperoxidación tanto en colon como hígado, y a la dosis alta (400 mg/kg) en colon los aumentó en 43%, mientras que en hígado los disminuyó. El hidrolizado proteico de Spr a la dosis baja incremento los niveles basales de lipoperoxidación en ambos tejidos, mientras que a la dosis alta se mantuvieron constantes. Sin embargo, a las dos dosis probadas tanto Spr como su hidrolizado proteico fueron capaces de inhibir la peroxidación lipídica provocada por el AOM en colon e hígado, pues todos los grupos a los que se les administró Spr o el hidrolizado además del carcinógeno, presentaron niveles de MDA más bajos con respecto al grupo tratado con AOM.

En colon, Spr a 40 y 400 mg/kg lograron proteger en mayor grado la oxidación provocada por el AOM, disminuyendo ambas dosis 80% los niveles de lipoperoxidación, ya que no se observó diferencia significativa entre ambos grupos. El hidrolizado proteico de Spr disminuyó en un 65% los niveles de MDA, sin mostrar diferencia significativa entre la dosis alta y baja.

Con respecto al hígado, el mayor efecto protector fue ejercido con Spr a la dosis alta y el hidrolizado proteico a la dosis baja, con una reducción de 63 y 66% en los niveles de lipoperoxidación. Mientras que Spr a 40 mg/kg y el hidrolizado a 400 mg/kg disminuyeron respectivamente 42 y 55% la oxidación lipídica provocada por el AOM.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el AOM generó peroxidación lipídica en colon e hígado y tanto Spr como su hidrolizado proteico protegieron de dicha oxidación y de los efectos negativos que de ella se derivan.

9.5.2.2. Oxidación de proteínas

En la **Fig. 31** se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas oxidadas en colon e hígado de ratón distribuidos en los diferentes grupos experimentales, los resultados se reportan como nanomoles de grupos carbonilo sobre miligramo de proteína. En general, se observa un mayor contenido de grupos carbonilo en colon que hígado.

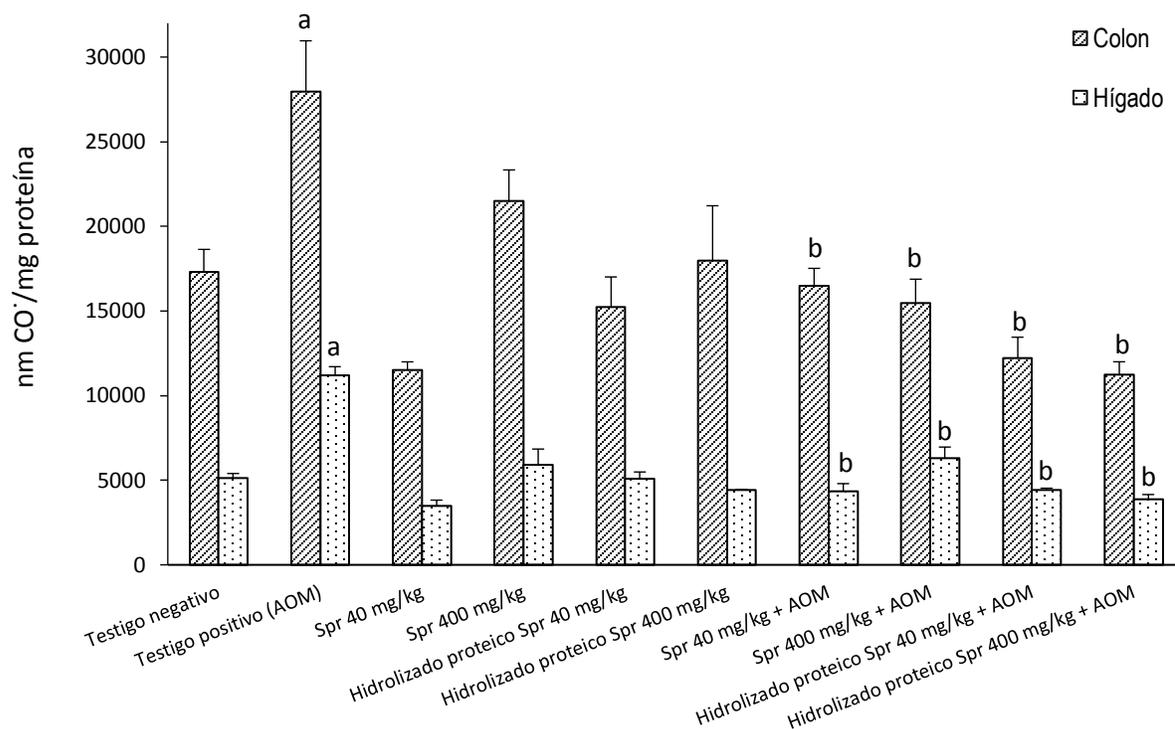


Figura 31.- Contenido de grupos carbonilo como medida de la oxidación de proteínas en tejido de colon e hígado de ratones macho cepa ICR administrados con *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr), hidrolizado proteico de Spr y azoximetano (AOM). Los valores se presentan como la media \pm error estándar. ^aP<0.05 versus testigo negativo, ^bP<0.05 versus testigo positivo, los datos fueron analizados mediante un ANOVA unifactorial con prueba post-hoc SNK.

En la figura de arriba se puede observar que el AOM produjo la formación de grupos carbonilo en colon e hígado, indicando oxidación de proteínas en ambos órganos. En colon, el aumento en el contenido de grupos carbonilo fue de 61% y en hígado de 118% con respecto a los niveles basales mostrados por su respectivo testigo positivo. A diferencia de lo observado en este trabajo, Attaallah

et al., (2012) reportan que el AOM en ratas Wistar no provocó oxidación de proteínas en tejido de colon e hígado después de 27 semanas de tratamiento con AOM más DSS (dextran sulfato de sodio).

Por otro lado, Spr y el hidrolizado proteico de Spr no indujeron oxidación de proteínas en colon e hígado, ya que los grupos a los que se les trató únicamente con ellos no mostraron diferencia significativa con respecto al testigo negativo. Por el contrario, Spr y su hidrolizado proteico ejercieron protección contra la oxidación de proteínas en ambos órganos, ya que los grupos a los que se les administró dichas muestras en combinación con el AOM presentaron niveles más bajos de grupos CO^\cdot respecto al testigo positivo.

En colon, el hidrolizado proteico de Spr a las dosis de 40 y 400 mg/kg consiguió reducir en mayor proporción los niveles de oxidación de proteínas, disminuyendo en un 56% y 59% los niveles de CO^\cdot . Spr inhibió en un 41% y 44% la oxidación de proteínas a la dosis baja y alta respectivamente.

