

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS**



**“EFECTO DE NIVELES ELEVADOS DE FIBRA DE MAIZ
NATURAL Y MODIFICADA Y DEL COLESTEROL SOBRE
PARÁMETROS NUTRICIONALES, MORFOMÉTRICOS Y
ULTRAESTRUCTURALES DEL INTESTINO GRUESO DE
RATAS EN CRECIMIENTO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

M. EN C. ESTHER ALBARRÁN RODRÍGUEZ

DIRECTOR: DRA MERCEDES GONZÁLEZ HITA

ASESORES: P. DR. JUAN MORA GALINDO

DR. AGUSTÍN RAMÍREZ ÁLVAREZ

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. Diciembre 2000



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
COORDINACIÓN DE POSGRADO

**H. CUERPO COLEGIADO
DEL POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS DE LA UNIVERSIDAD
DE GUADALAJARA
PRESENTE.**

Por éste conducto nos permitimos enviar la **VERSION FINAL DE LA TESIS** que desarrolló la pasante del Programa de Doctorado en Ciencias Pecuarias (PICP) de la Universidad de Guadalajara, **M. en C. Esther Albarran Rodríguez**, cuyo título es:

“EFECTO DE NIVELES ELEVADOS DE FIBRA DE MAIZ NATURAL Y MODIFICADA Y DEL COLESTEROL SOBRE PARAMETROS NUTRICIONALES, MORFOMETRICOS Y ULTRAESTRUCTURALES DEL INTESTINO GRUESO DE RATAS EN CRECIMIENTO”.

Trabajo dirigido por: Dra. MERCEDES GONZALEZ HITTA

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. a 8 de Noviembre de 2000

REVISOR

Dr. JOAQUIN GARCIA ESTRADA

REVISOR

DR. CARLOS BEAS ZARATE

REVISOR

Dra. Ma. SONIA LUQUIN DE ANDA

REVISOR

Dr. JUAN MORA GALINDO

REVISOR

Dr. JACINTO BAÑUELOS PINEDA

c.c.p. Archivo

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES:

Al CONACyT por su apoyo como becaria. Número de registro 57066, período 1995 - 1997.

A PROMEP, SEP, por su apoyo como becaria. Número de acuerdo UDG-98-13-01, período de diciembre de 1998 a diciembre de 1999.

Al Laboratorio de Neuroendocrinología, Departamento de Neurociencias, CIBO, IMSS.

Al Centro de Microscopía Electrónica, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería, U de G.

Al Bioterio del Centro Universitario de Ciencias de la Salud, U de G.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, Agustín Albarrán y Susana Rodríguez, por su cariño y apoyo incondicional para mi formación y superación personal y profesional.

A mi esposo, Gerardo Simón Estrada, por su apoyo total y buen humor

A mis hijos: Isabel, Gerardo Simón y Sergio Alejandro por el tiempo tomado

A mis hermanos Hortensia, Arnulfo, Agustín, Jose Luis, Jorge y a mi primo Jose de la Luz por su cariño.

Al cuerpo tutorial: Dra. Mercedes González Hita, Dr. Juan Mora Galindo y Dr. Agustín Ramírez Alvarez por su amistad y apoyo academico

Al jurado: Dr. Carlos Beas Zarate, Dr. Jacinto Bañuelos Pineda, Dra. Ma. Sonia Luquín de Anda, Dr. Joaquín García Estrada y Dr. Juan Mora Galindo

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Medicina Comparada, Departamento de Salud Pública, División de Ciencias Veterinarias Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (No. de Acuerdo 98/SA-CIP/DSP/4.2/44), en conjunto con el Bioterio y el Laboratorio de Investigación del Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, así como en la Sección de Biología Celular, División de Inmunología del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | D |
| ANTECEDENTES | 1 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 11 |
| HIPÓTESIS | 12 |
| OBJETIVOS | 13 |
| Objetivo General | 13 |
| Objetivos Particulares | 13 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 14 |
| Parámetros nutricionales | 14 |
| Parámetros morfométricos y ultraestructurales | 16 |
| Inmunohistoquímica | 18 |
| RESULTADOS | 22 |
| Parámetros nutricionales | 22 |
| Parámetros morfométricos | 29 |
| Índice de proliferación celular | 39 |
| Células en proceso de muerte | 45 |
| Análisis descriptivo ultraestructural | 46 |
| DISCUSIÓN | 57 |
| Parámetros nutricionales | 57 |
| Parámetros morfométricos | 61 |
| Proliferación y muerte celular | 64 |
| CONCLUSIONES | 68 |
| Conclusiones experimentales | 68 |
| Conclusiones generales | 70 |
| REFERENCIAS | 71 |

RESUMEN

OBJETIVO: Analizar el efecto de niveles elevados de salvado de maíz natural o modificado y de colesterol sobre diversos parámetros nutricionales, morfométricos y ultraestructurales en intestino grueso de ratas en crecimiento. **METODOLOGÍA:** Se utilizaron 91 ratas Wistar machos, 28-30 días de edad, 100 ± 10 g de peso inicial. Los animales se dividieron en 7 grupos, con 3 repeticiones (de 10, 2 y 1 animal por grupo). Los periodos de prueba tuvieron una duración de 28 días, los grupos recibieron diferentes dietas: Basal (B), Basal - Celulosa (BCEL), Basal - Celulosa - Colesterol (BCELCOL), Basal - Fibra de Maíz Natural (BFMN), Basal - Fibra de Maíz Ácida Alcalina (BFMAA), Basal - Fibra de Maíz Ácida Alcalina - Colesterol (BFMAACOL), Basal - Fibra de Maíz Ácida Alcalina Extrusada (BFMAAE). La fibra se incorporó al 10% y el colesterol al 1%. Las dietas fueron isocalóricas (3.5 Mcal/Kg) e isoproteicas (20% P.C.) El estudio se realizó con base al Código Internacional sobre animales de experimentación. Cada tercer día se registró el consumo y rechazo de alimento, de manera semanal se registró peso corporal, para calcular ganancia de peso y conversión alimenticia. Los animales fueron sacrificados, para obtener peso de intestino e hígado, pH de ciego, y muestras representativas de ciego, colon proximal y distal. Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 1.5%, se posfijaron en tetraóxido de osmio al 2%, durante 1 h, para su posterior deshidratación en series crecientes de etanol y su inclusión en resina epoxica. Para cuantificar los parámetros morfométricos se utilizaron cortes de 0.5 μm teñidos con azul de toluidina y un microscopio Leica con analizador de imágenes computarizado. Para el análisis ultraestructural se hicieron cortes de 90 nm y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol Jem-1010. La evaluación estadística se realizó por medio de ANVA y DMS (nivel de significancia de 0.05). **RESULTADOS:** El mayor peso corporal fue para el grupo B (300.85 g). El peso de intestino grueso fue mayor para los grupos BFMAA (5.62 g) y BFMAACOL (5.45 g). Con respecto a hígado el mayor peso fue para los grupos BCELCOL y BFMAACOL (13.59 g y 13.47 g respectivamente). El consumo de alimento presentó un valor de 18-21 g por día sin diferencias importantes por efecto de los tratamientos. La menor conversión alimenticia fue para el grupo BFMAAE (2.92). Para pH cecal se registraron valores cercanos al neutro, siendo el mayor para el grupo B (7.17) y menor para los grupos BFMAACOL (6.54) y BFMAA (6.63). En ciego se encontró un comportamiento similar para espesor de mucosa y profundidad de criptas, ya que los grupos experimentales presentaron valores mayores que el grupo B. El número de criptas fue mayor solo para los grupos BCEL (19/mm) y BFMN (18.29/mm). En colon proximal los parámetros analizados son similares o menores estadísticamente que el grupo B. Para colon distal tanto el espesor de la mucosa como de criptas fue mayor para los grupos que recibieron celulosa o salvado de maíz natural. El número de criptas fue similar entre los grupos tanto control como experimentales (18-21/mm). La profundidad de criptas fue mayor para los grupos BCEL, BCELCOL, BFMN (231-260 μm). El porcentaje de células columnares (60-76%) y caliciformes (17-24%) presentó diferencias en colon proximal. Para células enteroendocrinas, se encontró un aumento en ciego, principalmente en ratas que recibieron salvado de maíz natural (5.57%) y celulosa (3.66%). El índice de proliferación celular fue muy homogéneo en ciego (15-21%), en colon proximal el grupo basal presentó un valor medio y para colon distal los grupos experimentales presentaron los valores mayores. Para células en proceso de muerte; el grupo basal presentó el menor número. El análisis descriptivo ultraestructural de las células epiteliales no muestra diferencias importantes por la presencia de fibra y colesterol en la dieta. **CONCLUSIONES:** Las ratas que recibieron niveles elevados de fibra en la dieta, tuvieron menor ganancia de peso, sin embargo la conversión alimenticia fue adecuada. La presencia de salvado de maíz ácida-alcalina aumentó el peso de intestino grueso, dato que coincide con valores mayores en espesor de mucosa y profundidad de criptas cecales. El peso de hígado aumentó significativamente por la inclusión del 1% de colesterol en la dieta, sin que la presencia de salvado de maíz ácida alcalina disminuyera la acumulación de lípidos. La respuesta encontrada en los diversos parámetros morfométricos fue regional. En ciego, para la mayoría de los grupos experimentales aumentó el espesor de mucosa y las dimensiones de criptas. La proporción de células enteroendocrinas e indiferenciadas fue mayor para algunos grupos experimentales. Las células en proceso de proliferación y muerte correlacionaron para colon proximal.

ANTECEDENTES

La Salud Pública Veterinaria es una disciplina con un extenso ámbito de acciones, entre las que se encuentran: Promoción de la salud animal para incrementar la producción de proteína de origen animal. Protección de los alimentos para consumo humano. Vigilancia, prevención y erradicación de las zoonosis. Promoción de la protección del medio ambiente y la medicina comparada o biomédicina (Casas et al., 1991; Ruiz et al., 1992; Bremner, 1997).

El objetivo central de la medicina comparada o biomédicina es el desarrollo de modelos biomédicos, que promoverán la conservación y reproducción de animales de laboratorio, así como su uso racional y ético en el avance de las ciencias médicas, lo que permitirá ampliar el conocimiento de las enfermedades (Aranbulo, 1991; Schwabe, 1991; Hold et al., 1992).

Así, existen diversos modelos experimentales para el estudio de padecimientos como: aterosclerosis, diabetes y cáncer entre otros. Los estudios deben cumplir con las reglas internacionales para experimentos con animales de laboratorio (Howard-Jones, 1985).

Los estudios sobre oncología comparada se desarrollan sobre dos principales líneas de acción: 1) Investigación clínica e histopatológica de cáncer animal, el desarrollo de la clasificación y nomenclatura de tumores animales, y 2) la reunión de información epidemiológica sobre tumores animales (Kaplan et al., 1991).

La utilización de animales de diversas especies, como modelos biológicos, ha permitido grandes avances en el conocimiento de los factores, así como de los mecanismos directos e indirectos de diversos procedimientos oncológicos tanto humanos como animales (Dobson, 1993).

De los padecimientos más comúnmente estudiados se encuentran los relacionados con alteraciones del tracto gastrointestinal, los cuales se asocian con modificaciones importantes de la morfología y proliferación celular del intestino, debido a una serie de factores. Entre éstos se mencionan principalmente factores dietéticos: presencia de tóxicos, hábitos alimenticios (Armstrong, 1982; Chávez y et

al., 1993), consistencia o presentación de la dieta (Ryan et al., 1979; Young et al., 1980; Aguilar-Nascimento et al., 1998). Las alteraciones del tracto gastrointestinal se relacionan de manera hipotética con elementos de la dieta como fibra, lípidos y proteína (Walker, 1976; Armstrong, 1982; Konishi et al., 1984; Lundin et al., 1993; Jin et al., 1994; Howard, 1995; Stark et al., 1996; Compher et al., 1999).

El tracto gastrointestinal, es un tubo hueco de diámetro variable según la región, presenta la misma organización estructural en toda su longitud. La pared del tubo se forma por cuatro capas, que son, desde la luz hacia fuera: mucosa, submucosa, muscular y serosa o adventicia (Ross et al., 1999).

La mucosa del tubo digestivo tiene tres funciones principales: de barrera, secretora y de absorción. La mucosa se compone por epitelio, submucosa y muscular interna. En el epitelio del intestino grueso, las células de absorción columnares predominan sobre las caliciformes (4:1), encontrándose además células enteroendocrinas, de Paneth, indiferenciadas y figuras mitóticas (Geneser-Finn, 1993; Junqueira et al., 1996).

Las células epiteliales intestinales, se originan de células madres pluripotenciales localizadas en el fondo de la cripta intestinal, el tercio inferior de la cripta, constituye la zona normal de replicación. Las células migran hacia la superficie y las células seniles se descaman en la luz del punto medio entre dos criptas adyacentes (Geneser-Finn, 1993; Junqueira et al., 1996).

El intestino grueso de rata, mide aproximadamente 15 cm y se divide en ciego, colon y recto. El ciego esta dividido por un septo interno, se distingue por lo tanto la región basal y apical (Bivin, 1979). Las criptas mucosas son poco profundas y se caracterizan por presentar mayor número de células caliciformes, sobre todo en la parte basal de las criptas. Las células columnares de ciego y colon presentan características de las células de absorción que se encuentran en el resto del tubo digestivo; entre las que destacan microvellosidades desarrolladas (aunque más abundantes en ciego que en colon), numerosas mitocondrias, retículo endoplasmico rugoso y liso, así como un núcleo basal (Snipes, 1981).

De las células enteroendocrinas del tracto gastrointestinal se han identificado diversos tipos: a) por el tamaño de los gránulos citoplasmáticos (17 tipos), b) por su ubicación epitelial en células de tipo abierto (alcanzan la superficie luminal, dado que tienen forma de botella y están provistas de microvellosidades) y las de tipo cerrado que no llegan a la luz y c) por su función, algunas en discusión (Geneser-Finn, 1993).

Las células enteroendocrinas se denominaron anteriormente enterocromafines, argentafines, argirofilas y algunas se caracterizan por ser claras, ya que su contenido se pierde regularmente por procesos histológicos rutinarios. En la actualidad se identifican con técnicas inmunohistoquímicas o bien con microscopía electrónica de transmisión (MET) sobre la base del tamaño y densidad de sus gránulos de secreción. Se ha estimado que, en conjunto las células enteroendocrinas constituyen el "órgano" endocrino más grande del organismo, secretan hormonas y agentes reguladores (Ross et al., 1999).

Por otra parte el término, Fibra Dietética (FD), se empleó originalmente para designar una mezcla de componentes presentes en la dieta, provenientes de la pared de células vegetales, que no son digeridas por las enzimas propias del tubo digestivo de mamíferos (Trowell, 1976). Los componentes principales son los polisacáridos: celulosa, hemicelulosa y el polímero lignina. Los elementos minoritarios son: exudados de plantas como gomas y mucílagos (Southgate, 1984a; 1984b; Slavin, 1987).

En la década de los setentas, se difundió ampliamente el concepto de FD, y se diferenció de la fibra cruda. En el campo de la química de alimentos, se estableció la metodología para extraer, identificar y cuantificar la estructura y propiedad de los componentes de las fibras (Van Soest, 1963).

Van Soest (1963) establece una separación rápida de las fracciones de la materia seca del alimento, inicialmente de tipo forraje, en:

a) Contenido celular (lípidos, azúcares, ácidos orgánicos), el cual es soluble en detergente neutro, y material soluble en agua: pectinas, almidones, nitrógeno no

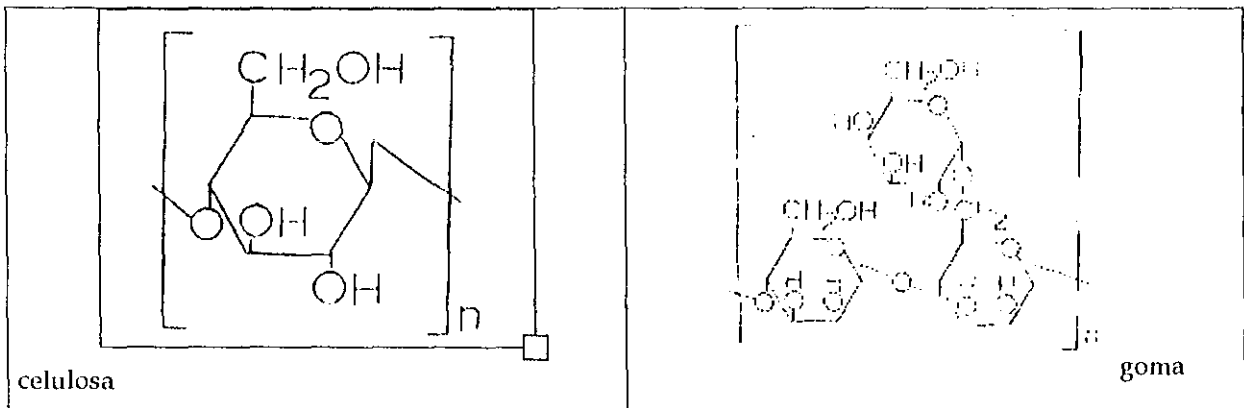
proteico y proteínas solubles. Por lo que, el remanente de este proceso son las paredes celulares o fibra detergente neutra (FDN)

b) Constituyentes de la pared celular solubles en ácido detergente (hemicelulosa, proteína unida a fibra), por lo que, el residuo se denomina fibra detergente ácida (FDA) (celulosa, lignina y nitrógeno lignificado) (Van Soest, 1963; 1982).

Posteriormente se realizan adaptaciones a las técnicas de FDN y FDA para la determinación de fracciones de fibra en alimentos para consumo humano (Asp et al., 1988).

Sin embargo, el concepto inicial se ha modificado y se propone que se considere a la FD como el conjunto de polisacáridos no almidones, no digeribles y se ha subdividido en: celulósicos (que se caracterizan por ser de baja solubilidad y fermentación) y en no celulósicos (elevada solubilidad y fermentación). Estos últimos a su vez se dividen en estructurales: pectina y hemicelulosa, y de matriz (gomas y mucílagos) (Figura 1). Por lo que diversos estudios se enfocan a determinar la proporción y calidad de los diferentes elementos de la FD (Asp et al., 1988; Koruda, 1993; Van Soest et al., 1991).

Figura 1. Estructura de los principales componentes de la fibra dietética: celulosa, hemicelulosa, pectina y goma (Fennema, 1992).



las pectinas son capaces de formar geles en el lumen intestinal, los cuales se unen a compuestos orgánicos como los ácidos biliares y el colesterol, por lo que se disminuye su absorción. El incremento en la eliminación de los ácidos biliares y colesterol en heces, conduce a un aumento en la síntesis de nuevos ácidos biliares en el hígado a partir de colesterol endógeno, lo que se traduce en una disminución de la cantidad de colesterol presente en la circulación. Esta hipótesis se apoya por resultados obtenidos en diferentes especies animales (Mueller et al., 1983; Arjmandi et al., 1992a; 1992b; 1997; Anderson et al., 1994; Tinker et al., 1994; Kritchevsky, 1995)

Las fibras de cereales como maíz y trigo, contienen principalmente componentes insolubles que reducen el tiempo de tránsito de los alimentos y por lo tanto, su absorción en el tubo digestivo (Schweizer, 1991; Koruda, 1993; Cherbut et al., 1997). Las fibras insolubles purificadas como celulosa y hemicelulosa son capaces de: retener gran cantidad de agua, secuestrar ciertos componentes presentes en el intestino como cationes mono y divalentes, modificar el tiempo de tránsito de los alimentos, incrementar el contenido de agua y el peso de las heces (Gordon et al., 1983; Mueller et al., 1983; Anderson et al., 1994; Cherbut et al., 1997)

Schweizer (1991), con base en un análisis de diversos artículos, establece que además de los efectos fisiológicos benéficos para la salud y nutrición del sujeto, la FD puede ejercer algunas acciones indeseables como: obstrucción intestinal (trastorno muy raro), reducción de la digestibilidad y de la absorción de proteínas y grasas, así como disminución de la absorción de minerales.