En relación al hígado, Spr a la dosis de 40 mg/kg y el hidrolizado proteico a ambas dosis (40 y 400 mg/kg) disminuyeron en promedio 62% la oxidación de proteínas generada por el AOM, sin diferencia significativa entre estos grupos. Spr a la dosis alta solo logró disminuir en 43% los niveles de CO^\cdot .

En menor o mayor grado, Spr y su hidrolizado proteico ejercieron un efecto protector contra la oxidación de proteínas inducida por azoximetano en colon e hígado de ratón, impidiendo la afectación en las funciones de receptores y enzimas como las de reparación del ADN.

9.5.2.3. Óxido nítrico

Se determinó el óxido nítrico de forma indirecta por medio de la reacción de Griess, que cuantifica nitrito. En la **Fig. 32** se muestran los resultados expresados como μmoles de NO_2^- por gramo de tejido, la determinación se realizó en el colon e hígado de los ratones distribuidos en los diferentes grupos experimentales. El AOM incrementó en casi el doble los niveles de nitrito en colon e hígado con respecto a los niveles basales (testigo negativo) obtenidos en cada órgano.

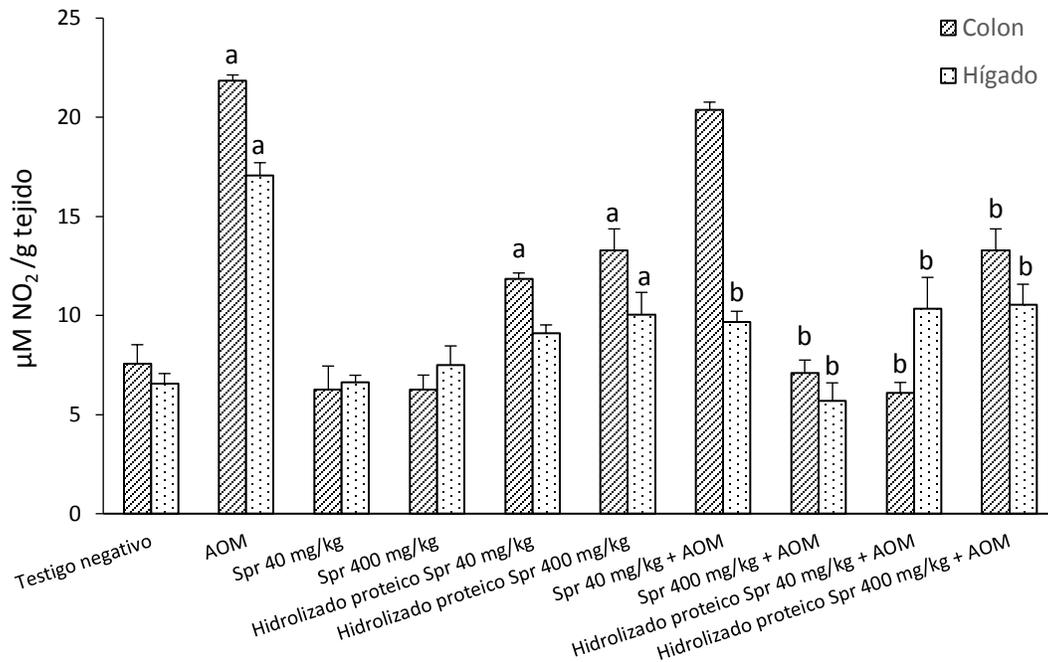


Figura 32.- Contenido de NO₂⁻ como medida indirecta del NO en tejido de colon e hígado de ratones macho cepa ICR administrados con *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr), hidrolizado proteico de Spr y azoximetano (AOM). Los valores se presentan como la media ± error estándar. ^aP<0.05 versus testigo negativo, ^bP<0.05 versus testigo positivo, los datos fueron analizados mediante un ANOVA unifactorial con prueba post-hoc SNK.

El incremento observado esta relacionado con el aumento en los niveles de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS), pues se ha observado que la administración del carcinógeno AOM aumenta los niveles de esta enzima (Rao *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2001).

En colon, Spr no indujo la generación de nitrito con ninguna de las dosis probadas, pues no se observó diferencia negativa entre los valores obtenidos en el testigo negativo y los grupos a los que se les administro, por otro lado el hidrolizado proteico a 40 y 400 mg/kg aumentó los niveles de nitrito en colon, siendo mayor con la dosis alta. Estos resultados contrastan en cierta forma con lo observado en los grupos a los que se les administró tanto Spr como su hidrolizado proteico, pues a excepción de Spr a la dosis baja, todos lograron disminuir los niveles de NO₂⁻ inducidos por el AOM. La muestra que disminuyó en mayor proporción estos niveles fue el hidrolizado a la dosis baja, que redujo en 72% el NO₂⁻. Spr y su hidrolizado proteico a la dosis alta consiguieron una disminución de 67% y 39% del nitrito generado por el AOM.

En hígado solo el hidrolizado proteico a la dosis alta incremento los niveles de nitrito, en comparación con el valor basal observado. Sin embargo Spr y el hidrolizado proteico (a ambas dosis) lograron amortiguar el efecto del AOM, en cuanto a los niveles de nitrito se refiere. Spr a la dosis de 400 mg/kg disminuyó en mayor proporción (66%) la generación de NO₂⁻ con respecto al testigo positivo. Spr a la dosis baja y el hidrolizado proteico a ambas dosis redujeron en la misma proporción (40%) los niveles de nitrito generado por el AOM pues no hubo diferencia significativa entre ellos.

El nitrito es el producto más estable de la reducción del óxido nítrico, que es la especie reactiva de nitrógeno más importante. El AOM incrementó la concentración de nitrito y por lo tanto de óxido nítrico en colon e hígado de ratón a través de la inducción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOSi). Sin embargo, Spr y Exf a 40 y 400 mg/kg disminuyeron los niveles de nitrito generados por el carcinógeno en hígado mientras que en colon, Spr a la dosis alta y el hidrolizado proteico a las dos dosis también redujeron estos niveles. La inhibición de la formación de óxido nítrico es una de las estrategias de la quimioprevención de cáncer de colon ya que se ha observado una relación directa entre la expresión de NO/NOSi y mutaciones p53 en la etapa inicial de carcinogénesis (Rao *et al.*, 2004).

9.5.3. Evaluación del efecto quimiopreventivo del hidrolizado proteico de Spr

En el **Cuadro 9** se muestran los resultados obtenidos en la evaluación del efecto quimiopreventivo de *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr) y su hidrolizado proteico, a través de la identificación de lesiones preneoplásicas en colon. Los datos se muestran de acuerdo a la clasificación hecha por Faris *et al.*, (2009) en donde las lesiones son divididas como criptas aberrantes simples (1 sola cripta) y focos de criptas aberrantes (con más de una cripta). En la **Fig. 33** se muestra el tipo de lesiones preneoplásicas encontradas en este trabajo y la forma en la que se clasificaron.

En el cuadro 9 se observa que el AOM promovió el desarrollo de criptas aberrantes (CA), pues los grupos tratados con este, presentaron más lesiones preneoplásicas. Los animales administrados con el carcinógeno presentaron principalmente CA simples después de 21 días de la primera administración de AOM (5 mg/kg), la formación de focos de criptas aberrantes (FCA) fue mucho menor.

Cuadro 9.- Incidencia y tipo de criptas aberrantes (CA) en colon de ratones tratados con *Spirulina* reducida en polifenoles (Spr), hidrolizado proteico de Spr y/o azoximetano (AOM)

GRUPO	CA	FCA			Total CA/Colon
		2 CA	3 CA	4 CA	
Testigo negativo	3.67 ± 0.42				3.67 ± 0.42
AOM	44.83 ± 2.68 ^a	9.67 ± 1.45 ^a	1.17 ± 0.17 ^a	0.17 ± 0.1	68.50 ± 4.40 ^a
Spr 40 mg/kg	4.5 ± 0.43				4.5 ± 0.43
Spr 400 mg/kg	3.0 ± 0.37				3.0 ± 0.37
HSpr 40 mg/kg	3.17 ± 0.31				3.17 ± 0.31
HSpr 400 mg/kg	4.83 ± 0.31				4.83 ± 0.31
Spr 40 mg/kg + AOM	49.67 ± 2.64 ^b	2.67 ± 0.80 ^b	0.41 ± 0.17		55.50 ± 2.32 ^b
Spr 400 mg/kg + AOM	17.83 ± 1.51 ^b	0.17 ± 0.1 ^b			18.17 ± 1.64 ^b
HSpr 40 mg/kg + AOM	29.83 ± 2.55 ^b	0.17 ± 0.1 ^b			30.17 ± 2.63 ^b
HSpr 400 mg/kg + AOM	42.83 ± 2.39	1.17 ± 0.54 ^b			45.17 ± 1.85 ^b

Los resultados se presentan como la media ± error estándar y fueron analizados mediante un ANOVA unifactorial con una prueba post-hoc SNK. ^aP<0.05 versus testigo negativo, ^bP<0.05 versus testigo positivo.

Ching *et al.*, (2011) y Lai *et al.*, (2011) reportan un número similar de CA al emplear la misma cepa de ratones y dosis de AOM, sin embargo en ambos trabajos también se reporta la formación de FCA, lo cual puede ser atribuido al mayor tiempo de exposición del carcinógeno (6 semanas). Por otro lado, tanto Spr como el hidrolizado de Spr no indujeron el desarrollo de CA, ya que no presentaron diferencia significativa respecto al testigo negativo.

Por otro lado Spr y su hidrolizado proteico a las dos dosis probadas inhibieron la formación de CA promovida por el AOM. Sin embargo se tuvo un mejor efecto protector con Spr a la dosis alta y con el hidrolizado proteico a la dosis baja, logrando reducir en 73 y 56% el desarrollo de criptas aberrantes totales.

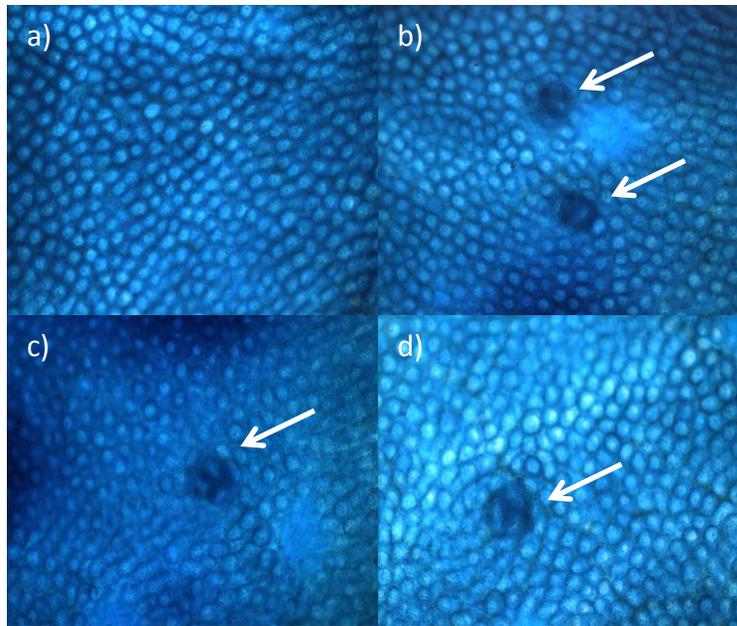


Figura 33.- Imagen al microscopio (x10) de la mucosa de colon de ratón, se muestran los diferentes tipos de criptas encontrados en este trabajo. a) criptas normales, b) 2 criptas aberrantes simples, c) foco de dos criptas y d) foco de tres criptas.

Son pocos los trabajos enfocados al estudio del efecto quimiopreventivo de hidrolizados proteicos en modelos similares al utilizado en este trabajo. Uno de ellos es el reportado por Attaallah *et al.*, (2012), en el que evalúan el efecto protector de un hidrolizado proteico de suero de leche, contra el desarrollo de tumores en colon de ratas; ellos encontraron que el hidrolizado tuvo un mejor efecto protector en comparación con la misma muestra sin hidrolizar. En este trabajo también se observó mayor potencial quimiopreventivo en el hidrolizado proteico de Spr, pero solo a la dosis baja (40 mg/kg), pues a la dosis alta (400 mg/kg) se observó un mejor efecto protector con Spr (sin hidrolizar).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación del efecto antioxidante y quimiopreventivo del hidrolizado proteico de Spr, la hidrólisis secuencial con pepsina-pancreatina generó una mezcla diferente de péptidos y aminoácidos libres a la obtenida a través de la digestión gastrointestinal de los ratones, pues si bien no se observó una diferencia clara en las determinaciones de oxidación, los resultados obtenidos en la ganancia de peso de los animales sugieren la probable liberación o formación de algún péptido que a altas concentraciones tuvo efecto tóxico, repercutiendo en el peso

corporal de los animales. Sin embargo el hidrolizado proteico de Spr no presentó actividad carcinogénica en el colon de los ratones, puesto que no indujo la formación de criptas aberrantes.