Por otra parte, también resulta interesante la información generada en torno al papel de la fibra dietética en diversas patologías (inflamación, pólipos y cáncer) del tracto gastrointestinal particularmente colon y recto. La mayoría de los estudios proporcionan evidencias de un efecto protector contra dichos padecimientos, mientras que sólo algunos estudios revelan resultados contradictorios o no encuentran hallazgos de un efecto protector de la FD (Freeman, 1993),

Los resultados experimentales indican que los componentes de la dieta y otros factores externos modifican la morfología y fisiología intestinal (Burnstein, 1993). Estudios en ratas y hámster sugieren que la FD y lípidos modifican la

morfología y aumentan la actividad mitótica o proliferación celular del intestino delgado y grueso (Jacobs et al., 1983; Boffa et al., 1992; Edwards et al., 1992; Lundin et al., 1993; Jin et al., 1994; Whiteley et al., 1996).

Además, se ha sugerido que el consumo de FD y lípidos presentan un efecto sinérgico sobre proliferación celular, índice mitótico, ya que aumentan la tasa de producción celular por cripta, a través de un mecanismo directo o mediante los metabolitos resultantes de la fermentación de la FD, ácidos grasos volátiles (AGVs), especialmente butírico (Pell et al., 1992; Lee et al., 1993; Gallaher et al., 1995).

Sin embargo, también existen publicaciones que no encuentran un efecto de la FD sobre modificaciones importantes en la morfología y actividad mitótica del intestino (Gregoire et al., 1991).

En la literatura relacionada con esta área, se encuentran dos conclusiones diferentes; una que apoya a la FD como elemento protector contra modificaciones patológicas en intestino, como cáncer de colon (Scheiwzer, 1991; Weisburger et al., 1993; Zusman et al., 1997; Harris et al., 1999). Otra que supone una relación directa entre consumo de FD y la presencia de factores de riesgo carcinogénico, como proliferación celular e índice mitóticos elevados (Scheiwzer, 1991; Edwards, 1992; Freeman, 1993; Jiang et al., 1996; Harris et al., 1999).

Diversos autores han sugerido el estudio de proliferación y diferenciación celular gastrointestinales como biomarcadores de procesos patológicos (Lipkin, 1988; Robblee et al., 1989).

Para estudiar y evaluar la proliferación celular o actividad mitótica en mucosa intestinal existen una serie de parámetros bioquímicos y morfológicos (Menard, 1994).

Para el análisis morfológico tanto de tejidos normales como patológicos, se han utilizado diversos parámetros cuantitativos con la ayuda de diferentes instrumentos y equipos, de forma que existen estudios con procesadores de imágenes (Ishido et al., 1994), análisis tridimensionales computarizados (Hamilton et al., 1994) y en general todos aquellos de tipo morfométrico (Lipski et al., 1992; Morikawa et al., 1993).

Los efectos fisiológicos de la FD en el tubo digestivo se deben a múltiples interacciones de ésta con el contenido intestinal, cambios en la mucosa, velocidad de transporte y absorción de los nutrientes como lípidos y ácidos biliares, metabolitos de la fermentación.

Existen publicaciones que abordan la relación de los efectos no deseados causados por la ingestión de FD, en estos se demuestra que la digestibilidad de todos los nutrientes disminuye (Bach Knudsen et al., 1994). En humanos y en ratas se han encontrado deficiencias de vitaminas A, B1 y B12 causadas por el consumo de diversas fuentes de fibra (Khokhar et al., 1990). La FD también puede influir negativamente en la absorción de iones como Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} y otros elementos, debido probablemente a la unión de éstos con los componentes de la fibra (Gordon et al., 1983; Reinhold et al., 1986; Fairweather-Tait et al., 1990). En poblaciones humanas con consumo considerable de fibra en la dieta, se observan deficiencias de Fe^{++} , Zn^{++} , Ca^{++} , fosforo y vitamina D, dichos elementos son eliminados en heces, alterando el balance de minerales (Davies, 1978; Reinhold et al., 1981; 1986).

En México, la dieta de un amplio sector de la población era abundante en fibra. En la década de los 70s el consumo estimado, de fibra total, fue de 94 g/día (Bright-See et al., 1984) o de 23-24 g/día de fibra detergente neutra (FDN) para la clase media (Rosado et al., 1991). En la zona rural, el promedio estimado fue de 32 g de FDN por día (Reinhold et al., 1979).

Sin embargo, en años recientes (1980-1990) se han modificado los hábitos alimenticios de la población mexicana, el consumo de fibra dietética ha disminuido en aproximadamente un 25%, mientras que el consumo de alimentos industrializados, tanto en la zona rural como urbana, aumentó de 2 a 5 veces más. Lo anterior, puede ser un factor determinante en la génesis de una nueva situación epidemiológica, aumento de mortalidad por enfermedades crónico degenerativas (Chávez et al., 1993).

En México, el maíz (que se consume principalmente como tortilla), alimento básico y tradicional, es una fuente importante de proteína, energía y FD (Madrigal et

al., 1986). Además este cereal se emplea en la fabricación industrial de múltiples derivados, como subproducto se obtiene la cascarilla del grano, de la que se produce salvado, producto de bajo costo empleado en la alimentación animal y/o humana. El salvado de maíz contiene 1.38% de fibra soluble y 81.27% de fibra insoluble, puede emplearse para la fabricación de alimentos enriquecidos con fibra, con fines preventivos o terapéuticos (Koruda, 1993; Ning et al., 1991).

La estructura y propiedades de los componentes del salvado de maíz (FM) pueden modificarse mediante tratamientos químicos con soluciones de ácidos o álcalis y a través de tratamientos físicos como calentamiento, trituración, extrusión. Con tratamientos ácido-alcalino se incrementa la proporción de fibra soluble a un 12%, mientras que la fibra insoluble disminuye al 38.45%. Por lo cual, se logra modificar algunas propiedades de la FD de importancia en la fabricación de alimentos, como la solubilidad en agua, capacidad emulsificante y/o gelificante, entre otros (Ning et al., 1991).

En el salvado de maíz sometido a tratamiento ácido y alcalino se presenta: solubilización por hidrólisis (ruptura de enlaces covalentes con adición de los elementos del agua), flexibilidad de las microfibrillas (celulosa-hemicelulosa), residuos monómeros como xilosa y arabinosa (solubilización de hemicelulosa) (Ning et al., 1991).

Con el propósito de evaluar las propiedades fisiológicas de 6 diversas FM modificadas, nuestro grupo de trabajo realizó estudios previos en ratas, encontrando que algunas de estas fibras (fibra de maíz ácida alcalina FMAA y fibra de maíz ácida alcalina extrusada FMAAE), poseen efectos hipocolesterolémicos importantes, comparables en algunos casos con la fibra de avena que se sabe es efectiva para bajar niveles elevados de colesterol serico (González et al., 1994a; 1994b).

Nuestros principales hallazgos en ratas adultas fueron: en cuanto a la respuesta del intestino a la FM modificada, que el consumo del 7% de FM durante cuatro semanas provocó cambios en el espesor de la capa mucosa y muscular, además aumentó el número y longitud de las vellosidades, principalmente en

duodeno e íleon; en el intestino grueso se incrementó la profundidad de las criptas (Albarrán et al., 1993; 1994)

Por lo que se considera importante establecer, si la respuesta del intestino a la presencia de la FM modificada y del colesterol es adaptativa, o podría llegar a ser una alteración patológica. Mediante el análisis de la zona de proliferación epitelial, proporción de células indiferenciadas y diferenciadas y número de células epiteliales en proceso de muerte.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fibra y lípidos de la dieta tienen efectos sobre el metabolismo del tubo digestivo y estos cambios están acompañados por modificaciones morfológicas de mucosa intestinal. Además, si se considera que el intestino es un sistema dinámico, sensible a cambios en la composición de la dieta, a factores internos y externos (Jenkins et al., 1994), resulta interesante analizar el efecto de niveles elevados de colesterol y salvados de maíz natural y tratados físico-químicamente sobre parámetros morfométricos, inmunohistoquímicos y ultraestructurales del intestino grueso

Por la importancia de la plasticidad intestinal en el conocimiento de diversas patologías -con posibles influencias alimenticias- es necesario realizar un estudio cuantitativo de la zona de recambio epitelial, así como de la proporción de las diferentes estirpes celulares epiteliales, como indicadores de los efectos sobre el metabolismo celular inducidos por diversos elementos de la dieta (fibra y colesterol).

HIPÓTESIS

Los factores dietéticos como las fibras y lípidos modifican la morfología de la mucosa intestinal, específicamente en el intestino grueso, sin que se conozcan aún los mecanismos precisos, entonces al incluir en la dieta de ratas niveles elevados de colesterol y salvado de maíz natural o modificado físico-químicamente se provocarán cambios importantes en espesor de capas, profundidad de criptas, así como en la proporción de células epiteliales maduras y en el índice de proliferación celular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de niveles elevados de fibra de maíz natural, modificada y del colesterol sobre parámetros morfométricos y ultraestructurales del intestino grueso y parámetros nutricionales de ratas en crecimiento.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Analizar los efectos de la fibra de maíz natural y modificada, así como del colesterol sobre el consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia de ratas en crecimiento.
- 2.- Determinar los efectos del salvado de maíz natural y modificado y colesterol sobre el peso del tracto gastrointestinal, hígado y pH cecal de ratas en crecimiento.
- 3.- Cuantificar los efectos de niveles elevados de colesterol y salvado de maíz dietéticos, en el espesor de mucosa, en el número, espesor y profundidad de las criptas intestinales, en la proporción de células columnares, caliciformes, enteroendocrinas e indiferenciadas, y en el número de células en proliferación y en proceso de muerte en ciego, colon proximal y colon distal de ratas en crecimiento.
- 4.- Analizar los efectos del salvado de maíz natural y modificado y del colesterol a nivel descriptivo ultraestructural en ciego, colon proximal y colon distal de ratas en crecimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

PARÁMETROS NUTRICIONALES

Se utilizaron 70 ratas machos de la cepa Wistar de 5-6 semanas de edad y con un peso inicial de 100 ± 10 g. Los animales se alojaron en jaulas individuales y se mantuvieron en condiciones de bioterio (Bioterio, CUCS). Se formaron 7 grupos experimentales (Cuadro 1) que recibieron dietas purificadas con la inclusión de fibra al 10% en sustitución y ajuste de la mezcla almidón-sacarosa 60% (Cuadro 2). Las dietas fueron isocalóricas (3.5 Mcal/Kg.) e isoproteicas (20%) (NRC, 1995).

CUADRO 1. DISTRIBUCIÓN DE ANIMALES Y TRATAMIENTOS.

| GRUPO | ANIMALES POR GRUPO | TRATAMIENTO | ABREVIATURA |
|-------|-----------------------|--|-------------|
| 1 | 10 | BASAL | B |
| 2 | 10 | BASAL, CELULOSA 10% | BCEL |
| 3 | 10 | BASAL, CELULOSA 10%, COLESTEROL 1% | BCELCOL |
| 4 | 10 | BASAL, FIBRA DE MAÍZ NATURAL 10% | BFMN |
| 5 | 10 | BASAL, FIBRA DE MAÍZ ÁCIDA ALCALINA 10% | BFMAA |
| 6 | 10 | BASAL, FIBRA DE MAÍZ ÁCIDA ALCALINA 10%, COLESTEROL 1% | BFMAACOL |
| 7 | 10 | BASAL, FIBRA DE MAÍZ ÁCIDA-ALCALINA EXTRUSADA 10% | BFMAAE |

CUADRO 2. COMPOSICIÓN (%) DE DIETAS EXPERIMENTALES

| INGREDIENTES | B | BCEL | BCELCOL | BFMN | BFMAA | BFMAACOL | BFMAAE |
|-------------------|------|------|---------|------|-------|----------|--------|
| CASEÍNA | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| SACAROSA | 25.0 | 25.0 | 25.0 | 25.0 | 25.0 | 25.0 | 25.0 |
| ACEITE | 5.0 | 8.0 | 8.0 | 8.0 | 8.0 | 8.0 | 8.0 |
| ALMIDÓN | 45.0 | 32.0 | 30.9 | 32.0 | 32.0 | 30.9 | 32.0 |
| FIBRA | | | | | | | |
| CELULOSA | 0.0 | 10 | 10 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| FMN | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 10.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| FMAA | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 10.0 | 10.0 | 0.0 |
| FMAAE | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 10.0 |
| VITAMINAS | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| MINERALES | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| DL METIONINA | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| CLORURO DE COLINA | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| COLESTEROL | 0 | 0 | 1.0 | 0 | 0 | 1.0 | 0 |
| AC. COLICO | 0 | 0 | 0.1 | 0 | 0 | 0.1 | 0 |
| BENZOATO DE SODIO | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

B (BASAL)

BCEL (BASAL+CELULOSA)

BCELCOL (BASAL+CELULOSA+COLESTEROL)

BFMN (BASAL+FIBRA DE MAÍZ NATURAL)

BFAA (BASAL+FIBRA DE MAÍZ ÁCIDA ALCALINA)

BFMAACOL (BASAL+FIBRA DE MAÍZ ÁCIDA ALCALINA+COLESTEROL)

BFMAAE (BASAL+FIBRA DE MAÍZ ÁCIDA ALCALINA EXTRUSADA)

Los ingredientes se obtuvieron de ICN de México (ICN Biochemical & Pharmaceutic Inc.), y las fibras de maíz tanto natural como modificadas fueron una

donación del Depto. de Alimentos de la Universidad de Illinois (Ning, 1991). La preparación de las dietas fue manual y se elaboraron semanalmente.

Las ratas se sometieron a un período de adaptación, a jaulas y manejo, de 7 días. El alimento se suministró en forma de galleta, durante 28 días, se registró cada semana el consumo de alimento y la ganancia de peso de cada animal, así como el peso final, para calcular la conversión alimenticia.

El consumo de alimento se calculó por diferencia de la cantidad de dieta proporcionada y la rechazada, cada tercer día. Los cálculos se reportaron en base seca de acuerdo al análisis bromatológico (Tejada, 1992), aplicado a las dietas por triplicado durante el período inicial, medio y final del estudio.

Al final de la fase experimental se sacrificaron las ratas, siguiendo las reglas internacionales para el uso de animales de laboratorio (Howard-Jones, 1985; NRC, 1999), se practicó una laparotomía media abdominal, para extraer el tracto gastrointestinal e hígado, los cuales se pesaron.

Inmediatamente después del sacrificio se obtuvo el contenido cecal que se diluyó 1:1 con agua destilada-desionizada y se registro el pH con un potenciómetro portátil (Corning) (Tejada, 1992).

PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS Y ULTRAESTRUCTURALES

Para cubrir esta etapa se utilizaron 21 ratas, el experimento se repitió en dos ocasiones: La primer repetición con 2 animales y posteriormente una repetición con una rata por grupo.

Los segmentos o tejidos para microscopía electrónica inicialmente se procesaron con la técnica rutinaria. Sin embargo, debido a que no se obtuvieron imágenes adecuadamente contrastadas se realizaron diversas modificaciones y pruebas a dicha técnica. El procedimiento final fue el siguiente:

Al terminar el período experimental los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/Kg), inmediatamente se procedió a realizar una laparotomía media abdominal para extraer ciego y colon, las cuales se colocaron en solución Hank 2X, se disectaron por la parte media formando una túnica de intestino

de aproximadamente 1 cm^2 , se sujetaron con alfileres a una superficie suave (parafina), la mucosa quedó expuesta y fue la primera zona en contacto con el fijador, glutaraldehído 1.25% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.4, el cual bañó completamente la muestra de tejido y se incubó durante 1.5 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron y conservaron en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4 hasta su procesamiento.

Para el proceso de posfijación, se utilizaron fragmentos de 1 mm^3 de mucosa, los que se sumergieron en tetraóxido de osmio 2% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, durante 1 h. Después se deshidrataron con etanol en concentraciones ascendentes (50, 70, 90, 96 y 100%), óxido de propileno, se infiltraron en una mezcla de óxido de propileno-resina 1.5:1 y se incluyeron en resina Polybed 812 mediante la técnica rutinaria (Dawwes, 1971).

Los cortes gruesos ($0.5 \mu\text{m}$) y finos (90 nm), se obtuvieron con cuchillas de vidrio en un ultramicrotomo (Reichert Om U3). Los cortes gruesos se tificaron con azul de toluidina y los finos se montaron en rejillas de cobre, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, para su análisis en el microscopio electrónico de transmisión.

Los cortes gruesos se utilizaron para el análisis descriptivo de mucosa y de los parámetros morfométricos. Los parámetros que se evaluaron fueron: a) Espesor de mucosa; b) Número, profundidad y espesor de criptas; c) Proporción de las diversas estirpes celulares (columnares, caliciformes, enteroendocrinas e indiferenciadas). Este parámetro se calculó con base al número de células específicas y su relación con el total de células por cripta, y se expresó en porcentaje; d) células muertas, en un microscopio Leica DMLS con un programa para análisis de imágenes Leica Q500IW.

Para el análisis descriptivo de las células epiteliales, se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Jeol Jem-1010 y para la digitalización de las imágenes en estudio se utilizó el programa Digital Micrograph 2.5 (Macintosh H.D.).

La evaluación estadística se realizó por medio de análisis de varianza (ANVA) completamente al azar y en caso de diferencias entre medias se aplicó la prueba de

Diferencia Mínima Significativa (DMS) a un nivel de significancia de 0.05 (Rodríguez, 1991; Reyes, 1984).

INMUNOHISTOQUIMICA

DETERMINACIÓN DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Para visualizar y determinar el número de células en proceso de proliferación se utilizó la técnica de Bromodeoxiuridina (BrdUrd) (Jin et al., 1994), con el método de Complejo Avidina-Biotina (PIERCE, 1994; AFIP, 1995)

La técnica se estandarizó para intestino, el proceso detallado se describe a continuación:

Una hora antes del sacrificio se inyectó BrdUrd en una dosis de 50 mg/Kg (ICN Biomedicals Inc). Inmediatamente después del sacrificio se obtuvieron muestras representativas de ciego, colon proximal y colon distal que se fijaron por inmersión en solución de Carnoy, estas muestras se procesaron hasta su inclusión en parafina de manera rutinaria. Después de obtener cortes de 10 μ m de espesor, se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados (desgrasados y en baño con solución de gelatina dorada al 2.5%).

1) Los cortes se desparafinaron e hidrataron por el método convencional, se incubaron a 60°C y se trataron con xilol, alcohol etílico en serie decreciente y agua destilada.

2) Se enjuagaron en solución salina de fosfatos (PBS) 0.1 M pH 7.3-7.4 Dos cambios de 10 min cada uno.

3) Se sometieron al proceso de desenmascaramiento, mediante 3 ciclos de corriente alterna 100 V, durante 7-10 min y temperatura máxima de 55°C, en PBS 0.1 M.

4) Preparación del tejido para BrdUrd.

Se realizaron dos lavados con PBS 0.1 M de 10 min cada uno a temperatura ambiente y sin agitar.

Las laminillas se colocaron en solución de metanol, peróxido de hidrógeno durante 30 min, para bloquear las peroxidasas endógenas. Con lavados posteriores de PBS y agua destilada.

5) Proceso de digestión.

Las preparaciones se colocaron en HCl 0.1 N a 4°C durante 10 min. Después se incuban en HCl 2 N a 37°C durante 13 a 15 min, la reacción de digestión se observó con anaranjado de acridina 0.03% (A-4921 Sigma) en el microscopio de fluorescencia (en el momento en que los núcleos de epitelio de criptas intestinales aparecen anaranjados se interpreta como digestión del material genético):

La digestión se detiene con dos lavados de PBS 0.1 M pH 7.3 durante 10 min cada uno. Posteriormente, se realizaron dos lavados con solución Bórax (tetraborato de sodio, B-9876, Sigma), 0.1 M pH 8.5, durante 10 min cada uno.

Se realizaron dos lavados con PBS 0.1 M más triton X-100 0.1% (T) y albúmina al 0.1% (A) (A-3059 Sigma) (PBS+T+A), de 10 min cada uno.

6) Bloqueo de sitios de uniones inespecíficas

Se preparó una solución de glicina (G-6143 Sigma) 0.2 M y lisina (L-5501 Sigma) 0.2 M en PBS+T+A y suero de caballo.

Se colocaron de 150 a 200 µl de la solución glicina-lisina por laminilla, se cubrieron con parafilm y se depositaron en una cámara húmeda durante 2h.

Se realizaron 3 lavados con PBS+T+A de 10 min cada uno.

7) Incubación con el anticuerpo primario.

Se utilizó el anticuerpo BrdUrd (Novocastra Ncl-Brdu/monoclonal de ratón, 15 mM azida de sodio) a una dilución de 1:200. Dicho anticuerpo se preparó en PBS+T+A y suero de caballo. Se colocaron 200 µl de la solución del anticuerpo por portaobjeto, se cubrieron con parafilm y se mantuvieron en la cámara húmeda a 4°C durante toda la noche.

8) Incubación con el anticuerpo secundario.

La cámara húmeda con las laminillas y las soluciones de trabajo se retiraron del cuarto frío y se dejaron a temperatura ambiente durante 40 min.

Se realizaron 3 lavados con PBS+T+A de 10 min cada uno.

Como anticuerpo secundario se utilizó IgG Biotinizado anti-ratón (H+L) (hecho en caballo Vector BA2000) dilución 1:250, el cual se preparó en PBS+T+A y suero de caballo.

Se aplicaron 200 µl de la solución de anticuerpo secundario a cada laminilla, se cubrieron con parafilm y se colocaron en la cámara húmeda durante 2 h a temperatura ambiente.

Enseguida se realizaron 3 lavados con PBS+T+A de 10 min cada uno.

9) Incubación el Complejo Biotina-Avidina (ABC).

Función: se une al segundo anticuerpo y amplifica la reacción

Se utilizó el complejo ABC estándar (PK-400 Vectastain) solución A (Avidina) y solución B (Peroxidasa de raíz fuerte biotinizada) a una dilución de 1:100, se preparó en PBS+T+A, leche en polvo 5% y suero de caballo 5%

Se aplicaron 200 µl por laminilla y se cubrieron con parafilm, para depositarlos en la cámara húmeda y en oscuridad durante 2 h.

Se realizaron 3 lavados con PBS+T+A en jarra coplin de 10 min cada uno.

Dos lavados con PBS 0.1 M de 5 min cada uno.

Un lavado con Tris-HCl 0.1 M pH 7.62 de 5 min.

10) Revelado de la reacción inmunohistoquímica con diaminobencidina (DAB) (D5637 Sigma) y níquel (Ni) (6408 Mallinckrodt)

Se utilizaron 100 ml de una solución A (DAB 0.03% preparada en Tris-HCl pH 7.6), 1 ml de sol B (400 µl de peróxido de hidrógeno en 12.5 ml de tris-HCl pH 7.6) y 20 ml de sol C (0.25 g níquel en 25 ml de Tris-HCl pH 8.6).

Las laminillas se colocaron en jarras coplin y se dejaron en agitación con la solución DAB/Ni de 5 a 15 minutos, la reacción de revelado se observó al microscopio cada 3 a 5 minutos y se detuvo con un lavado de PBS y agua destilada, al momento de observar núcleos epiteliales homogéneos de color café oscuro (positivos).

11) Montaje de laminillas

Las laminillas se pasaron a través de un tren de deshidratación, etanol al 70, 90, 96, 100%, etanol-xilol 1:1, xilol y se montaron con resina entellan.

Para la cuantificación de las células se utilizó un Microcopio compuesto Leica DMLS, equipado con un analizador de imágenes Leica Q500IW. Se cuantificaron 10 criptas cortadas longitudinalmente por laminilla, 5 laminillas por grupo, provenientes cada una de diferente animal y repetición de la técnica inmunohistoquímica. Se contaron los núcleos positivos y total de núcleos por cripta, para calcular el porcentaje de células positivas a BrdUrd. Los datos resultantes se sometieron a un análisis de varianza completamente al azar y a un nivel de significancia de $p < 0.05$ (Rodríguez, 1991).

RESULTADOS

PARÁMETROS NUTRICIONALES

PESO CORPORAL

Los animales de los diferentes grupos presentaron un peso corporal ascendente durante las cuatro semanas de tratamiento con las dietas indicadas. No se encontraron diferencias estadísticas en el peso corporal de las ratas de los grupos estudiados durante la primer semana de tratamiento (153 a 160 g).

En las semanas 2 y 3 se observaron diferencias estadísticas en el peso corporal, por efecto de las dietas proporcionadas, el grupo que recibió la dieta basal presentó el mayor peso corporal. Al final del estudio (semana 4) se tuvo un rango de pesos corporales de 269-300 g, el mayor peso ($p<0.05$) correspondió a las ratas del grupo basal (B), con 300.85 g (Cuadro 3).

CUADRO 3. EFECTO DEL TIPO DE FIBRA Y COLESTEROL DE LA DIETA SOBRE EL PESO CORPORAL DE RATAS EN CRECIMIENTO.

| GRUPOS | INICIAL | SEMANA 1 | SEMANA 2 | SEMANA 3 | FINAL |
|----------|------------|------------|--------------|--------------|-------------|
| B | 105.15±1.0 | 160.91±1.5 | 218.54±3.3a | 273.45±4.0a | 300.85±3.1a |
| BCEL | 105.84±1.8 | 155.15±1.8 | 198.36±4.0c | 258.92±4.2ab | 286.2±4.1ab |
| BCELCOL | 102.68±1.3 | 155.73±2.6 | 207.6±3.6abc | 258.6±4.1ab | 274.11±4.9b |
| BFMN | 99.31±1.4 | 153.92±3.5 | 206.6±3.0abc | 260.14±5.8ab | 277.33±5.1b |
| BFMAA | 99.18±0.9 | 153.34±1.7 | 197.59±2.7c | 251.85±2.3b | 269.17±2.3b |
| BFMAACOL | 100.22±1.1 | 154.39±2.1 | 202.51±4.3bc | 251.31±5.0b | 270.12±5.2b |
| BFMAAE | 101.19±0.9 | 157.24±0.9 | 212.61±1.2ab | 258.92±2.9ab | 278.68±3.1b |

Valores= Media ± Error estándar

a,b,c indican diferencia estadística entre tratamientos por semana ($p<0.05$).

PESO DE TRACTO GASTROINTESTINAL (TGI)

El peso del TGI fue afectado por las diferentes dietas (fibra y colesterol), los grupos de animales con mayores pesos del TGI (estadísticamente similares entre ellos) fueron; el BCEL (19.17 g), BFMAA (19.04 g), BCELCOL (18.70 g) y el control o B (18.66 g), los valores intermedios fueron para los grupos BFMAAE (18.32 g) y BFMAACOL (17.55 g), el valor menor estadísticamente significativo fue para el grupo BFMN (16.67 g) (Cuadro 4).

PESO DE INTESTINO DELGADO

Para esta región intestinal se obtuvo un rango de peso entre 12 y 15 g, el mayor peso ($p > 0.05$) fue el del grupo B, con 15.03 g, seguido de valores intermedios estadísticamente para los grupos BCEL (14.02 g), BCELCOL (13.92 g), BFMAAE (13.64 g) y BFMAA (13.42 g) y los pesos menores estadísticamente para los grupos BFMN (12.59 g) y BFMAACOL (12.10 g) (Cuadro 4).

PESO DE INTESTINO GRUESO

Para intestino grueso se encontró un rango de peso de 3.54 y 5.62 g, los pesos estadísticamente mayores fueron para los animales de los grupos BFMAA (5.62 g), BFMAACOL (5.45 g), BCEL (5.14 g) y BCELCOL (4.98 g). Los grupos con valores intermedios fueron el BFMAAE (4.68 g) y el B (4.40 g). El menor ($p < 0.05$) peso lo registró el grupo BFMN (3.54 g) (Cuadro 4).

PESO DE HÍGADO

El peso de este órgano presentó un rango de 8.62 a 13.59 g. El mayor peso, estadísticamente significativo, fue para el grupo BCELCO (13.59 g), se observó un valor intermedio para el grupo BFMAACO (13.47 g). El resto de grupos, incluyendo el B (9.84 g) presentaron pesos significativamente menores (Cuadro 4).

CUADRO 4. EFECTO DE TIPO DE FIBRA Y COLESTEROL DIETÉTICOS SOBRE EL PESO DE DIFERENTES ORGANOS DE RATAS EN CRECIMIENTO.

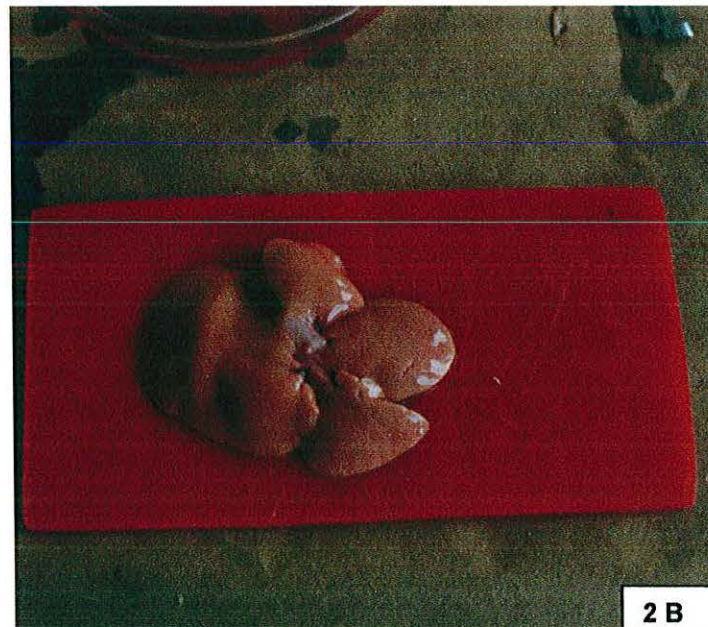
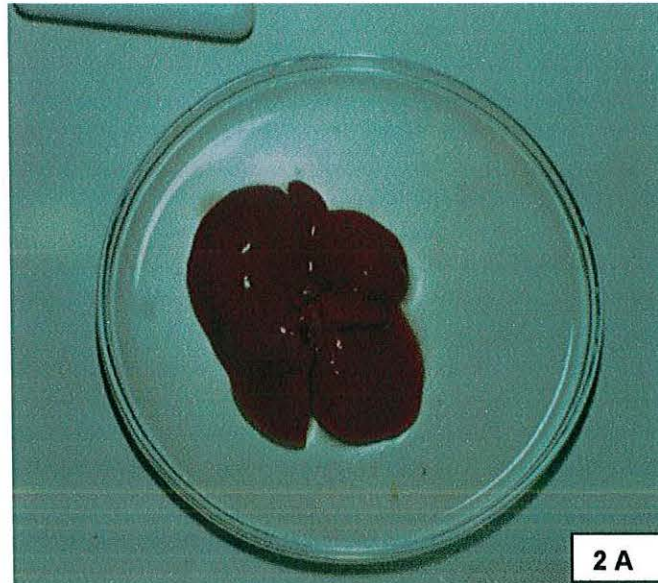
| GRUPOS | PESOS DE DIFERENTES ORGANOS (g) | | | |
|---------|---------------------------------|-------------------------|-------------------|-------------|
| | TGI TOTAL | INTEST. DELGADO | INTEST. GRUESO | HÍGADO |
| B | 18.66 ±0.5a | 15.03 ±0.9 ^a | 4.40 ±0.6ab | 9.84 ±0.5c |
| BCEL | 19.17 ±0.4a | 14.02±0.2ab | 5.14 ±0.2a | 9.49 ±0.3c |
| BCELCO | 18.70 ±0.4a | 13.92±0.4ab | 4.98 ±0.1a | 13.59 ±0.4a |
| BFMN | 16.67 ±0.2b | 12.59 ±0.4b | 3.54 ±0.1b | 8.62 ±0.2c |
| BFMAA | 19.04 ±0.4a | 13.42±0.2ab | 5.62 ±0.2a | 9.41 ±0.1c |
| BFMAACO | 17.55±0.5ab | 12.10 ±0.4b | 5.45 ±0.2a | 13.47±0.4ab |
| BFMAAE | 18.32±0.4ab | 13.64±0.3ab | 4.68±0.1ab | 9.07 ±0.1c |

Valores = Media ± Error Estándar

a,b,c indican diferencia estadística entre tratamientos ($p < 0.05$).

Se encontró un aumento aproximado del 30% en el peso de hígado por efecto de la inclusión de colesterol (1%) en la dieta, independientemente de la presencia de fibra dietética. Por su aspecto macroscópico, estos tejidos se clasificaron como hígados grasos (Figura 2).

Figura 2. Aspecto macroscópico de hígado de ratas que recibieron: (2 A) niveles normales de colesterol (0.1%) y (2 B) niveles elevados de colesterol (1.0%) en la dieta, este último con características de hígado graso, independientemente de la inclusión de celulosa o salvado de maíz modificado.



GANANCIA DE PESO

Al analizar este parámetro la mayor ganancia de peso fue para las ratas del grupo B con 195.70 g en el período de 4 semanas. El grupo BCEL presentó un valor (180.36 g) intermedio estadísticamente, en los grupos restantes la ganancia de peso fue menor entre ellos, se encontraron valores semejantes estadísticamente entre sí, con un rango de 169.9 a 178.02 g (Cuadro 5). La ganancia de peso diaria tuvo un rango de 6 a 7 g por día, con un promedio general de 6.34 g.

CONSUMO DE ALIMENTO (BASE SECA)

Los mayores consumos de alimento, a los 28 días, fueron estadísticamente para los grupos BCELCOL (573.73 g), B (572.22g), BCEL (560.97 g) y BFMM (552.54 g), mientras que los consumos menores ($p < 0.05$) fueron para los grupos BFMAAE (518.03 g), BFMAACOL (511.16 g) y BFMAA (506.22 g)(Cuadro 5).

CONVERSIÓN ALIMENTICIA

En el presente trabajo se encontró una conversión alimenticia adecuada para la mayoría de grupos. Sin embargo, se observaron diferencias significativas. Hubo una conversión baja para las ratas de los grupos BCELCOL (3.36) y BFMM (3.11), el resto de grupos presentó una conversión alimenticia semejante estadísticamente a los grupos B (2.93), BCEL (3.10), BFMAACOL (3.02), BFMAA (2.98), BFMAAE (2.92) (Cuadro 5).

CUADRO 5. EFECTO DEL TIPO DE FIBRA Y COLESTEROL DIETETICOS SOBRE PARÁMETROS NUTRICIONALES DE RATAS EN CRECIMIENTO.

| GRUPOS | GANANCIA E PESO (g) | CONSUMO DE ALIMENTO (g) *** | CONVERSION ALIMENTICIA |
|----------|---------------------|-----------------------------|------------------------|
| B | 195.70 ±4.2a | 572.22 ±6.8a | 2.93 ±0.04b |
| BCEL | 180.36 ±3.7ab | 560.97 ±5.3a | 3.10 ±0.07b |
| BCELCOL | 171.40 ±3.7b | 573.73 ±4.9a | 3.36 ±0.08a |
| BFMN | 178.02 ±4.0b | 552.54 ±5.0a | 3.11 ±0.05ab |
| BFMAA | 169.98 ±2.2b | 506.22 ±2.3b | 2.98 ±0.04b |
| BFMAACOL | 169.90 ±4.6b | 511.16 ±6.4b | 3.02 ±0.17b |
| BFMAAE | 177.49 ±2.8b | 518.03 ±4.7b | 2.92 ±0.03b |

Valores = Media ± Error Estándar

a,b,c indican diferencia estadística entre tratamientos $p < 0.05$

***Consumo final en base seca

pH DEL CONTENIDO DEL CIEGO

Se registraron valores cercanos al pH neutro (6.54 a 7.17), los pH mayores y estadísticamente semejantes fueron para los grupos B (7.17), BFMN (7.17) y BCELCOL (7.16), los valores intermedios para los grupos BCEL (7.09) y BFMAAE (7.08) y los datos menores ($p < 0.05$) para los grupos BFMAACOL (6.54) y BFMAA (6.63) (Gráfico 1).

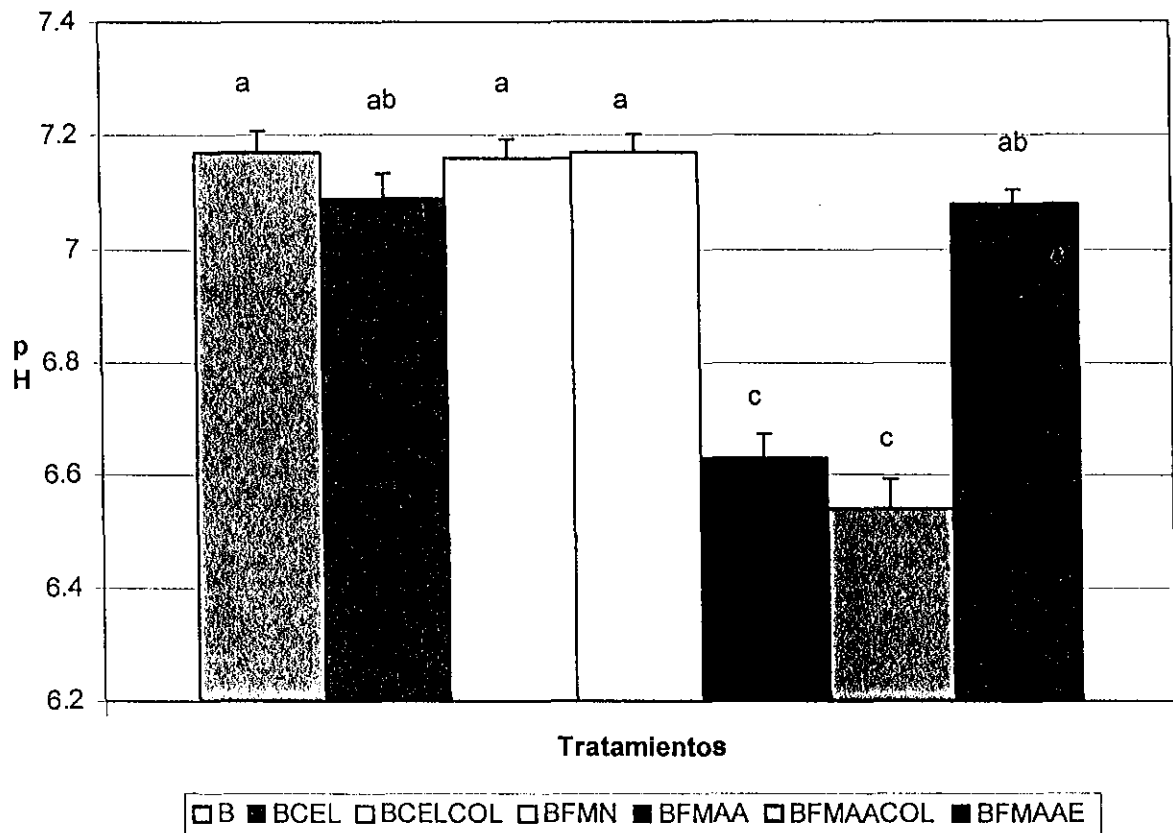


Gráfico 1. Efecto del colesterol y salvado de maíz natural y modificado sobre el pH de contenido cecal de ratas en crecimiento.

a,b,c indican diferencia estadística entre tratamientos de una misma región intestinal a $p < 0.05$.

Valores = media, error estándar.

PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS

ESPESOR DE MUCOSA

En ciego se encontró un aumento en el espesor de la mucosa, principalmente para los grupos de las dietas BCEL (234 μm), BFMAA (235 μm) y BFMAAE (230 μm), se observaron valores intermedios estadísticamente para los grupos BCELCOL (216 μm) y BFMAACOL (198 μm). Los valores menores ($p < 0.05$) se presentaron en los grupos B (182 μm) y BFMN (181 μm). Al comparar los grupos que recibieron fibra y fibra-colesterol se observó una disminución significativa del espesor de mucosa (Gráfico 2).

Al analizar el espesor de la mucosa en colon proximal se encontraron valores mayores para los grupos B (244.4 μm), BCELCOL (236.57 μm) y BFMAAE (235.63 μm). Los grupos restantes presentan valores menores con diferencias estadísticas entre ellos, BFMN (230.61), BFMAA (219.33 μm), BFMAACOL (212.75 μm), por último el grupo BCEL (203.35 μm). (Gráfico 2).