Por otro lado, tanto Spr como su hidrolizado proteico protegieron a lípidos y proteínas de la oxidación provocada por el AOM en el colon, siendo mayor la protección de proteínas con Spr y la de lípidos con el hidrolizado proteico. Los resultados parecen indicar que la hidrólisis con pepsina-pancreatina favoreció la formación de péptidos capaces de actuar en interfaz agua-lípido, esto concuerda con lo observado en la composición de aminoácidos de *Spirulina* donde por el alto contenido de aminoácidos hidrófobos se sugiere la probable liberación de este tipo de péptidos, lo cual dependería esencialmente del tipo de proteasa empleada.

Spr y el hidrolizado proteico fueron capaces de proteger tanto del desarrollo de lesiones preneoplásicas en colon como de la oxidación de lípidos y proteínas, sin embargo no se encontró una relación directa entre la actividad antioxidante y el efecto quimiopreventivo, porque aunque Spr y el hidrolizado proteico mostraron una reducción considerable en los niveles de oxidación, la disminución de criptas aberrantes fue menor. Por lo tanto, si bien el efecto antioxidante contribuyó en el efecto quimiopreventivo, no se descarta que existan otros mecanismos diferentes. Esta afirmación se sustenta en las investigaciones que sugieren que la *Spirulina* posee actividad quimiopreventiva, siendo la ficocianina por su capacidad de inhibición selectiva de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y de inducción de apoptosis, el compuesto al que se le ha prestado mayor atención (Ravi, 2010), otro compuesto es el calcio spirulan (Ca-Sp) que ha mostrado ser capaz de inhibir la invasión de tumores y metástasis (Zhang *et al.*, 2001).

Respecto a los resultados obtenidos en la determinación de óxido nítrico, Spr a 400 mg/kg y el hidrolizado proteico a 40 y 400 mg/kg fueron capaces de inhibir la producción de NO, dicha reducción pudo ser debida a represión en la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (NOSi), inhibición de NOSi o bien al secuestro de los radicales NO. En este caso, si se observó una relación directa entre la disminución de los niveles de NO y la disminución en el desarrollo de criptas aberrantes (CA), ya que las muestras que redujeron en mayor grado los niveles de NO fueron también las que presentaron un mayor poder de inhibición de CA. Esto se puede asociar a que el efecto inhibitorio del NO en carcinogénesis no solo se asocia a la actividad antioxidante, sino

también a la inhibición de la angiogénesis, mejoramiento de la diferenciación y apoptosis (Rao *et al.*, 2004).

Es importante resaltar que además del efecto producido por la hidrólisis secuencial pepsina-pancreatina o bien por la digestión gastrointestinal en las proteínas, no se debe descartar la participación de otros compuestos presentes en *Spirulina*, ya que como se mencionó posee una amplia variedad de nutrientes y fitoquímicos que pudieron haber afectado a un amplio rango de moléculas intracelulares claves en el proceso carcinogénico, dando lugar a respuestas celulares como inducción de apoptosis, bloqueo de transformación y proliferación celular.

A pesar de la amplia variedad de propiedades nutricionales y terapéuticas atribuidas a la *Spirulina*, por su intenso color, olor y sabor su consumo es bajo. Se han buscado alternativas para adicionarla a productos alimenticios como galletas, pasta, dulces y yogurt para aumentar su grado de aceptación (Hosseini *et al.*, 2013). A expensas de otros estudios, el hidrolizado proteico de Spr (40 mg/kg) podría representar una opción de consumo, ya que al igual que Spr a dosis altas (400 mg/kg) presenta actividad antioxidante y efecto quimiopreventivo, con una notable reducción en el sabor y olor, y mejora en el color ya que de verde intenso se torna a azul claro por la modificación de los cromóforos presentes en las ficobiliproteínas.

Uno de los objetivos planteados en la realización de esta parte del trabajo, fue evaluar si el AOM además de producir estrés oxidativo en colon, también lo hacía en hígado. Ya que aunque se sabe que es el órgano clave en la biotransformación del carcinógeno, no hay estudios que evalúen el efecto producido en él. De acuerdo a los resultados obtenidos el AOM también provocó oxidación en hígado al incrementar los niveles de óxido nítrico (NO), grupos carbonilo (CO[·]) y malondialdehído (MDA) después de 21 días de la primera administración. Esta información podría resultar útil en el planteamiento de investigaciones encaminadas al estudio de afectaciones específicas producidas por el AOM en hígado.

X. CONCLUSIONES

- La *Spirulina* además de ser una fuente importante de proteína de buena calidad por su alto contenido proteico (67.25%) y adecuado perfil de aminoácidos, es una fuente potencial de obtención de péptidos con actividad antioxidante.
- Los hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles y extracto de ficobiliproteínas mostraron grados de hidrólisis diferentes (31.4 y 36.7%) indicando que las ficobiliproteínas son más susceptibles a la acción secuencial pepsina-pancreatina.
- En general se observó un incremento en la actividad antioxidante *in vitro* de los hidrolizados proteicos de *Spirulina* reducida en polifenoles y extracto de ficobiliproteínas por acción de la hidrólisis secuencial, aunque las ficobiliproteínas juegan un papel importante en la liberación de péptidos con actividad antioxidante el resto de las proteínas presentes en *Spirulina* también contribuyen al incremento de la actividad antioxidante.
- El hidrolizado proteico de *Spirulina* reducida en polifenoles a la dosis de 40 mg/kg protegió en un 56% contra el desarrollo de lesiones preneoplásicas en colon de ratón en un modelo de carcinogénesis inducido con azoximetano, siendo clave la actividad antioxidante en el efecto quimiopreventivo observado. Por otro lado, el AOM provocó oxidación en hígado al incrementar los niveles de óxido nítrico (NO), grupos carbonilo (CO[·]) y malondialdehído (MDA) después de 21 días de la primera administración.

En general, las proteínas presentes en *Spirulina* mostraron ser fuente de péptidos con actividad antioxidante, al incrementarse dicha actividad después de la hidrólisis secuencial pepsina-pancreatina, la actividad antioxidante observada *in vitro* e *in vivo* fue importante en la inhibición del desarrollo de criptas aberrantes en la etapa inicial de carcinogénesis de colon, por lo que el hidrolizado proteico de Spr (40 mg/kg) representa una opción de consumo de la *Spirulina*.