En colon distal el espesor de la mucosa fue mayor para las ratas que recibieron celulosa (323.99 μm) y fibra de maíz natural (317.72 μm). Se observaron valores intermedios estadísticamente para los grupos BCELCOL (283.88 μm), BFMAA (279.81 μm), BFMAAE (272.9 μm). Los menores valores fueron para los grupos B (266.96 μm) y BFMAACOL (253.8 μm). Se observó una disminución del espesor de la mucosa en los grupos que recibieron niveles elevados de fibra y colesterol (BCELCOL, BFMAACOL), en comparación con los grupos que solo recibieron fibra (BCEL Y BFMAA) (Gráfico 2).

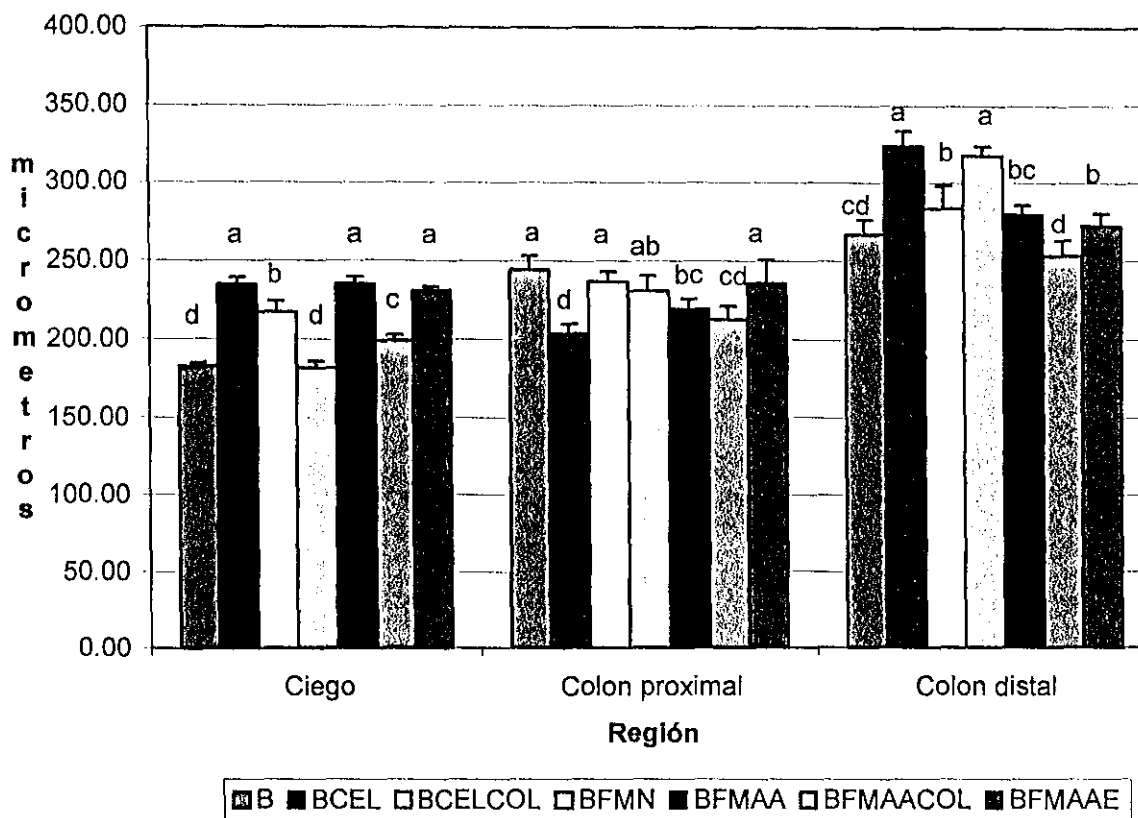


Gráfico 2. Efecto del colesterol y salvado de malz natural y modificado sobre el espesor de mucosa intestinal de ratas en crecimiento.

a,b,c indican diferencia estadística entre tratamientos de una misma región intestinal a $p < 0.05$.

Valores = media, error estándar.

PROFUNDIDAD DE CRIPTAS

Por lo que respecta a la profundidad de criptas en ciego, se encontró un comportamiento similar al espesor de mucosa. Los valores menores, estadísticamente, fueron para los grupos B (162.62 μm) y BFMN (164.50 μm), se observó un aumento significativo, en la profundidad de las criptas en los grupos BFMAACOL (181.11 μm) y BCEL (187 μm). La mayor profundidad de criptas ($p < 0.05$) se presentó en los grupos BCELCOL (197 μm), BFMAAE (200 μm) y BFMAA (202 μm) (Gráfico 3).

En colon proximal, los grupos BFMAA (177.03 μm), BCEL (178.91 μm) y BFMAACOL (183.30 μm) tuvieron valores semejantes estadísticamente al grupo B (176.72 μm). Los grupos restantes presentaron valores estadísticamente superiores y diferentes entre sí, BFMAAE (199.59 μm), BFMN (202.41 μm) y BCELCOL (209.62 μm) (Gráfico 3).

En colon distal, la menor profundidad de criptas se encontró en el grupo BFMAACOL (198.97 μm). Los valores de los grupos experimentales BFMAAE y BFMAA (215.89 μm) fueron semejantes estadísticamente al B (216.51 μm). Los grupos BCELCOL (231.24 μm) y BFMN (242.21 μm) presentaron valores superiores, siendo marcada la diferencia estadística con el grupo BCEL (262.26 μm) (Gráfico 3).

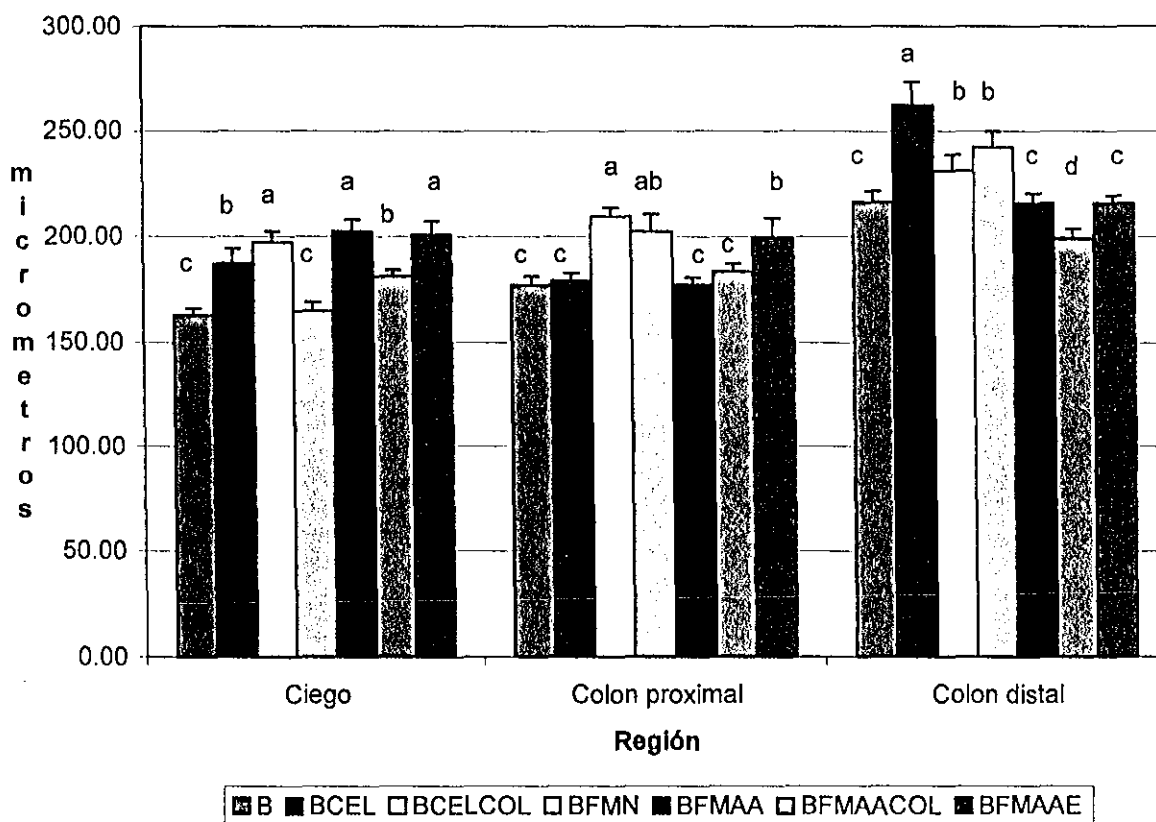


Gráfico 3. Efecto del colesterol y salvado de maíz natural y modificado sobre la profundidad de criptas del intestino grueso de ratas en crecimiento.

a,b,c indican diferencia estadística entre tratamientos de una misma región intestinal a $p < 0.05$.

Valores = media, error estándar.

NUMERO DE CRIPTAS/mm

Al cuantificar el número de criptas por mm de intestino cecal, se encontró el valor menor para el grupo BFMAACOL (15.59 criptas/mm), valores intermedios estadísticamente para los grupos B (16.74/mm), BFMAAE (16.74/mm), valores superiores y diferentes estadísticamente entre sí para los grupos BCELCOL (17.50/mm), BFMN (18.29/mm), BFMAA (18.29/mm) y BCEL (19/mm), En este parámetro se observó una reducción en el número de criptas por la presencia de colesterol en la dieta, dato que se obtuvo al compararlos con los grupos semejantes que no recibieron colesterol (Gráfico 4).

Colon proximal, se encontraron valores menores al grupo basal (21.55/mm), en ratas de los grupos BFMAAE (18.14/mm), BCELCOL(19.57/mm) y BCEL(20.14/mm). Los grupos BFMAACOL (22.40/mm), BFMAA(22.55/mm) y BFMN (22.82/mm) presentaron el mayor número de criptas, diferencias estadísticamente significativas (Gráfico 4).

Por lo que respecta al número de criptas por mm de colon distal el valor más alto se encontró para el grupo BCEL (21.42/mm). Valores estadísticamente diferentes y menores se observaron en los grupos BFMAAE (21.12/mm), B (19.85/mm), BFMAA (19.57/mm), BFMAACOL (18.57/mm). Los grupos con el menor número de criptas ($p>0.05$) fueron BFMN (18.29/mm) y BCELCOL (17.72/mm) (Gráfico 4).

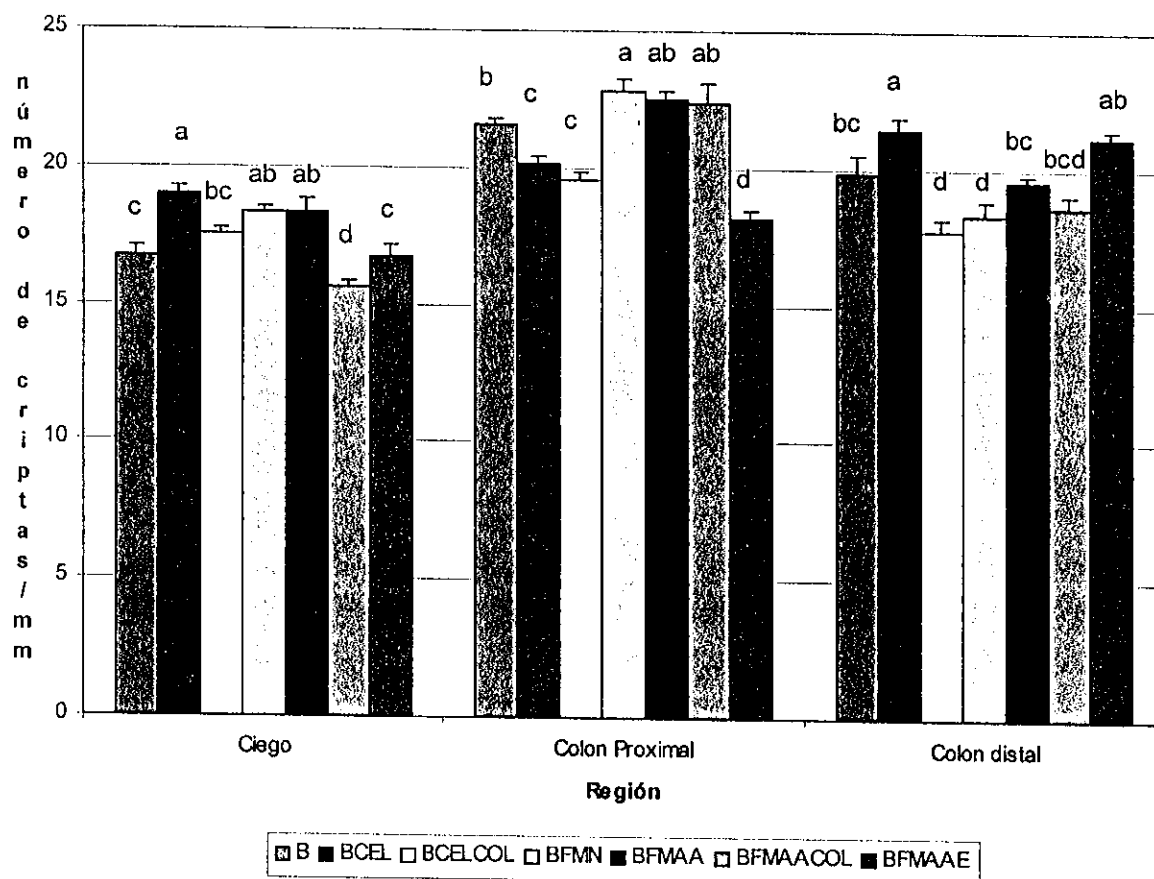


Gráfico 4. Efecto del colesterol y salvado de maíz natural y modificado sobre el número de criptas por milímetro de intestino grueso de ratas en crecimiento.
 a,b,c indican diferencia estadística entre tratamientos de una misma región intestinal a $p < 0.05$.
 Valores = media, error estándar.

ESPESOR DE CRIPTAS

Para el espesor de criptas en ciego, el valor del grupo B ($46.69 \mu\text{m}$) resultó intermedio estadísticamente. Los grupos BCEL ($44.49 \mu\text{m}$) y BFMN ($41.99 \mu\text{m}$) presentaron valores menores. En los grupos BCEL COL ($48.88 \mu\text{m}$), BFMAA ($49.19 \mu\text{m}$) se encontraron valores estadísticamente superiores al B. Los grupos BFMAA COL ($52 \mu\text{m}$), BFMAAE ($53.27 \mu\text{m}$), presentaron valores estadísticamente

mayores ($p < 0.05$). Para este parámetro se observó un ligero aumento por la presencia de colesterol en la dieta (Gráfico 5).

Colon proximal, los grupos B (42.93 μm), BFMAA (41.67 μm) y BFMAAE (44.18 μm) presentaron semejanzas estadísticas, el grupo BFMAACOL (37.29 μm) y BFMN (41.05 μm) tuvieron el menor espesor de criptas, los grupos que recibieron BCEL (44.81 μm) y BCELCOL (48.88 μm), presentaron valores estadísticamente mayores al basal (Gráfico 5).

En colon distal, el mayor espesor de criptas fue para el grupo BFMN (45.75 μm), seguido estadísticamente por el grupo BCEL (43.24 μm). Se encontraron valores intermedios para los grupos BFMAA (42.61 μm), BCELCOL (41.99 μm) y BFMAACOL (41.36 μm). El menor espesor de criptas fue para el grupo B (39.17 μm) y BFMAAE (34.78 μm) (Gráfico 5).

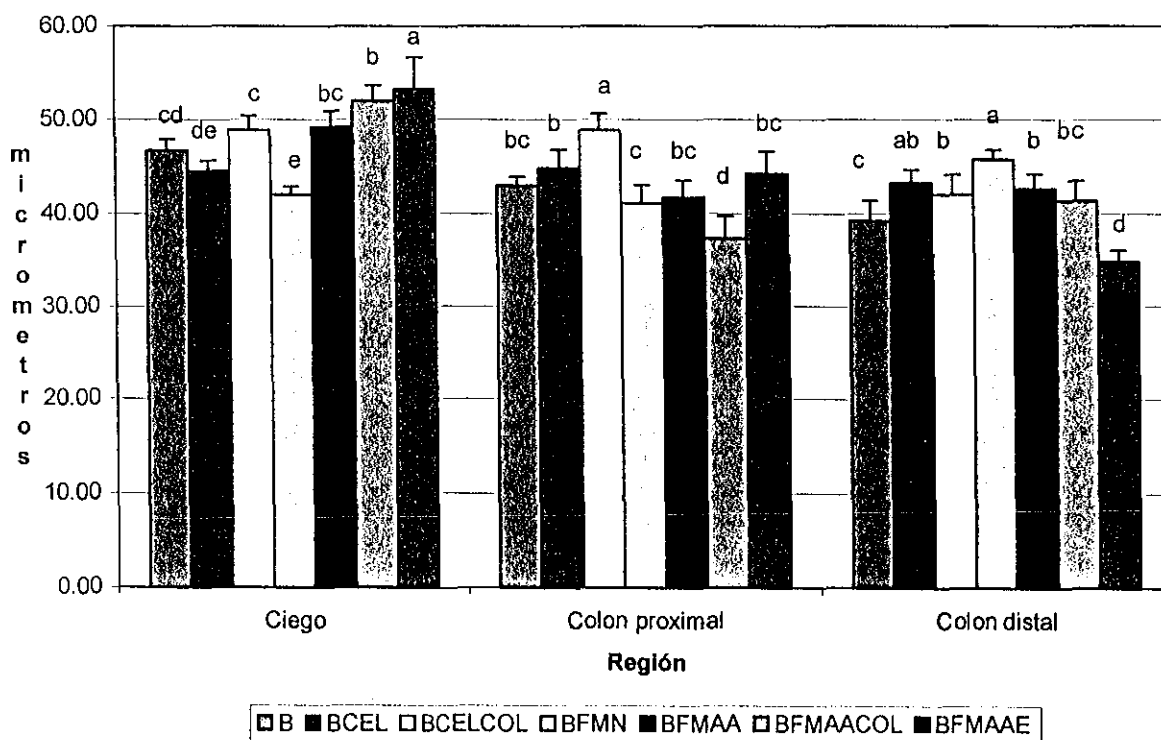


Gráfico 5. Efecto del colesterol y salvado de maíz natural y modificado sobre el espesor de criptas intestinales de ratas en crecimiento.

a,b,c indican diferencia estadística entre tratamientos de una misma región intestinal a $p < 0.05$.

Valores = media, error estándar.

PROPORCIÓN DE ESTIRPES EPITELIALES

Porcentaje de células columnares

En ciego, el porcentaje de células columnares no presentó diferencias significativas por efecto de las dietas suministradas, observándose valores de 71 a 76%.

Para colon proximal el porcentaje de células columnares presentó diferencias estadísticas con relación a las dietas suministradas, el valor intermedio fue para el grupo B (72.53%), los grupos BFMN (66.89%), BCEL (64.76%) y BFMAACOL (66.14%), presentaron valores inferiores estadísticamente al basal. Los valores estadísticamente mayores fueron para los grupos BCELCOL (73.47%), BFMAA (74.01%) y BFMAAE (74.79%).

Para colon distal no se encontraron diferencias estadísticas en el porcentaje de células columnares, los valores presentaron un rango de 60-71% (Gráfico 6).

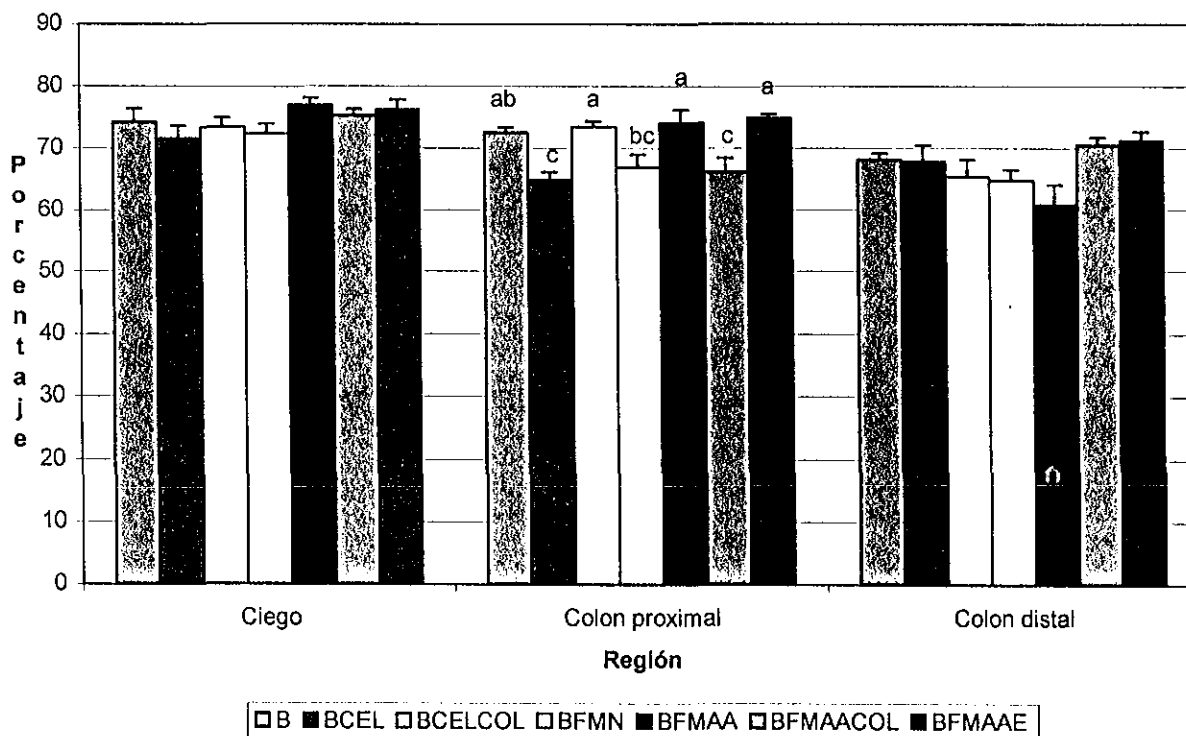


Gráfico 6. Efecto del colesterol y salvado de maíz natural y modificado sobre el porcentaje de células columnares en intestino grueso de ratas en crecimiento.

a,b,c indican diferencia estadística entre tratamientos de una misma región intestinal a $p < 0.05$.

Valores = media, error estándar.

Porcentaje de células caliciformes

En ciego, el porcentaje de células caliciformes no presentó diferencias estadísticas y se registraron valores de 13 a 18%. En colon proximal, el valor del grupo basal fue intermedio (19.47%), los grupos BCELCOL (17.68%), BFMAA (16.60%) y BFMAAE (14.7%) tuvieron los valores menores estadísticamente. Los valores mayores fueron para los grupos BFMN (22.32%), BFMAACOL (23.74%) y BCEL (24.82%). Para colon distal, se registró un rango de 22 a 30% células caliciformes, sin diferencias estadísticas entre estos valores (Gráfico 7).

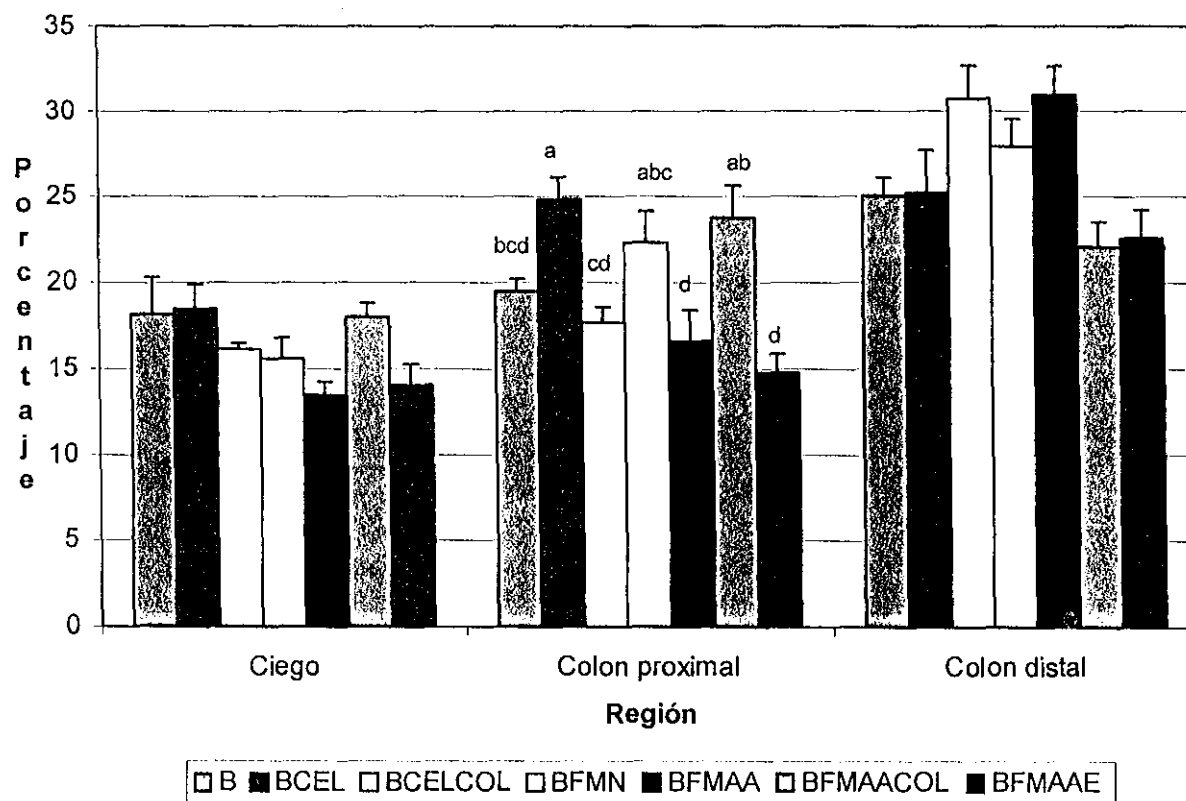


Gráfico 7. Efecto del colesterol y salvado de maíz natural y modificado sobre el porcentaje de células caliciformes en intestino grueso de ratas en crecimiento.

a,b,c indican diferencia estadística entre tratamientos de una misma región intestinal a $p < 0.05$.
Valores = media, error estándar.

Porcentaje de células enteroendocrinas

En ciego se encontró un mayor porcentaje de estas células epiteliales, con un rango amplio de valores. El grupo BFMAACOL (2.11%) tuvo el menor porcentaje de células enteroendocrinas. El grupo B (2.34%) presentó un valor intermedio y comparte semejanzas estadísticas con los grupos BFMAA (2.52%), BFMAAE (2.90%) y BCELCOL (3.12%). Los porcentajes mayores estadísticamente, para esta estirpe epitelial, se encontraron en los grupos que recibieron BCEL (3.66%) y BFMN (5.57%).

En colon, el porcentaje de células enteroendocrinas presentó valores más cercanos entre sí y sin diferencias estadísticas con rango de 1.23 a 2.92% para colon proximal y de 1.07 a 2.61% para colon distal (Gráfico 8).

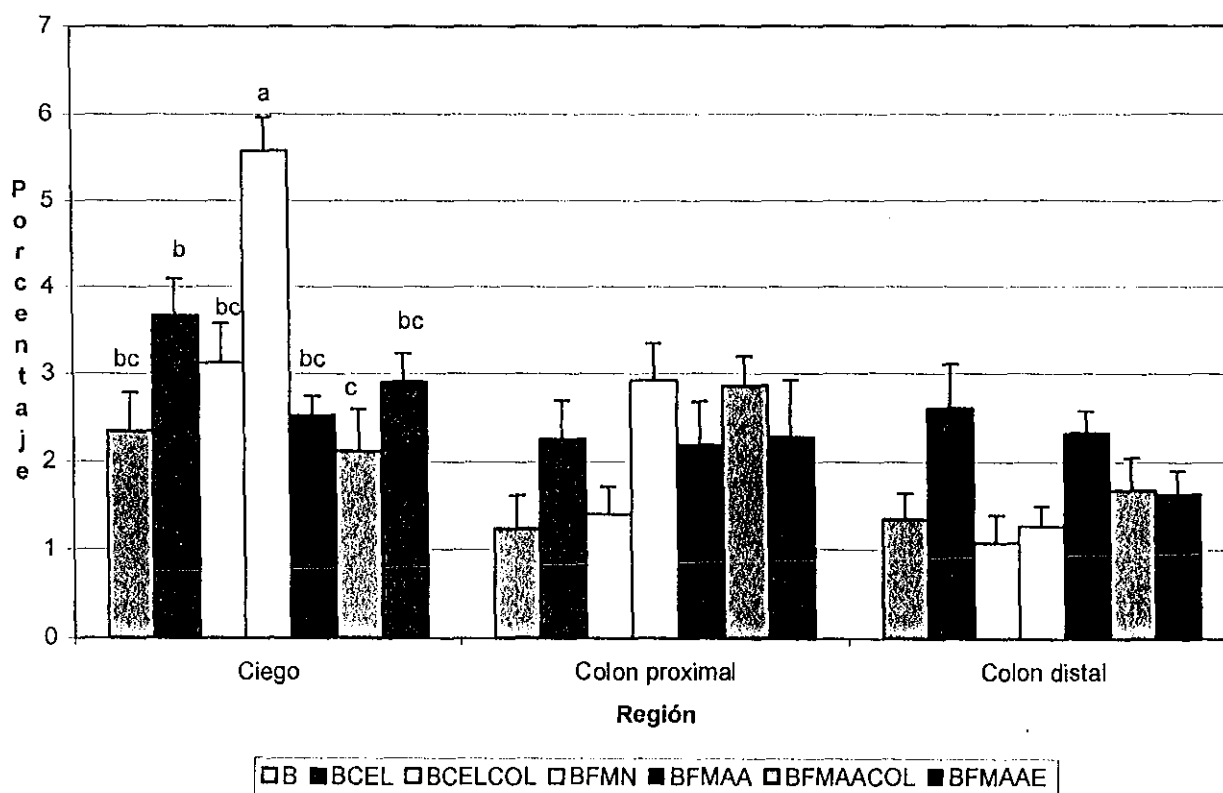


Gráfico 8. Efecto del colesterol y salvado de maíz natural y modificado sobre el porcentaje de células enteroendocrinas en intestino grueso de ratas en crecimiento.

a,b,c indican diferencia estadística entre tratamientos de una misma región intestinal a $p < 0.05$.

Valores = media, error estándar.

Porcentaje de células indiferenciadas

En el tercio inferior o basal de las criptas intestinales se cuantificaron células indiferenciadas, sin que se presentaran diferencias estadísticas por la presencia de fibra o colesterol en la dieta. Los rangos encontrados fueron para ciego de 4.65 a 7.10%, para colon proximal de 6.7 a 8.2% y para colon distal de 4.56 a 6.15% (Gráfico 9).

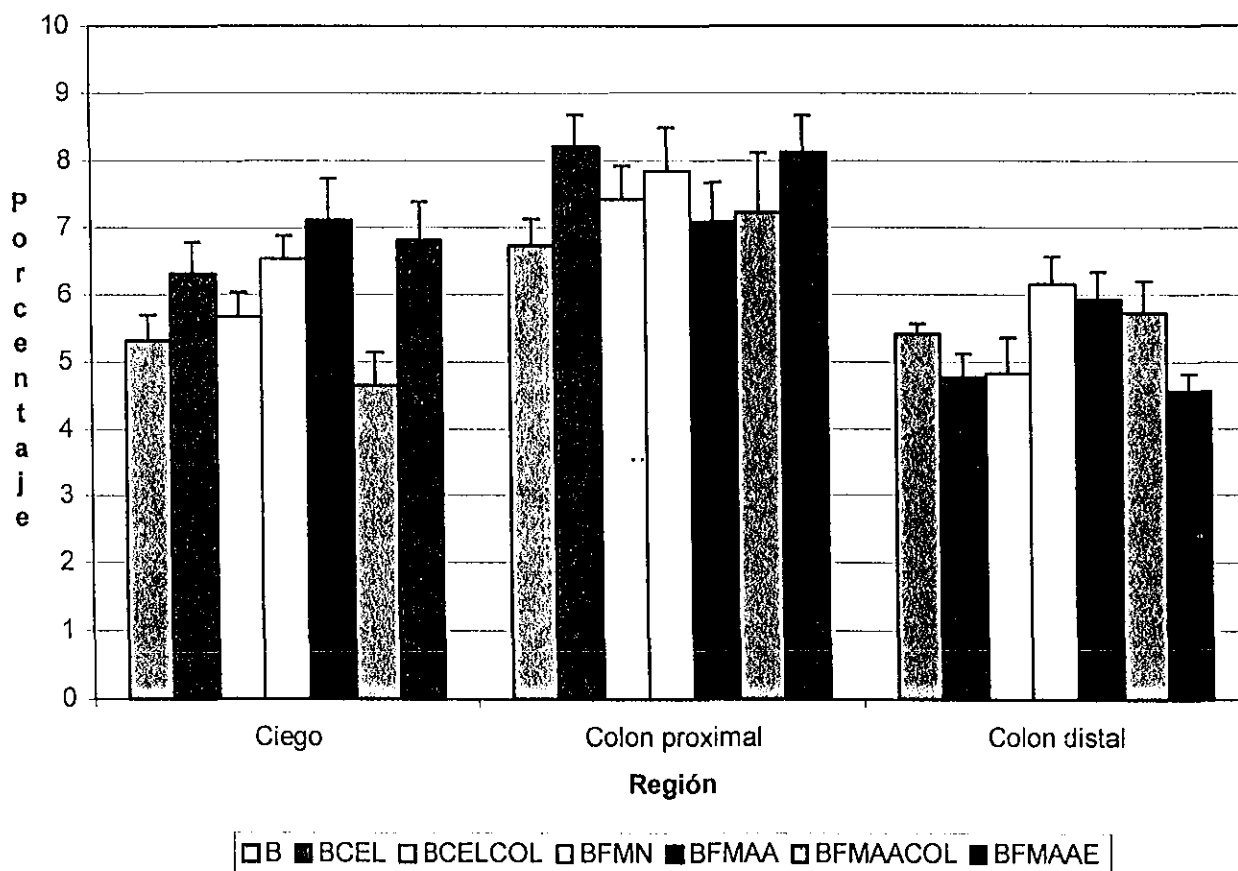


Gráfico 9. Efecto del colesterol y salvado de maíz natural y modificado sobre el porcentaje de células indiferenciadas en intestino grueso de ratas en crecimiento.
Valores = media, error estándar.

ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR (BrdUrd).

En ciego, no hubo diferencias estadísticas en el índice de proliferación celular, los valores tuvieron un rango de 15.14 a 21.74% (Gráfico 10). Las células o núcleos positivos a BrdUrd se observaron en el tercio inferior de las criptas intestinales (Figura 3).

Para colon proximal, el índice de proliferación celular presentó diferencias estadísticas, los grupos B (17.43%) y BCEL (16.61%) tuvieron valores intermedios, índices de proliferación celular menor estadísticamente se presentaron para los grupos BFMN (14.78%), BFMAACOL (13.18%) y BFMAA (12.46%). Los grupos que recibieron celulosa (22.50%) o fibra de maíz ácida alcalina extrusada (23.19%), tuvieron los mayores ($p>0.05$) índices de proliferación (Gráfico 10).

En la figura 4 se puede apreciar la diferencia morfológica de grupos que presentaron un mayor número de núcleos positivos a BrdUrd (BCELCOL), contra aquellas imágenes de núcleos positivos en menor cantidad (BFMAA).

Para esta región, la distribución de núcleos positivos al anticuerpo BrdUrd fue mayor, abarcando la parte basal y media de las criptas intestinales.

Por último, para colon distal se encontraron diferencias estadísticas en el índice de proliferación, el grupo BFMAA presentó el mayor porcentaje de células en etapa de proliferación (21.10%) y diferente significativamente del resto de grupos que tuvieron un rango de 11.31 a 16.25% (Gráfico 10). Para esta sección o región intestinal la distribución de la zona proliferativa fue en la parte media y basal de las criptas intestinales, se muestran dos diferentes ampliaciones para señalar dicha distribución (Figura 5).

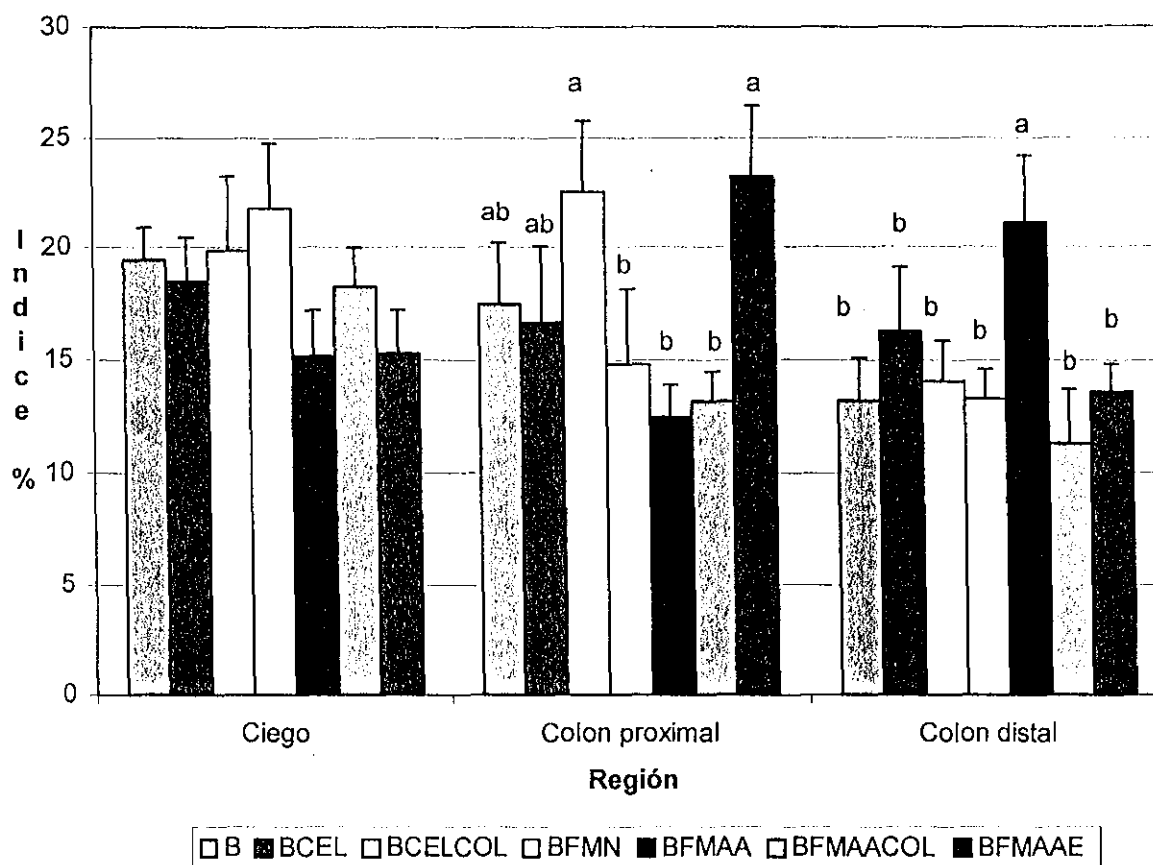


Gráfico 10. Efecto del colesterol y salvado de maíz natural y modificado sobre el índice de proliferación en el epitelio del intestino grueso de ratas en crecimiento.
a,b,c indican diferencia estadística entre tratamientos de una misma región intestinal a $p < 0.05$.
Valores = media, error estándar.

Por otra parte, al analizar el número de núcleos positivos a BrdUrd por cripta, sin relacionarlos con el número total de células, se encontró que:

En ciego, los grupos B (10.09), BFMN (10.63) y BCELCOL (9.62) presentaron los valores mayores estadísticamente, los grupos con números intermedios de células positivas a BrdUrd por cripta fueron BFMAACOL (9.08) y BCEL (8.82). El menor número de núcleos positivos fue para los grupos BFMAAE (7) y BFMAA (6.15) (Gráfico 11).

Para colon proximal, no se encontró diferencia estadística para este parámetro, sin embargo se aprecia que el grupo B (8.11) presentó un número de

núcleos intermedio, ligeramente mayor para los grupos BCEL COL (10.33) y BFMAAE (9.75) (Gráfico 11).