XII. REFERENCIAS

- AOAC. (1997). In William Horwitz (Ed.), *Official methods of analysis* (17th ed.). Washington, D.C: Association of Official Analytical Chemists.
- Adir, N., Dobrovetsky, Y., and Lerner, N. (2001). Structure of C-phycoerythrin from the thermophilic *Cyanobacterium Synechococcus vulcanus* at 2.5Å: structural implications for thermal stability in phycobilisome assembly. *Journal Molecular Biology*. 313: 71-81.
- Al-Numair, K., Waly, M., and Ali, A. (2011). Dietary folate protects against azoxymethane-induced aberrant crypt foci development and oxidative stress in rat colon. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*. 236: 1005-1011.
- Alaiz, M., Navarro, J., Girón, J., and Vioque, E. (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography*. 591: 181–186.
- Alderton, W., Cooper, C., and Knowles, R. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 357: 593-615.
- ACS (2014). *Cancer facts and figures*. Atlanta, American Cancer Society.
- Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 75: 199–212.
- Ashmead, H., Graff, D., and Ashmead, H. (1985). *Intestinal absorption of metal ions and chelates*. Springfield, IL: Charles C. Thomas.
- Attaallah, W., Yilmaz, A. M., Erdoğan, N., Yalçın, a S., and Aktan, a O. (2012). Whey protein versus whey protein hydrolyzate for the protection of azoxymethane and dextran sodium sulfate induced colonic tumors in rats. *Pathology Oncology Research*. 18: 817–22.
- Au, A., Li B., Wang W., Roy, H., Koehler, K. and Birt. (2006). Effect of dietary apigenin on colonic ornithine decarboxylase activity, aberrant crypt foci formation, and tumorigenesis in different experimental models. *Nutrition and cancer*. 54(2): 243-251.
- Barbusinski, K. (2009). Fenton reaction controversy concerning the chemistry. *Ecological Chemistry and Engineering*. 16: 347–358.
- Beckman, K., and Ames, B. (1997). Oxidative decay of DNA. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 19633–19636.
- Benítez S. J. (2008). Valoración del estrés oxidativo producido por el ejercicio físico inducido en dos grupos de varones prepuberales y puberales. Tesis de Doctorado. Universidad de Córdoba.

- Bennett, A., and Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*. 58(2): 419–35.
- Bermejo, P., Pinero, E., and Villar, a. (2008). Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*. 110(2): 436–445.
- Berns, D. and MacColl R. (1989). Phycocyanin in physical-chemical studies. *Chemical Reviews*. 89: 807-825.
- Besco, P. B., and Fresno, A. M. V. (2001). Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *IL Farmaco*. 56: 497– 500.
- Bird, R. (1995). Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Letters*. 93: 55-71.
- Borowitzka, M. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*. 7: 3 -15.
- Burton, G. J., and Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 25(3): 287–299.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*. 6: 389–395.
- Carrasco, C., Hernández., A., J., Jiménez, C., Jacinto, H., Alaiz, C., Girón, C., Dávila, O. (2012). Antioxidant and metal chelating activities of *Phaseolus vulgaris* L . var . Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. *Food Chemistry*. 131(4): 1157–1164.
- Carter, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical Biochemistry*. 40: 450–458.
- Chacón-Lee, T. L., and González-Mariño, G. E. (2010). Microalgae for “healthy” foods-possibilities and challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9(6): 655–675.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., and Bunnag, B. (2012). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina sp.*: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*. 1–6.
- Chan, W., and Decker, E. (1994). EPR spin-trapping studies of the hydroxyl radical scavenging activity of carnosine and related dipeptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 1407–1410.
- Chen, H., and Muramoto, K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 2619-2623.

- Chen, H., Muramoto, K., and Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta conglycinin. *Journal of Agricultural and Chemistry*. 43: 574–578.
- Ching Shu L., Jia-Ching W., Shih-Feng Y., Vladimir B., Kalyanam N., Chi-Tang H. and Min-Hsiung P. (2011). Tetrahydrocurcumin is more effective than curcumin in preventing azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Molecular Nutrition Food Reserch*. 55: 1819–1828
- Chiueh, C. (1999). Neuroprotective properties of nitric oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 890: 301–311.
- Circu, M., and Aw, T. (2011). Redox biology of the intestine. *Free Radical Research*. 45: 1245- 1266.
- Colla, L. M., Furlong, E. B., Alberto, J., and Costa, V. (2007). Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) platensis cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50: 161–167.
- Cooke, M., Evans, M., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 17: 1195-1214.
- Corpet, D., and Pierre, F. (2005). How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *European Journal of Cancer*. 41: 1911–1922.
- Cossi, R., Jime, C., and Niell, F. X. (2003). The Feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain. *Aquaculture*. 217: 179 – 190.
- Costa, J. A. V. (2004). Improving *Spirulina* platensis biomass yield using a fed-batch process. *Bioresource Technology*. 92: 237–241.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., and Giustarini, D. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*. 329: 23–38.
- De Mejia, E. G., and Dia, V. P. (2010). The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. *Cancer Metastasis Reviews*. 29(3): 511–28.
- Dizdaroglu, M., and Jaruga, P. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*. 32: 1102–1115.
- Dreher, D., and Junod, A. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of Cancer*. 32: 30-38.
- El-baky, H. H. A., Baz, F. K. El, and El-baroty, G. S. (2009). Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects in vitro toward hepatotoxicity model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 3(4): 133–139.

- Elias, R., Kellerby, S., and Decker, E. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews Food Science Nutrition*. 48: 430–441.
- Eriksen, N. T. (2008). Production of phycocyanin-a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80(1): 1–14.
- Ernster, L., and Nordenbrand, K. (1967). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 52: 305-310.
- Estrada, J., Bescós, P., Villar del Fresno, A. (2001). Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco*. 56:497–500.
- Faris, M., Takruri, H., Shomaf, S., and Bustanji, Y. (2009). Chemopreventive effect of raw and cooked lentils (*Lens culinaris L*) and soybeans (*Glycine max*) against azoxymethane-induced aberrant crypt foci. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*. 29(5): 355–62.
- Fink, S., Reddy, G., and Marnett, L. (1997). Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 8652–8657.
- Fu, X. (2003). Effect of plant leaf protein on lipotropy peroxidase system of rats. *Chinese Journal of Veterinary Science Technology*. 11: 49–50.
- Füglistaller P., and Rübeli R. (1984). Minor polypeptides from the phycobilisomes of the cyanobacterium, *Mastigocladus laminosus*. Isolation, characterization and amino acid sequences of a colorless 8.9 kD polypeptide and of a 16.2 kD phycobiliprotein. *Physiological Chemistry*. 365: 1085–1096.
- Gantt, E. (1980). Structure and function of phycobilisomes: light- harvesting pigment complexes in red and blue-green algae. *International Review of Cytology*. 66: 45–80.
- Ghafourifar, P., and Cadenas, E. (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacology Science*. 26: 190–195
- Glazer, A. (1984). Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 786: 28-51.
- Glazer, A. (1989). Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *Journal Biology Chemistry*. 264: 1–4
- Goodman, M., Bostick, R. M., Kucuk, O., and Jones, D. P. (2011). Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: past, present, and future. *Free Radical Biology & Medicine*. 51(5): 1068–1084.
- Groschwitz, K., and Hogan, S. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 124: 3-20.