En colon distal, los valores menores fueron para los grupos B (5.4), BFMAACOL (5.7) y BFMN (6), valores intermedios estadísticamente se observaron en los grupos BCEL COL (7.09) y BFMAAE (6.71). El número mayor de núcleos positivo fue para tejidos de ratas que recibieron BCEL (8.45) y BFMAA (10.89) (Gráfico 11).

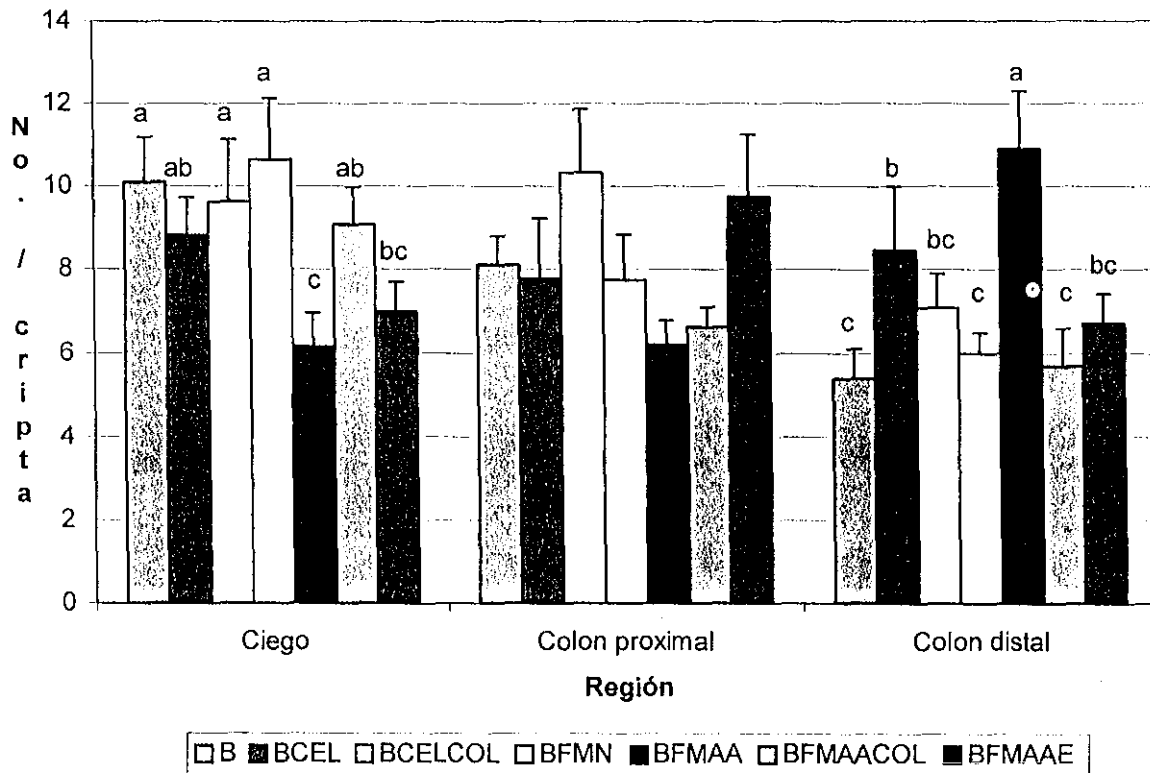


Gráfico 11. Efecto del colesterol y salvado de maíz natural y modificado sobre el número de núcleos epiteliales positivos a BrdUrd por cripta intestinal de ratas en crecimiento.

a,b,c indican diferencia estadística entre tratamientos de una misma región intestinal a $p < 0.05$.

Valores = media, error estándar.

Figura 3. Proliferación epitelial en mucosa cecal. Núcleos positivos (→) a BrdUrd en criptas intestinales (ci) de ciego de ratas que recibieron (3A) celulosa y colesterol (BCELCOL) ó (3B) fibra de maíz ácida alcalina extrusada (BFMAAE). Técnica Inmunohistoquímica BrdUrd, tejido sin teñir.

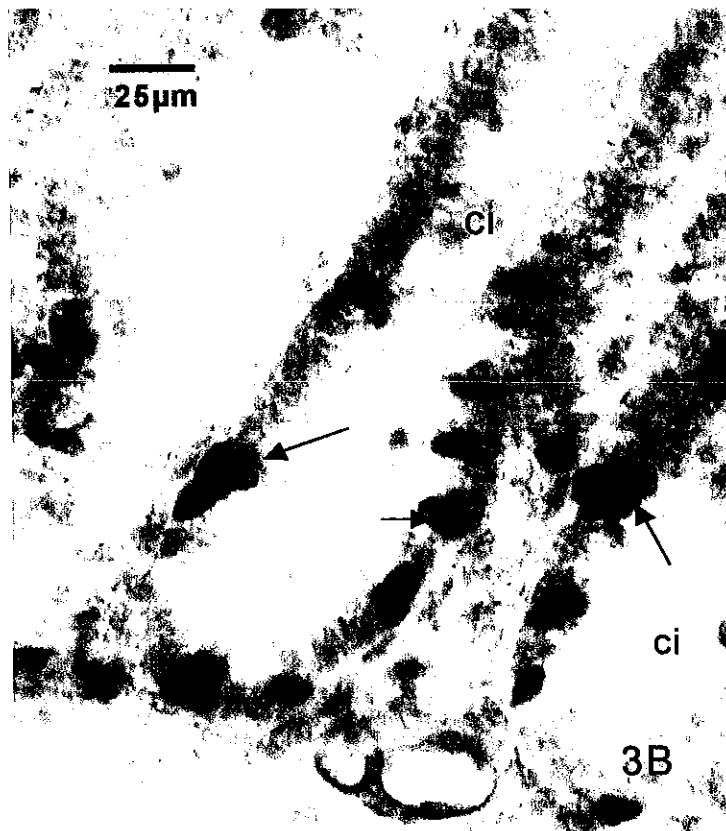
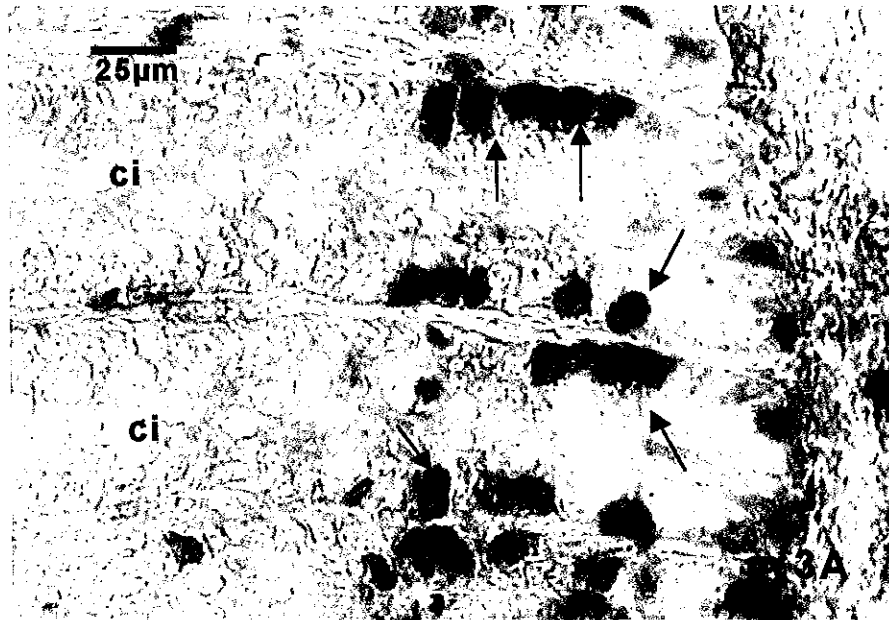


Figura 4. Proliferación epitelial en mucosa de colon. Núcleos positivos (→) a BrdUrd en criptas intestinales (ci) de colon proximal de ratas que recibieron: (4A) celulosa (10%) y colesterol (1%) (BCELCOL) en la dieta y (4B) fibra de maíz ácida alcalina (10%) (BFMAA). Técnica Inmunohistoquímica BrdUrd, tejido sin teñir.

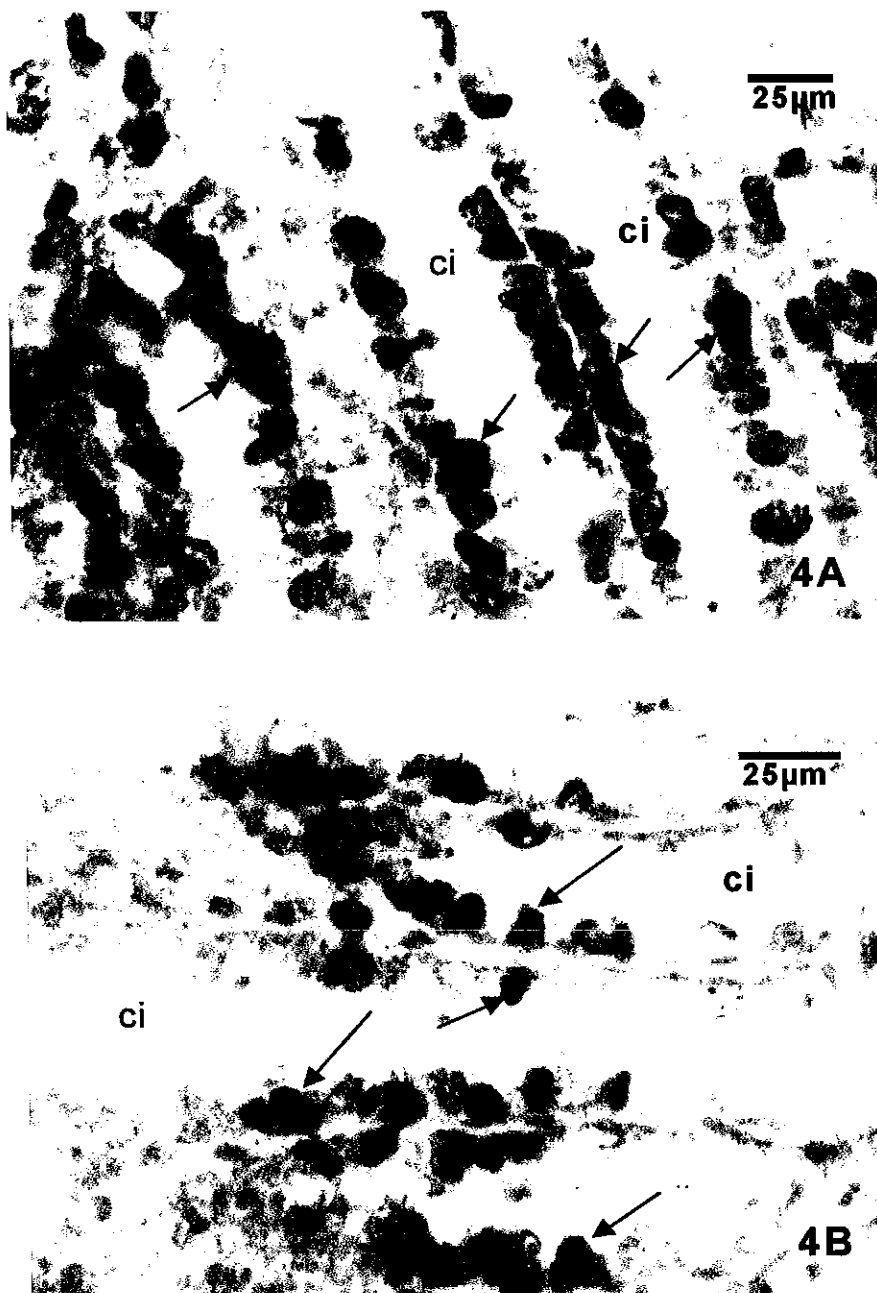
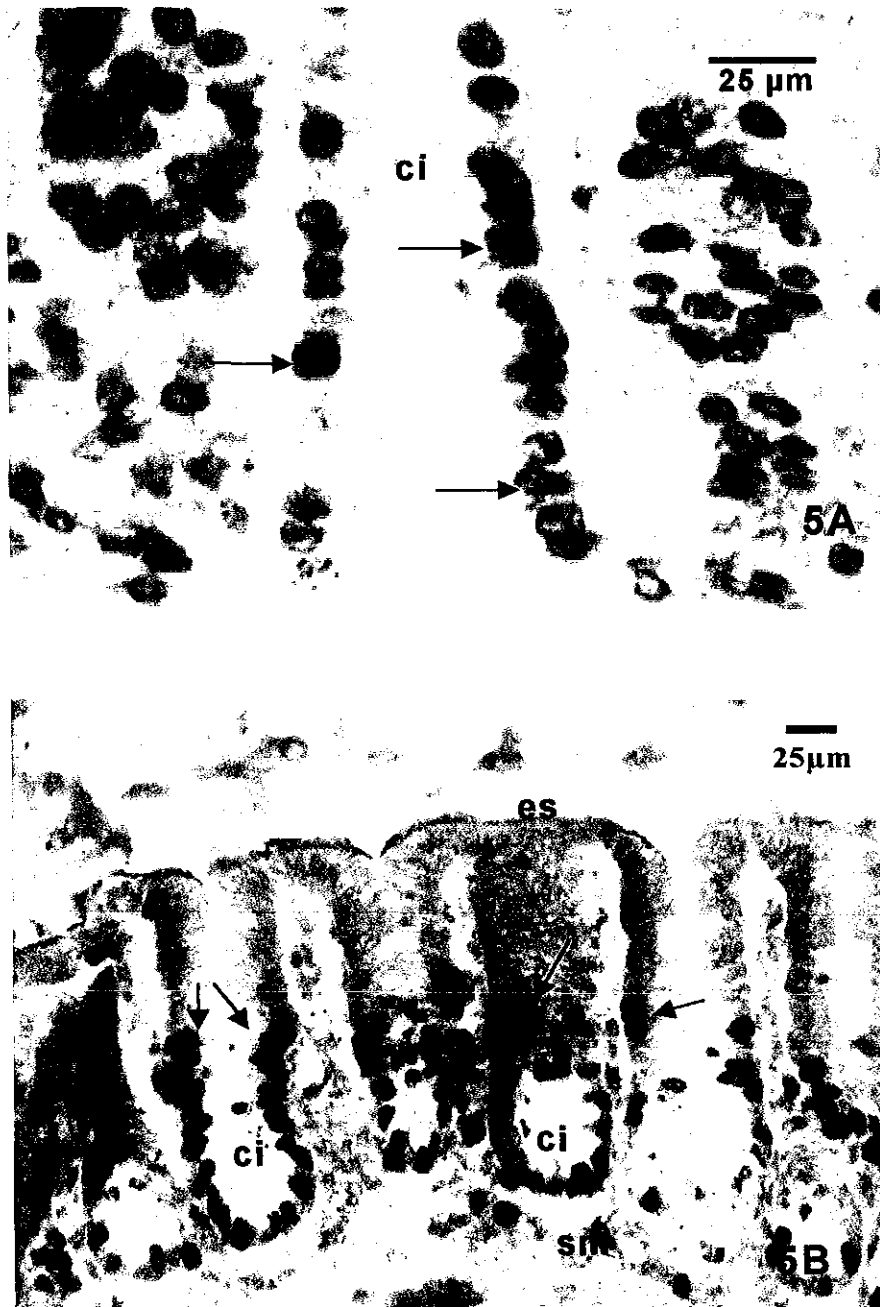


Figura 5. Proliferación epitelial en mucosa de colon. Núcleos positivos (→) a BrdUrd en criptas intestinales (ci) de colon distal de ratas que recibieron: (5A) celulosa (10%) (BCEL) ó (5B) fibra de maíz natural (BFMN), epitelio superficial (es), submucosa (sm). Técnica Inmunohistoquímica BrdUrd, tejido sin teñir.



CÉLULAS EN PROCESO DE MUERTE

Morfológicamente se identificó y semicuantificó las células en proceso de muerte, los valores se expresaron en número por cripta intestinal.

En ciego y colon distal se encontró un mayor número de células en proceso de muerte, y en ambas regiones fueron mayores para las dietas experimentales que para el grupo basal, comportamiento que no se presentó en colon proximal.

En ciego los valores, ordenados ascendentemente, fueron: B (0.12), BFMAA (0.12), BCEL (0.15), BFMN (0.23), BFMAACOL (0.33), BCELCOL (0.36), BFMAAE (0.38). Para colon proximal, el rango fue menor, BCELCOL (0.06), B (0.08), BFMN (0.08), BCEL (0.11), BFMAAE (0.11), BFMAA (0.12) y BFMAACOL (0.12). Para colon distal se encontró B (0.11), BFMAAE (0.14), BFMN (0.15), BFMAA (0.15), BCELCOL (0.26), BCEL (0.33) y BFMAACOL (0.36) (Cuadro 6).

Por lo que respecta a la relación estadística entre las variables proliferación y muerte celular, solo para colon proximal se encontró un coeficiente de correlación ($r^2 = -0.6405$) que permite inferir un vínculo moderado entre estas variables.

CUADRO 6. EFECTO DEL COLESTEROL Y TIPO DE FIBRA DIETETICA SOBRE EL NÚMERO DE CÉLULAS MUERTAS EN EPITELIO DE INTESTINO GRUESO DE RATAS EN CRECIMIENTO.

| TRATAMIENTOS | NO. DE CÉLULAS MUERTAS POR CRIPTA | | |
|--------------|-----------------------------------|------------|--------------|
| | CIEGO | COLON PROX | COLON DISTAL |
| B | 0.12 | 0.08 | 0.11 |
| BCEL | 0.15 | 0.11 | 0.33 |
| BCELCOL | 0.36 | 0.06 | 0.26 |
| BFMN | 0.23 | 0.08 | 0.15 |
| BFMAA | 0.12 | 0.12 | 0.15 |
| BFMAACOL | 0.33 | 0.12 | 0.36 |
| BFMAAE | 0.38 | 0.11 | 0.14 |

ANALISIS DESCRIPTIVO ULTRAESTRUCTURAL

No se observaron cambios significativos en las características generales ultraestructurales de las diversas estirpes celulares por la presencia de niveles elevados de fibra y colesterol en la dieta.

Sin embargo, es necesario mencionar algunas observaciones importantes: en los tejidos intestinales de ratas que recibieron salvado de maíz se encontró una mayor cantidad de moco fuertemente adherido a ciego y colon, una mayor cantidad de microorganismos en lumen y sobre epitelio y mayores espacios intercelulares, principalmente para aquellas ratas que recibieron salvado de maíz modificado o tratado.

CÉLULAS COLUMNARES: se caracterizaron por su forma columnar con núcleo basal y microvellosidades en el borde superior, presentaron diversos aspectos según la zona del revestimiento epitelial analizado, lo cual depende del plano de corte.

En la zona superficial de mucosa se caracterizaron por ser angostas en la base, de dimensiones mayores en la parte apical y alargadas (de 24 x 5.7 μm) (Figura 6 A), para el caso de colon proximal además estas células presentaron vesículas distribuidas uniformemente en el citoplasma apical (Figura 6 B). Se observaron grandes espacios intercelulares laterales en la parte media y basal de las células, mayores en el límite con submucosa y en los grupos experimentales que recibieron 10% de fibra (Figura 6 A y 7 A).

En la zona media de la cripta, presentaron la forma característica con dimensiones aproximadas de 16-18 μm de largo y 7 μm de ancho, en esta sección de la cripta no se distinguen espacios intercelulares (Figura 7 B).

En varias muestras analizadas tanto de ratas alimentadas con dieta basal como aquellas con dietas experimentales se encontraron núcleos segmentados o lobulados, tanto en epitelio superficial como en epitelio de la parte media de criptas (Figura 8 A).

En la parte apical de las células epiteliales se observaron las microvellosidades, se distingue el centro de cada microvellosidad formado por microfilamentos orientados verticalmente, unidos a la membrana plasmática y se extienden al citoplasma apical insertándose en la red terminal, reticulada de microfilamentos horizontales que forman una capa (Figura 8 B).

En las muestras de ratas que recibieron celulosa o salvado de maíz natural y tratado se observó una mayor cantidad de bacterias de tipo bacilo, próximas a las microvellosidades, tanto en epitelio superficial como en los espacios inter criptas, inclusive en algunas muestras dentro de células epiteliales o espacios intercelulares (Figura 7 B, 8 B, 10 A).

CELULAS CALICIFORMES, en proporción representaron la segunda población epitelial, su número aumentó de ciego a colon distal. Se caracterizaron por contar en la parte media y basal de las criptas un estado diferenciado total, evidente por un acúmulo de gránulos en el citoplasma apical, lo cual distiende la mayor parte de la célula, que adquiere la forma típica de gota, tanto el núcleo como otros organelos se desplazan hacia la parte basal de la célula. Las dimensiones promedio para estas células fueron de 16 a 22 μm de largo, 3.5 a 5.0 μm de ancho en la parte basal y de 7.5 a 10 μm en la parte superior (Figura 9 A).

La secreción de mucopolisacáridos por las células caliciformes fue más abundante en las muestras de ratas que recibieron salvado de maíz ácido alcalino o ácido alcalino extrusado, característica que se observó en diversas muestras de dichos grupos experimentales, las criptas presentaron abundante contenido mucopolisacárido (Figura 9 B).

Las microvellosidades son escasas en esta estirpe epitelial y en proceso de secreción se pierden como parte de membrana plasmática para permitir la eliminación del material mucopolisacárido (Figura 9).

CÉLULAS ENTEROENDOCRINAS: En el presente trabajo se localizaron a lo largo del epitelio de ciego y colon 3 tipos morfológicos de células enteroendocrinas.

Células claras: En algunas muestras se presentaron células epiteliales con menor capacidad de contraste (claras) en citoplasma, núcleo central redondo y con pequeñas vesículas claras alrededor del núcleo, en algunas muestras no se observaron las vacuolas (Figura 10 A).

Células enteroendocrinas de gránulos finos, que fueron las más comunes, dichos gránulos con dimensiones de 0.1 a 0.2 μm de diámetro, algunas de estas células se observaron paralelas a las otras estirpes epiteliales, principalmente en la parte basal de las criptas (Figura 10 B).

Estas células también se encontraron en la parte media y superior de las criptas, pero en estas áreas las células enteroendocrinas se localizaron en la parte basal de epitelio. Presentaron núcleo central y gránulos finos alrededor de este, con distribución homogéneamente en el citoplasma (Figura 11 A y 11 B), se observaron escasas microvellosidades.

Un tercer tipo de células enteroendocrinas se identificó por el tipo de gránulos, abundantes y de dimensiones mayores, 0.5-0.6 μm (Figura 12 A), estas células se localizaron preferentemente hacia la zona basal de epitelio, junto a células columnares y caliciformes (Figura 12 B y C), con gránulos redondeados y electrodensos.

CÉLULAS EN PROCESO DE MUERTE; se observaron células en proceso de muerte en la parte apical o superficial de las criptas, con características típicas, de pérdida de material celular incluyendo núcleo y restos de citoplasma (exfoliación del material celular) (Figura 13 A). Sin embargo, en algunas muestras se observaron células muertas en la parte media de la cripta intestinal, con características de célula apoptótica, es decir, cromatina condensada en la periferia de núcleo celular, vesículas en citoplasma y pérdida de límite celular (Figura 13 B), proceso poco común en esta área de las criptas.

Figura 6. Células columnares. Parte apical de criptas (6A), epitelio columnar, donde se distinguen los núcleos (nc) de células columnares (col), grandes espacios intercelulares (➤), mayores en el límite basal de epitelio, así como microvellosidades (→). Colon distal de ratas que recibieron fibra de maíz ácida alcalina y colesterol en la dieta. (6B), células columnares vacuoladas (vc) de colon proximal de ratas que recibieron fibra de maíz ácida alcalina extrusada.

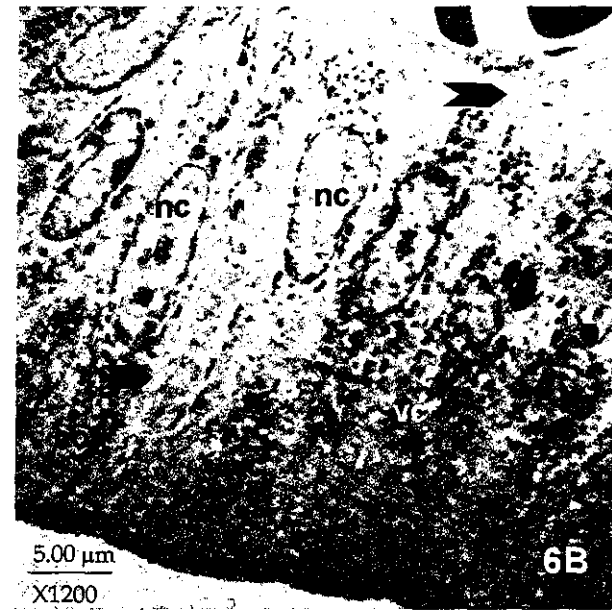
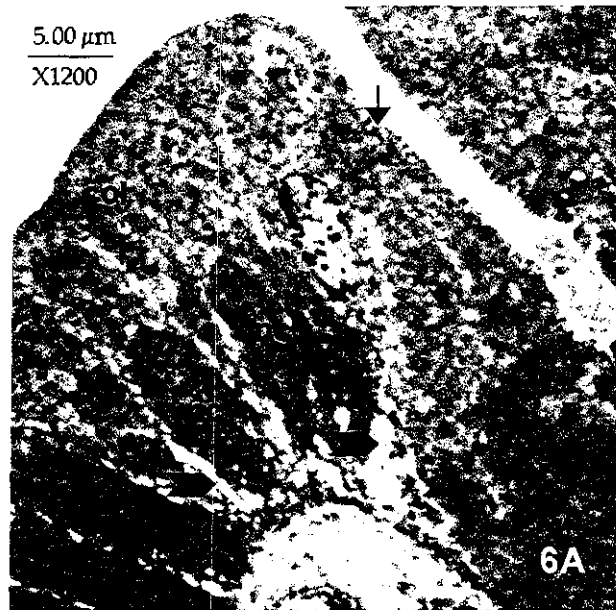


Figura 7. Células columnares. (7A) Parte apical de cripta intestinal, se observan núcleos celulares (nc), microvellosidades (mv) y región basal del epitelio (b). Ciego de ratas que recibieron fibra de maíz ácida alcalina en la dieta. (7B), células columnares (col), de la parte media de cripta, por el plano de corte se observan cortas. En el espacio entre criptas (li), se aprecian microorganismos (mo). Ciego de ratas que recibieron celulosa y colesterol en la dieta.

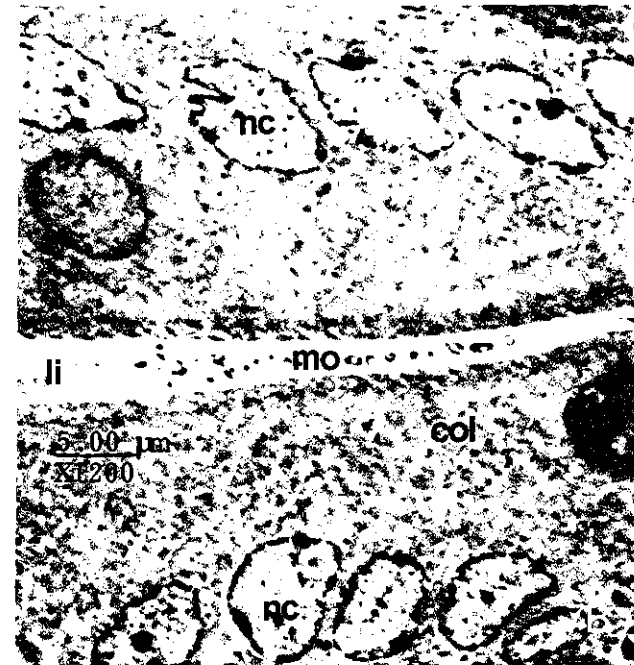
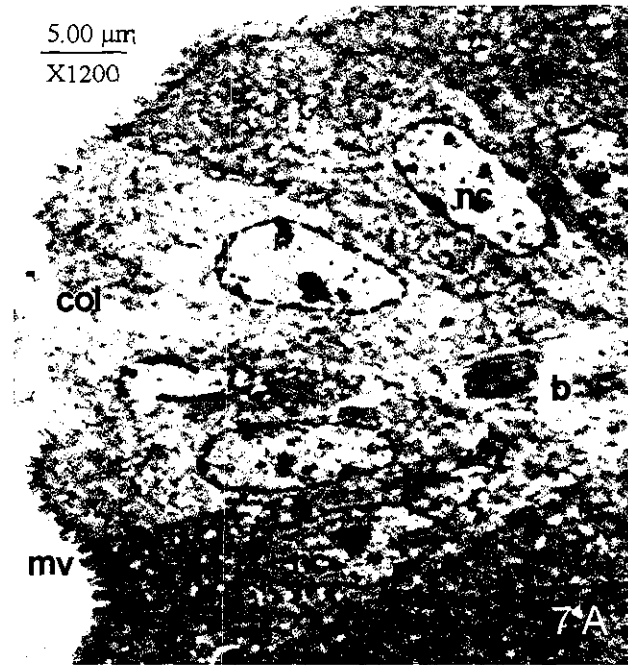


Figura 8. Epitelio columnar. (8A) Núcleo segmentado (ns) en epitelio, área media de cripta de ratas que recibieron celulosa y colesterol en la dieta.

(8B) Detalle de limite celular superior se observan microvellosidades (mv) y estructuras del citoesqueleto (ct), así como microorganismos (mo) en lumen intestinal (li). Colon distal de ratas que recibieron celulosa y colesterol en la dieta.

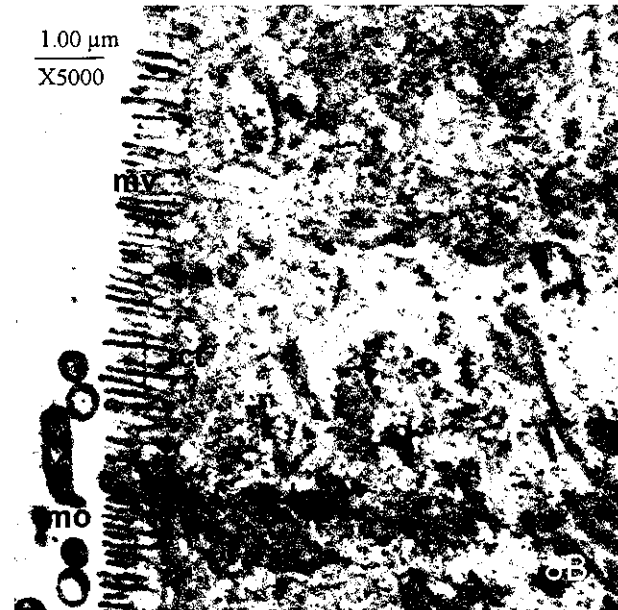
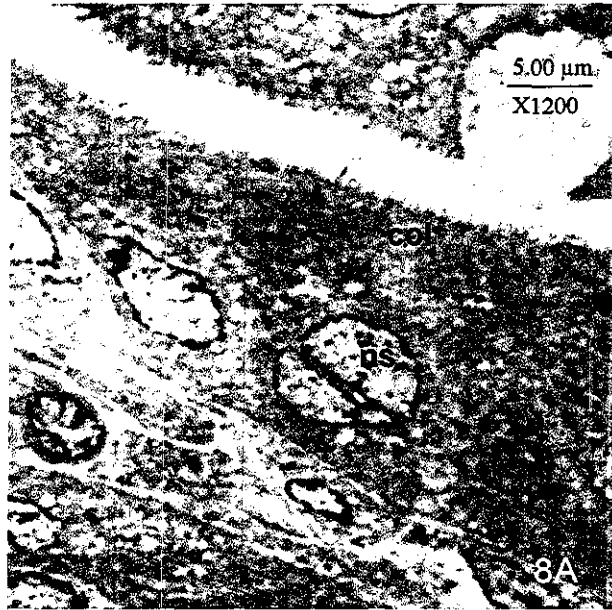


Figura 9. Células caliciformes. Imagen de célula caliciforme (cc) con abundante contenido mucopolisácarido (mp) y liberación de material (←) al lumen intestinal (li), el resto del contenido celular se ubica en la parte basal de la célula, núcleo celular (nc). (9A) Colon distal de ratas que recibieron celulosa y colesterol (BCELCOL), o (9B) fibra de maíz ácida alcalina extrusada (BFMAAE) en la dieta, en este último grupo la liberación de material fue abundante (*).

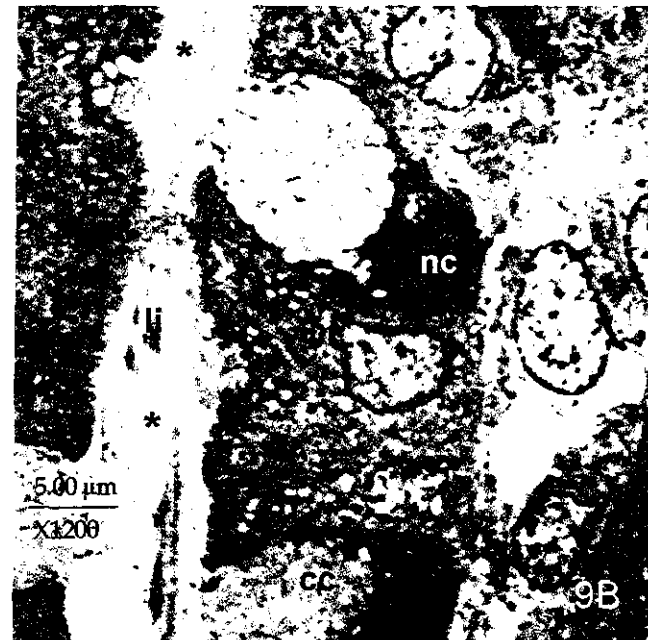
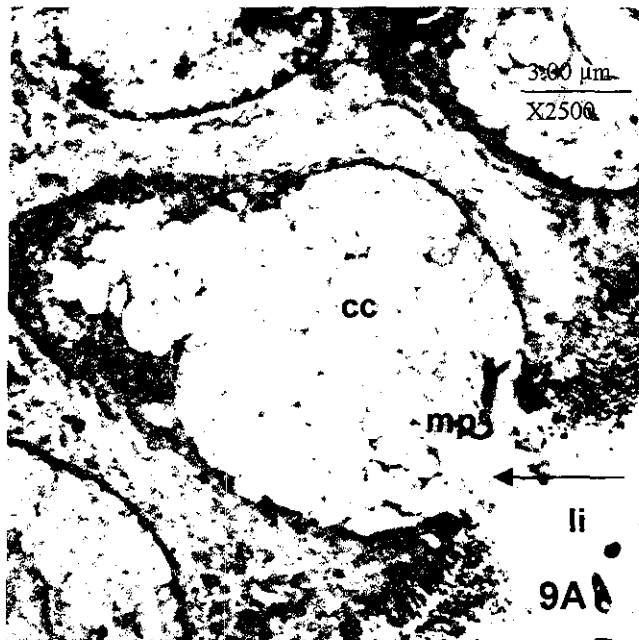


Figura 10. Células enteroendocrinas Parte basal de cripta intestinal, (10A) se observan diversas células epiteliales; caliciformes (cc), y claras (cl); con núcleo central (nc) y citoplasma claro (★). En el lumen intestinal (li) se aprecian microorganismos (↓). Colon distal de ratas que recibieron celulosa y colesterol (BCELCOL). (10B) Area basal de criptas, se observa célula enterocromafin (ce) de gránulos finos (gf), junto a núcleos (nc) de células indiferencias (cin) colon proximal de ratas que recibieron fibra de maíz ácida alcalina extrusada en la dieta.

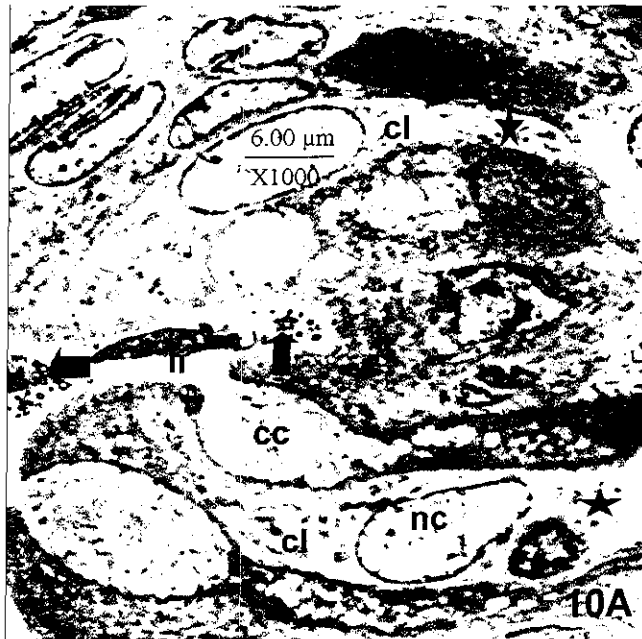


Figura 11. Células enteroendocrinas. Epitelio superficial (11A) se observan a mayor detalle la estructura de células enteroendocrinas (ce) de gránulos finos (gf), colon proximal de ratas que recibieron celulosa (BCEL) en la dieta. (11B) Corte tangencial de epitelio superior de criptas, se observan 3 células enterocromafines (ce) de gránulos finos (→), junto a núcleos (nc) de otras células, colon proximal de ratas que recibieron dieta basal celulosa colesterol (BCELCOL).

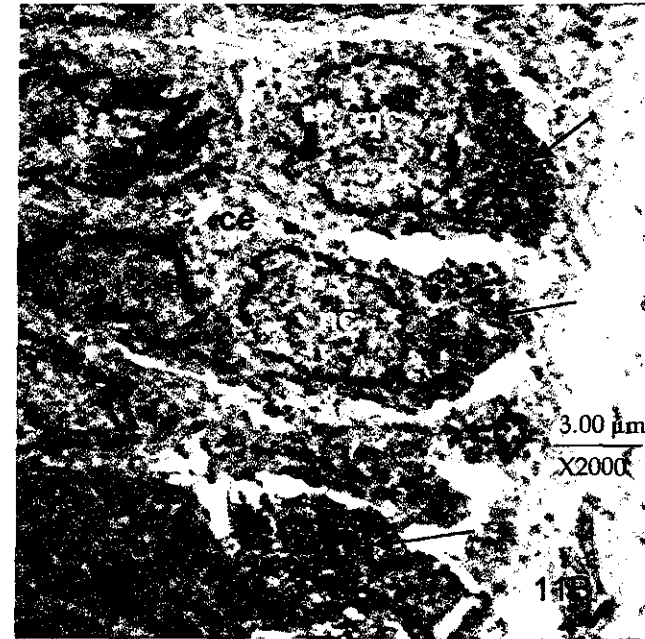


Figura 12. Células enteroendocrinas (ce). Se encontraron en todas las regiones analizadas, principalmente en ciego. En 12A y 12B, se distinguen por sus gránulos (gm) de dimensiones mayores 0.5-0.6 μm , ciego de ratas que recibieron dieta basal. En 12C, epitelio de colon distal de ratas que recibieron BFMAAE, célula enteroendocrina con gránulos grandes al lado de células caliciformes (cc), se observa además espacios que corresponden a lamina propia (lp) y lumen intestinal (li).