- Grossman, A. R. (2003). A molecular understanding of complementary chromatic adaptation. *Photosynthesis Research*. 76: 207–215.
- Guan, X., Qin, S., Zhao, F., Zhang, X., and Tang, X. (2007). Phycobilisomes linker family in cyanobacterial genomes: divergence and evolution. *International Journal of Biological Sciences*. 3(7): 434–45.
- Gutteridge, J., and Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Science*. 136-147.
- Guyton, K., and Kensler, T. (1993). Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *British Medical Bulletin*. 49: 523–544.
- Habib MAB, Parvin M, Huntington TC, Hasan MR. (2008). A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1034*. Rome: FAO. 3 p
- Halliwell, B. (1978). Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: the key role of superoxide dismutase. *Cell Biology International Reports*. 2: 113–118.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants: the basics - what they are and how to evaluate them. *Advances in Pharmacology*. 38:3–20.
- Halliwell, B. (2005). Free radicals, other reactive species and disease. In *Free radicals in biology and medicine* Oxford: Clarendon Press, pp. 617-623
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1985). *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford, UK, p 704.
- Hengartner, M. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407: 770–776.
- Henrikson, R. (1994). *Microalga Spirulina: superalimento del futuro*. ISBN: 84-7953-047-2. ,
- Hensley, K., and Robinson, K. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology Medical*. 28: 1456–1462.
- Herrera, A., Boussiba, S., Napoleone, V., and Hohlberg, A. (1989). Recovery of c-phycoerythrin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Journal of Applied Phycology*. 1(4): 325–331.
- Hirahashi, T., Matsumoto, M., and Hazeki, K. (2002). Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *International Immunopharmacology*. 2: 423–434.
- Hosseini, S., Shahbazizadeh, S., Khosravi-Darani, K., and Mozafari, M. (2013). *Spirulina paltensis*: food and function. *Current Nutrition & Food Science*, 9(3), 189–193.

- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:1841–1856.
- Humphries, A., and Wright, N. (2008). Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*. 8: 415-424.
- Hussain, S., Hofseth, L., and Harris, C. (2003). Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer*. 3: 276–285.
- INEGI (2014). Estadísticas a proposito del día mundial contra el cancer. (www.inegi.org.mx)
- Iwaniak, A., and Dziuba, J. (2011). BIOPEP-PBIL Tool for the analysis of the structure of biologically active motifs derived from food proteins. *Food Technology and Biotechnology*. 49(1), 118–127.
- Je, J., Kim, S., and Kim, S. (2005). Preparation and antioxidative activity of hoki frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes. *European Food Research and Technology*. 221, 157–162
- Je, J.-Y., Park, P.-J., Kwon, J. Y., and Kim, S.-K. (2004). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(26): 7842–5.
- Jiang, T., Zhang, J., Chang, W., and Liang, D. (2001). Crystal Structure of R-Phycocyanin and Possible Energy Transfer Pathways in the Phycobilisome. *Biophysical Journal*. 81(2): 1171–1179.
- Johansen, J., and Harris, A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*. 4:5.
- Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 283(2-3), 65–87.
- Katoa, H., Susumu, Y., Imanishia, H., Tsujib, K., Ken-ichi, H. (2007). Microbial degradation of cyanobacterial cyclic peptides. *Water Research*. 41: 1754– 1762
- Khalek, F., Gallicano, G., and Mishra, L. (2010). Colon cancer stem cells. *Gastrointestinal Cancer Research*. 1: 16-23.
- Kikuchi, H., Wako, H., Yura, K., Go, M., and Mimuro, M. (2000). Significance of a two-domain structure in subunits of phycobiliproteins revealed by the normal mode analysis. *Biophysical Journal*. 79(3): 1587–600.

- Kim, S., Kim, Y., and Byun, H. (2001). Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of *Alaska pollack* skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 1984–1989.
- Klaunig, J., and Kamendulis, L. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 44: 239-267.
- Klaunig, J., Xu, Y., Bachowski, S., and Jiang, J. (1997). Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis. *Free Radical Toxicology*. 375–400.
- Kong, J. and Singh, R. (2008). Desintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Scienc*. 73: 68-80.
- Korhonen, H., and Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*. 9: 1297-1308.
- Kulshreshtha, A., J, A. Z., Jarouliya, U., and Bhadauriya, P. (2010). *Spirulina* in health care management, 400–405.
- Lai, C.-S., Tsai, M.-L., Cheng, A.-C., Li, S., Lo, C.-Y., Wang, Y., Pan, M.-H. (2011). Chemoprevention of colonic tumorigenesis by dietary hydroxylated polymethoxyflavones in azoxymethane-treated mice. *Molecular Nutrition & Food Research*. 55(2): 278–90.
- Leslie, A., and Carey, F. (2002). The colorectal adenoma–carcinoma sequence. *British Journal of Surgery*. 89: 845- 860.
- Levine, R., Garland, D., and Oliver, C. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 186: 464–478.
- Liao, X., Zhang, B., Wang, X., Yan, H., and Zhang, X. (2011). Purification of C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* by single-step ion-exchange chromatography. *Chromatographia*. 73(3-4); 291–296.
- Liochev, S., and Fridovich, I. (1994). The role of O₂ in the production of HO: in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*. 16: 29–33.
- Liochev, S., and Fridovich, I. (2002). The Haber Weiss cycle 70years later: an alternative view. *Redox Report* 7, 55-57.
- Liu, L., Chen, X., Zhang, Y., and Zhou, B. (2005). Characterization , structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1708: 133– 142.
- Liron, D., Marx, A. and Adir, N. (2010). High-resolution crystal structures of trimeric and rod phycocyanin. *Journal of Molecular Biology*. (2011) 405, 201–213

- Loft, S., and Poulsen, H. (1996). Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *Journal of Molecular Medicine*. 74: 297-312.
- Lowenstein, C. (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annals of Internal Medicine*. 120: 227-237.
- Lundell, D., Yamanaka, G., and Glazer, A. (1981). A terminal energy acceptor of the phycobilisome: the 75,000-dalton polypeptide of *Synechococcus* 6301 phycobilisomes a new biliprotein. *The Journal of Cell Biology*. 91: 315-319.
- Ma, Y., Xiong, Y. L., Zhai, J., Zhu, H., and Dziubla, T. (2010). Fractionation and evaluation of radical scavenging peptides from in vitro digests of buckwheat protein q. *Food Chemistry*. 118(3): 582–588.
- Marnett, L. (1999). Lipid peroxidation DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 424: 83–95.
- Marsac, N. De, and Cohen-Bazire, G. (1977). Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74: 1635–1639.
- Martínez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. 77(3): 147–161.
- Matés, J., Pérez-Gómez, C., and Castro, I. De. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. 32: 595–603.
- Matsui, M., and Muizzuddin, N. (2003). Sulfated polysaccharides from red microalgae have anti-inflammatory properties in vitro and in vivo. *Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology*. 104: 13–22.
- McCord, J., and Fridovich, I. (1969). Superoxide and ischemia: Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. In: *Oxy radicals and their scavenger systems Vol. II*. Greenwald y Cohen (Eds.). Elsevier Science Publishing. pp. 145-153.
- McLellan, E., and Bird, R. (1988). Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Research*. 48: 6187-6192.
- Megías, C., Pedroche, J., and Yust, M. (2008). Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT-Food Science and Technology*. 41: 1973–1977.
- Meisel, H., and FitzGerald, R. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*. 9: 1289–1295.
- Memarpoor-yazdi, M., Asoodeh, A., and Chamani, J. (2012). A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 1–9.

- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., and Remacle, J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine*. 17: 235–248.
- Miranda, K., Espey, M., & Wink, D. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 5(1): 62-71.
- Miranda, M. S. (1998). Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*. 31(1).
- Mishima, T., Murata, J., and Toyoshima, M. (1998). Inhibition of tumor invasion and metastasis by calciumspirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Clinical and Experimental Metastasis*.16(6): 541-50
- Moure, A., Dominguez, H., and Parajo, J. (2006). Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochemistry*. 41: 447–456.
- Neufert, C., Becker, C.,and Neurath M. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation driven tumor progression. *Nature* 2(8).
- Nicotera, P., Bellomo, G., & Orrenius, S. (1990). The role of calcium in cell killing. *Chemical Research in Toxicology*.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*. 49(4): 503–515.
- Nuhu, A. A. (2013). *Spirulina* (*Arthrospira*): An important source of nutritional and medicinal compounds. *Journal of Marine Biology*.doi.org/10.1155/2013/325636
- Olive, J., Ajlani, G., and Astier, C. (1997). Ultrastructure and light adaptation of phycobilisome mutants of *Synechocystis* PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta*.1319: 275-282.
- Oren, M. (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death and Differentiation*. 10: 431–442.
- Owuor, E., and Kong, A. (2002). Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochemical Pharmacology*. 64: 765–770.
- Ozdal, T., Capanoglu, E., and Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954–970.
- Padyana, a K., Bhat, V. B., Madyastha, K. M., Rajashankar, K. R., and Ramakumar, S. (2001). Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycoyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 282: 893–898.

- Palmer, H., and Paulson, K. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutrition Reviews*. 55: 353–361.
- Pan, M., Lai, C., Wu, J., and Ho, C. (2011). Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Molecular Nutrition and Food Research*. 55: 32–45.
- Parbel, A., and Scheer, H. (2000). Model for the phycobilisome rod with interlocking disks based on domain-weighted linker-polypeptide sequence homologies of *Mastigocladus laminosus*. *International Journal of Photoenergy*. 2: 31–40
- Pastor-Cavada, E., Juan, R., and Pastor, J. (2009). Antioxidant activity of seed polyphenols in fifteen wild *Lathyrus* species from South Spain. *LWT-Food Science and Technology*. 42 (3): 705-709
- Pellegrini, M. L., Argibay, P., and Gómez, D. E. (2011). Genética y epigenética del cáncer colorrectal. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*. 41: 247–261.
- Perricone, C., Carolis, C. De, and Perricone, R. (2009). Glutathione: a key player in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 8(8): 697-701.
- Phang, S., Miah, M., Yeoh, B., and Hashim, M. (2000). *Spirulina* cultivation in digested sago starch factory wastewater. *Journal of Applied Phycology*. 12: 395–400.
- Poli, G., and Leonarduzzi, G. (2004). Oxidative stress and cell signalling. *Medicinal Chemistry*. 11: 1163–1182.
- Qian, Z.-J., Jung, W.-K., Byun, H.-G., and Kim, S.-K. (2008). Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. *Bioresource Technology*. 99(9): 3365–3371.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H., and Kim, S. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 16 :562–569.
- Raju, J. (2008). Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: Relevance in studying chemoprevention of colon cancer. *Journal of Gastroenterology*. 14(43): 6632–6635.
- Ranathunga, S., Rajapakse, N., and Kim, S. (2006). Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of congereel (*Conger myriaster*). *European Food Research and Technology*. 222: 310–315.
- Rao C. V., Indranie B., Simi P., Maning J. Connor B., Reddy. (2002). Chemopreventive properties of a selective inducible nitrite oxide synthase inhibitor in colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celecoxib. *Cancer Research*. 62: 165-170.
- Rao C. V., Cooma I., Swamy V., Simi B., Reddy S. (2001). Modulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase activities by curcumin during different stages of experimental carcinogenesis. *Cancer Research*. 39: 3084.

- Rao C. V. (2004). Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 555: 107-119.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., and Aggarwal, B. B. (2010). Free Radical Biology & Medicine Oxidative stress , inflammation , and cancer : How are they linked ? *Free Radical Biology and Medicine*. 49(11): 1603–1616.
- Ravi, M. (2010). The beneficial effects of *spirulina* focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. *Nutrition and Dietary Supplements*.73–83.
- Ravinder, T., Aramati, B., Kota, V., Mark, J. Petras. and Satish K. (2009). Aldose reductase deficiency in mice prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic aberrant crypt foci formation. *Carcinogenesis*. 30(5): 799–807, 2009
- Rezaie, A., Parker, R., and Abdollahi, M. (2007). Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Digestive Diseases and Sciences*. 52 :2015-2021.
- Richmond, A., and Cheng-Wu, Z. (2001). Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis sp.* outdoor. *Journal of Biotechnology*. 85: 259–269.
- Richter, C., Park, J., and Ames, B. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academic Association*. 85: 6465-6467.
- Roberts, R., Smith, R., Safe, S., Szabo, C., Tjalkens, R., Robertson, F. (2010). Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology*. 276: 85–94.
- Rodríguez R. I. (2013). Estrés oxidativo y la inflamación. Estudio en células intestinales y animales de experimentación. Tesis de Doctorado. Univesidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Roncucci, L., Pedroni, M., Vaccina, F., Benatti, P., Marzona, L. (2000). Aberrant crypt foci in colorectal carcinogenesis. Cell and crypt dynamics. *Cell Proliferation*. 33(1): 1–18.
- Rosen, G., Pou, S., Ramos, C., Cohen, M., and Britigan, B. (1995). Free radicals and phagocytic cells. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 9: 200-209.
- Rosenberg D., Giardina C. and Tanaka T., (2009). Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 30: 83–196.
- Sah, T.M. Seasholtz, S.A. Sagi, J.H. Brown. (2000). The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 40: 459–489.

- Saiga, A., Tanabe, S., and Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(12): 3661–3667.
- Saito, K., Jin, D., and Ogawa, T. (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 51: 3668-3674.
- Samaranayaka, A. G. P., and Li-chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants : A review of their production , assessment , and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229–254.
- Sarmadi, B. H., and Ismail, A. (2010). Peptides Antioxidative peptides from food proteins : A review. *Peptides*. 31(10): 1949–1956.
- Sato, T., Minagawa, S., and Kojima, E. (2010). HtpG, the prokaryotic homologue of Hsp90, stabilizes a phycobilisome protein in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Molecular Microbiology*. 76: 576-589.
- Segundo, M. A., Reis, S., and Lima, L. F. C. (2008). Review article methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta*. 613: 1–19.
- Sekar, S., and Chandramohan, M. (2007). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*. 20(2): 113–136.
- Sengupta, A., Ghosh, S., and Bhattacharjee, S. (2005). Dietary cardamom inhibits the formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in mice and reduces COX-2 and iNOS expression in the colon. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 6(2): 118–22.
- Sengupta, A., Ghosh, S., and Das, S. (2003). Tea Can Protect Against Aberrant Crypt Foci Formation During Azoxymethane Induced Rat Colon. *Carcinogenesis*. 185–191.
- Shigenaga, M. (1989). Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 9697–9701.
- Shimada, K., and Fujikawa, K. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40 :945–948.
- Silveira, S. T., Burkert, J. F. M., Costa, J. a V, Burkert, C. a V, and Kalil, S. J. (2007). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*. 98(8): 1629–1634.
- Singleton, V., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152–178.

- Sporn, M. (1976). Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Research*. 36: 2699-2702,
- Stadtman, E. (2004). Role of oxidant species in aging. *Current Medicinal Chemistry*. 11: 1105–1112.
- Stocker, R., Glazer, A., and Ames, B. (1987). Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 5918–5922.
- Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Bioscience*. 10: 1881–1896.
- Suetsuna, K., and Nakano, T. (2000). Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame *Undaria pinnatifida*. *Journal of Nutrition and Biochemistry*. 11: 450–454.
- Thannickal, V., and Fanburg, B. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology*. 279: 1005-1028.
- Torzsas T., Kendall W., Suganot M., Iwamoto Y. and Rao V. (1996). The influence of high and low molecular weight chitosan on colonic cell proliferation and aberrant crypt foci development in CF1 mice T. *Food and Chemical Toxicology*. 34: 73-77.
- Trosko, J. (1993). Oncogenes, tumor suppressor genes and intercellular communication in the 'Oncogeny as partially blocked ontogeny' hypothesis: in *New Frontiers in Cancer Causation*, Iversen, O. H. (ed.), pp. 181-97, Taylor and Francis Publishers, Washington, D. C.
- Trosko, J. (2003). Role of stem cells and gap junctional intercellular communication in human carcinogenesis. *Radiation Research*. 155: 175-180.
- Trosko, J., & Ruch, R. (2002). Gap junctions as targets for cancer prevention and chemotherapy; in *Current Drug Targets*, Christ, G. J. (ed.), in press.
- Trueba, G., Sánchez, G., & Giuliani, A. (2004). Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer. *Frontiers Bioscience*. 9: 2029–2044.
- Valko, M., Izakovic, M., and Mazur, M. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 266: 37–56
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160(1): 1–40.
- Vereecke, L., Beyaert, R., and Loo, G. van. (2011). Enterocyte death and intestinal barrier maintenance in homeostasis and disease. *Trends in Molecular Medicine*. 17: 584-593.
- Viña, J. (1990). *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. CRC Press, Boca Raton. 1990

- Visconti, R., and Grieco, D. (2009). New insights on oxidative stress in cancer. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. 12 (2): 240–245.
- Vogelstein, B., and Fearon, E. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England Journal of Medicine*. 319: 525-532
- Wang, M., Dhingra, K., and Hittelman, W. (1996). Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 5: 705–710.
- Wang, S., Meckling, K. a., Marcone, M. F., Kakuda, Y., and Tsao, R. (2011). Can phytochemical antioxidant rich foods act as anti-cancer agents? *Food Research International*. 44(9): 2545–2554.
- Welch, K., Eden, M. Van, and Aust, S. (2001). Modification of ferritin during iron loading. *Free Radical Biology and Medicine*. 31(8): 999-1006.
- Wilk, K., and Harrop, S. (1999). Evolution of a light-harvesting protein by addition of new subunits and rearrangement of conserved elements: crystal structure of a cryptophyte phycoerythrin at 1.63-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 8901–8906.
- Yan, S.-G., Zhu, L.-P., Su, H.-N., Zhang, X.-Y., Chen, X.-L., Zhou, B.-C., and Zhang, Y.-Z. (2010). Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycoerythrin and allophycocyanin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *Journal of Applied Phycology*. 23(1): 1–6.
- Yildirim, A., Mavi, A., and Kara, A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4083–4089.
- Zamorano-Ponce E., Lagos Muñoz P., Rivera Caamaño P. y Fernández Romero Julia. (2008). Un modelo experimental inducible en ratón para conducir estudios en quimiopreención y anticarcinogénesis. *Theoria*. 17: 71-86.
- Zhang, Y., and Chen, F. (1999). A simple method for efficient separation and purification of c-phycoerythrin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. *Growth (Lakeland)*. 601–603.
- Zhang, H., Lin, A., Sun, Y., & Deng, Y. (2001). Chemo- and radio-protective effects of polysaccharide of *Spirulina platensis* on hemopoietic system of mice and dogs. *Acta Pharmacologica Sinica*. 22: 1121-1124.
- Zhu, K., Zhou, H., and Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41, 1296–1302.