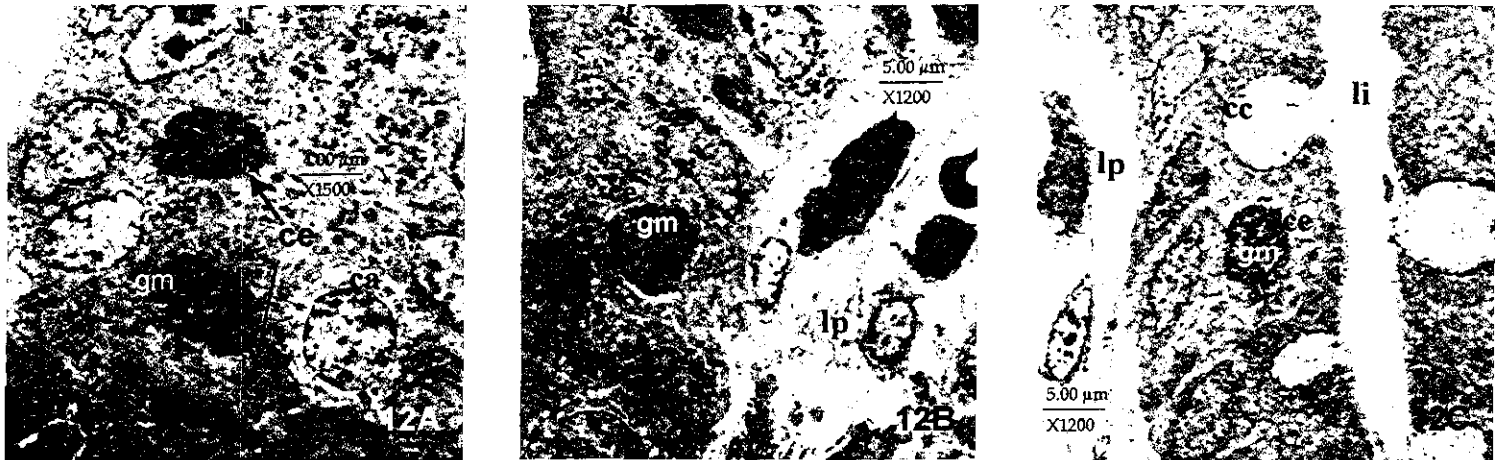
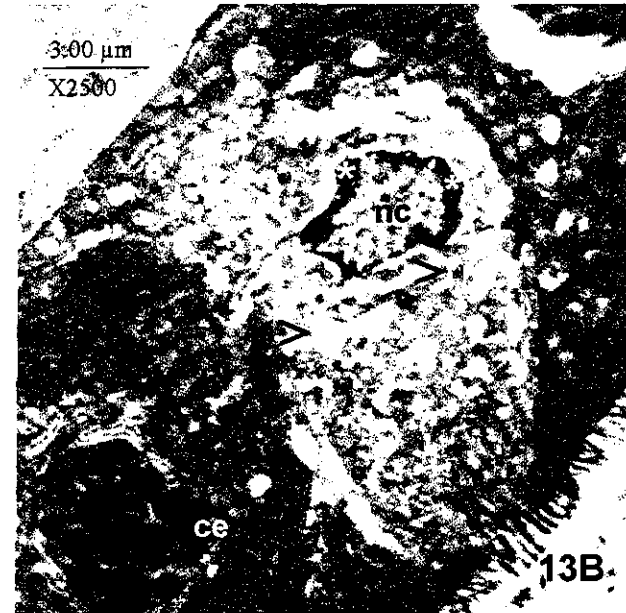
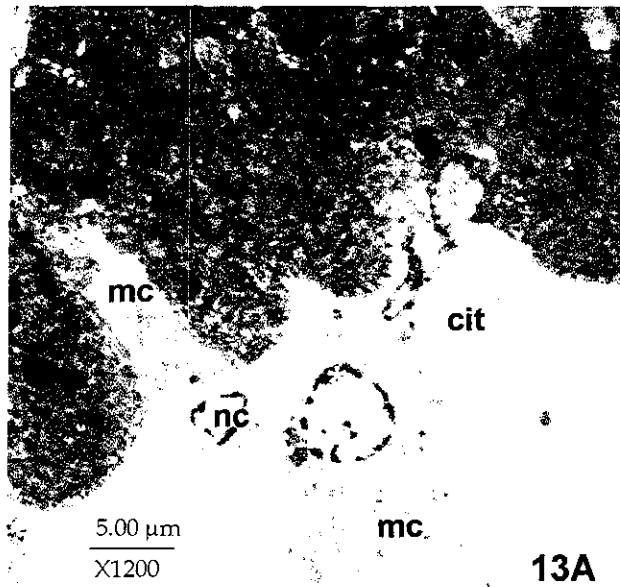


Figura 13. Muerte celular. Se observan (13A) 2 células epiteliales en proceso de exfoliación (**mc**) en la parte superficial de epitelio de ratas que recibieron salvado de maíz natural (BFMN), se distinguen restos de núcleos celulares (**nc**) y contenido citoplasmático (**cit**).

(13B) Muerte celular (**mc**) en epitelio, parte basal de cripta, característica por cromatina periférica (*****), gran cantidad de espacios intracelulares (**>**), se distingue también una célula enteroendocrinas (**ce**). Grupo que recibió celulosa (BCEL) en la dieta.



DISCUSIÓN

PARÁMETROS NUTRICIONALES

En el presente trabajo se utilizó el salvado de maíz tanto natural, como tratado con ácido, álcalis y extrusión, dichos tratamientos permiten aumentar el porcentaje de fibra soluble, hasta un 12 %, y disminuir elementos insolubles (Ning, 1991).

Además, se combinaron niveles elevados de fibra (10%) y colesterol (1%), esto en comparación con los requerimientos para la especie (4-5% de fibra y 0.1% de colesterol) (NRC, 1995), para evaluar el posible efecto sinérgico de ambos elementos (Gallaher et al., 1995; Whiteley et al., 1996) sobre los parámetros estudiados.

En términos generales se observó un aumento del peso corporal y ganancia de peso en los grupos analizados. Sin embargo, a pesar de que las dietas semipurificadas fueron isocalóricas e isoproteicas (Benevenga et al., 1994; NRC, 1995), se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los parámetros nutricionales.

Se observó que los grupos que recibieron fibra (10%) presentaron un menor peso corporal, probablemente debido a un efecto adverso de niveles elevados de fibra en el período de crecimiento de las ratas, algunos autores señalan la relación de la FD con la disminución en la absorción de elementos energéticos, minerales y vitaminas (Schweizer et al., 1991; Anderson et al., 1994; Tinker et al., 1994).

También se establece una disminución en la digestibilidad de la mayoría de nutrimentos cuando se proporciona fibra en la dieta (Bach-Knudsen et al., 1994), la digestibilidad de nutrimentos como proteína, depende además del tipo y cantidad de fibra proporcionada (Sakaguchi et al., 1997). En una prueba de digestibilidad *in vivo* en humanos se encontró que el contenido de energía metabolizable y digestibilidad de proteínas y grasas disminuye por la presencia de fibra (3-7%) (Bear et al., 1997).

Algunos autores encuentran que el período para que la digestibilidad de algunas fibras (celulosa, pectinas y gomas) sea estable, es de 4 a 7 días (Barry et

al., 1995), tiempo suficiente para disminuir la digestibilidad de otros componentes de la dieta y que se pueda reflejar en menor ganancia de peso en un período de 28 días.

Los efectos de la fibra sobre peso corporal y ganancia de peso se han analizado en diversos estudios con resultados contradictorios, probablemente debido a la variedad de fuentes de fibras utilizadas, de dietas (purificadas, convencionales, con diferentes aportes energéticos o protéicos), períodos de análisis y edad de los animales experimentales. Se encuentra además una respuesta diferente, sí la fibra es suministrada a animales convencionales, o con algún daño o patología, por ejemplo de tipo cáncer (Nishina et al., 1990; Anderson et al., 1994; Zoran et al., 1997).

Rao et al. (1996), encontraron menor peso corporal (6-9%) en ratas alimentadas con niveles altos de fibra (9-14%) y lípidos (7-8.5%) a corto plazo (4 semanas). Sin embargo, cuando el estudio se evalúa a las 110 semanas los grupos experimentales presentaron mayor peso corporal (15-20%), que el grupo control (5% grasa, 3.5% fibra), probablemente debido a un proceso de adaptación a la dieta suministrada.

En otro estudio, en ratas (100-125 g) a las que se les suministró una de 5 dietas (control sin fibra, control hiperlipidémica, 3% de fibra de ciruela pasa, 6% de fibra de ciruela pasa o pectina) a libre acceso por 28 días demostró que el promedio de peso corporal final de las ratas no difirió por efecto de las dietas (Tinker et al., 1994).

No se encontró diferencia significativa en el aumento de peso corporal de ratas alimentadas con dietas que contenían el 10% de celulosa, fibra insoluble de algarrobo o goma de algarrobo con 8 o 15% de grasa (Ruiz-Roso et al., 1999).

Por los resultados del presente estudio y con el apoyo de los datos anteriores se establece que las diferentes fibras proporcionadas tuvieron un efecto moderado sobre peso corporal final, atribuyéndole características de fibra insoluble en un período corto de prueba.

Para consumo de alimento, solo los grupos que recibieron el salvado de maíz modificado con ácido-álcali y/o extrusado, tuvieron menor consumo de alimento, probablemente debido a la palatabilidad que le confiere el 10% de fibra a la dieta. Sin embargo, al analizar la conversión alimenticia esta fue más eficiente para aquellas ratas que recibieron el salvado de maíz modificado, ya que requirieron menor cantidad de alimento para lograr la ganancia de peso indicada para cada grupo. Lo anterior, coincide con un trabajo que reporta una conversión adecuada (3.19) para ratas que recibieron niveles elevados de fibra (20% de salvado de trigo), en comparación con animales que no recibieron fibra (conversión 3.73) (Boffa et al., 1992).

Por otra parte, en el presente trabajo se encontró que el peso de intestino grueso fue mayor en aquellos animales que recibieron como fuente de fibra: salvado de maíz ácido-alcálico extrusado, ácido-alcálico y celulosa y colesterol, lo cual coincide con la mayoría de estudios que le confieren a la fibra insoluble, soluble y algunos lípidos la capacidad de aumentar el tamaño y peso de ciego y colon.

En ratas microbiológicamente convencionales se encontró que la dieta con celulosa-grasa induce aumento del volumen tisular en colon. En ratas libres de microorganismos (SPF) el fenómeno se presenta para celulosa, celulosa-grasa y comercial, en comparación con la dieta sin fibra (Whiteley et al., 1996).

Goto et al. (1996), observaron aumento significativo en el peso y longitud de ciego en ratas alimentadas con fibra (7.5 y 15% de goma), a partir de los 10 días de ensayo (duración total 30 días).

Stark et al. (1996) encontraron, que al suministrar a ratas el 15% de celulosa o pectina, aumentó la longitud de intestino delgado y grueso, celulosa solo provocó alargamiento de colon.

El crecimiento del intestino grueso por la presencia de fibra en la dieta no solo se encuentra en ratas (modelo biomédico de mamíferos monogástricos), sino también en otros animales como pollos de engorda (Jorgensen et al., 1996)

La adición de fibras solubles (pectinas, gomas, almidones resistentes) a la dieta aumenta viscosidad, promueven fermentación y producción de ácidos grasos

volátiles en ciego, que tienen un efecto trófico sobre mucosa (Greger, 1999) y permite explicar en parte el aumento de peso, volumen y longitud del intestino grueso.

Para fibras insolubles como salvado de trigo, el aumento en el tamaño del intestino grueso se atribuye a una hiperplasia, se encontró además, aumento en parámetros bioquímicos como contenido de DNA, RNA y proteínas en mucosa (Jacobs et al., 1981). Este aumento en el crecimiento de mucosa correlaciona positivamente con el peso fecal y no con cambios en la fermentación colonica (Whiteley et al., 1996), como ocurre de manera general en las fibras solubles.

En este estudio se encontró un aumento en el peso de hígado de aproximadamente 27% en comparación con aquellas ratas que no recibieron un exceso de colesterol. Este dato coincide con lo reportado en un estudio realizado con ratas, al suministrar una dieta comercial sin colesterol y una experimental alta en colesterol (2%), se observó un 37% de aumento de peso del hígado por efecto de depósito de lípidos (Beynen et al., 1984).

Se establece que el efecto hipocolesterolémico en sangre e hígado depende del tipo de fibra, las de tipo soluble (pectina, psilium, gomas) disminuyen la concentración de colesterol en hígado (probablemente por un aumento en la excreción de esteroides neutros fecales) (Arjmandi et al., 1992a; 1992b; Kritchevsky et al., 1995), y que para psilium esta capacidad no se altera después de 8 meses de almacenado a 40 °C (Arjmandi et al., 1997).

En ratas alimentadas con fibra de betabel, los ácidos grasos volátiles (AGVs) productos de la fermentación cecal, están relacionados posiblemente con la disminución de colesterol sérico y modificación de la síntesis de colesterol hepático, debido a un aumento en la excreción de ácidos biliares (Hara et al., 1999).

Por otro lado, la fibra de tipo insoluble como celulosa y salvados de avena, trigo y maíz no disminuyen el colesterol hepático (Arjmandi et al., 1992a; Arjmandi et al., 1992b; Anderson et al., 1994). El salvado de maíz modificado con tratamientos

químicos y físicos, utilizado en el presente estudio, presentó un mayor contenido de fibra soluble (12%) (Ning et al., 1991). Sin embargo, actuó con características de fibra insoluble para este parámetro.

Con respecto al pH del contenido cecal, se encontró una disminución significativa en las ratas que recibieron salvado de maíz modificado y colesterol, lo cual coincide con trabajos anteriores (Knudsen et al., 1993; Lund et al, 1993), debido probablemente a un patrón diferente de fermentación. La disminución del pH cecal proporciona evidencia indirecta de fermentación y mayor producción de AGVs (Lund et al., 1993).

Se encontró una relación directa entre la presencia de salvado de avena (fibra soluble) y una mayor producción de AGVs, principalmente ácido butírico, con la acidificación del contenido de colon (Zoran et al., 1997), sin embargo, el grado de acidificación depende del tipo de fibra (Folino et al., 1995).

PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS

En la mayoría de parámetros morfométricos se encontró una respuesta regional al tipo de fibra y contenido de colesterol suministrado. En ciego y colon distal se observó, en términos generales, un mayor espesor de mucosa en ratas que recibieron dietas experimentales, en colon proximal el grupo basal presentó el mayor espesor de mucosa, esta respuesta regional se explica por algunos autores como el efecto de diferentes patrones de fermentación y diversas concentraciones de AGVs en ciego, colon proximal y distal.

En ratas jóvenes adultas alimentadas con dietas basales y 8% de pectina o salvado de trigo, se encontró una fermentación regional. La presencia de pectina aumentó la concentración de propionato en colon proximal y distal, y la concentración de acetato en colon proximal. El salvado de trigo favorece la concentración de butirato en ciego, colon proximal y distal. Además se encontraron diferencias en parámetros morfométricos, como profundidad de criptas (Lupton et al., 1993).

Boffa et al. (1992), encontraron que al suministrar 10, 15 y 20% de salvado de trigo en la dieta, el grupo control (sin fibra) presentó hiperproliferación e hipertrofia en colon proximal, los grupos experimentales presentaron el menor número de células por cripta.

Por lo que respecta a profundidad de criptas en ciego y colon proximal, se observaron valores mayores para los grupos experimentales. Sin embargo, no todos fueron estadísticamente diferentes al control. En colon distal el grupo basal presentó un valor intermedio superado solo por celulosa con y sin colesterol y salvado de maíz natural. Hallazgos similares se encuentran en ciego cuando se proporcionan fibras solubles (fructo-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos y gomas 30 g/l), es decir, aumento en la profundidad de criptas, en la zona de proliferación y en el número de células por cripta, mientras que para colon distal la mayor profundidad de criptas fue para el grupo control (Howard et al., 1995)

En ratas que recibieron pectina o salvado de trigo se encontró para ciego y colon proximal una mayor profundidad de criptas y número de células por cripta, sin embargo, en colon proximal no se encontraron diferencias para estos parámetros (Lupton et al., 1993)

En profundidad de criptas no se encontró un efecto importante por la presencia de colesterol. Sin embargo, Qu et al. (1996) observaron que la profundidad de criptas es mayor en ratas alimentadas con exceso de lípidos y que además, influye el tipo de lípidos proporcionados.

Cuantificación y ultraestructura de células epiteliales

Al evaluar el porcentaje de células epiteliales se encontró que para células columnares y caliciformes, el grupo basal presentó valores intermedios en las tres regiones de intestino grueso y sólo se observaron diferencias importantes en colon proximal, esto es; aumento significativo en el porcentaje de células caliciformes, se apreció además una mayor secreción de mucopolisacáridos en tejidos de ratas que recibieron las dietas con salvado de maíz

Independientemente de los tratamientos analizados se aprecia un aumento en la proporción de células caliciformes de ciego a colon distal (Ross et al., 1999).

Poco se conoce sobre los mecanismos que regulan la diferenciación y proliferación de células caliciformes, algunos factores estudiados por diversos autores (referidos en Lundin et al., 1993) son: agentes o nervios colinérgicos, hormonas, factores inflamatorios, lectinas, toxinas bacterianas. Además, se señala a la mucina o secreción mucoprotéica como elemento importante en la protección de la mucosa.

Se ha registrado hiperplasia de células caliciformes en intestino, así como secreción de mucopolisacáridos mayor, durante el proceso de eliminación de nemátodos (McKenzie et al., 1998) o por la presencia de *Echinostoma trivolis* en ratones (Fujino et al., 1996) o con *Trichinella spiralis* (Ishikawa et al., 1997), por lo que atribuyen a esta estirpe epitelial un papel de defensa contra parásitos o agentes irritantes.

La mucina lubricante que se secreta por las células caliciformes contribuye además a la protección intestinal contra cambios o daños mecánicos. Dietas toscas o gruesas, altas en fibra (37%) produjeron aumentos significativos en la capacidad de secreción de mucina debido a un aumento en la longitud de las criptas, de células por cripta y células caliciformes maduras (Schidt-Witting et al., 1996).

En colon aislado y perfundido vascularmente, como modelo, se ha reportado que diferentes polisacáridos de algas, acetato y butirato inducen una mayor secreción de mucina, por lo que se sugiere que algunos constituyentes alimenticios y sus productos de fermentación pueden regular la función secretora de células caliciformes de colon (Barcelo et al., 2000).

Las células columnares fueron las más abundantes y su número disminuye ligeramente de ciego a colon distal (Jub et al., 1993; Ross et al., 1999). A nivel ultraestructural se encontraron en colon, mayores espacios intercelulares en las ratas que recibieron niveles elevados de fibra y colesterol, lo cual coincide con hallazgos realizados por Tamura y Suzuki (1997) en intestino delgado de ratas que recibieron 8% de pectina en la dieta.

Por lo que respecta a las células enteroendocrinas, se encontró un mayor porcentaje en las muestras de ratas que recibieron las dietas experimentales. Sin embargo, solo en ciego hubo diferencias significativas. Porcentajes mayores se registraron para los grupos celulosa y salvado de maíz natural (fibras insolubles típicas).

En base a las características ultraestructurales de los gránulos las células enteroendocrinas encontradas en el presente trabajo, estas son similares a: células D1 (gránulos finos), se desconocen su producto de secreción, células L (gránulos grandes o mayores), secretan enteroglucagon y las células claras, difícil de distinguir sus gránulos semejan a células tipo D, secretoras de somatostatina (Fawcett, 1986).

El suministro de fibra también modifica el tiempo de tránsito en ciego y colon, el volumen y número de pastillas resulta mayor. Por ejemplo, con el consumo de salvado de trigo. Munakata et al. (1995) sugieren que el menor tiempo de tránsito en ciego y colon, el aumento en el volumen fecal y la supresión de absorción de grasas, todos estos elementos participan en el mecanismo de acción inhibitoria del salvado de trigo sobre la carcinogenesis y diverticulosis del intestino grueso.

Dietas altas en grasa y bajas en fibra se han asociado con una incidencia mayor de cáncer de colon, posiblemente por un aumento de la concentración de ácido biliar en colon (Gallaher et al., 1995).

PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR

Las modificaciones en el espesor de mucosa y dimensiones de las criptas se asocian por algunos autores, con cambios o alteraciones de proliferación celular y que dichos cambios dependen de la calidad y cantidad de fibra (Jacobs et al., 1983; Lundin et al., 1993; Jin et al., 1994; Yoshioka et al., 1994). También se ha encontrado la participación de factores no dietéticos en el proceso. Sin embargo, el fenómeno es semejante: factor estimulante, aumento de proliferación celular, modificación de mucosa incluyendo vellosidades y criptas (Ducker et al., 1996).

En el presente trabajo, se encontró un índice de proliferación celular diferente para cada región analizada: en ciego, no se encontraron diferencias estadísticas. Sin embargo, se aprecian valores menores (evidentes en el número de núcleos positivos) o semejantes al basal. En colon proximal, el grupo basal presentó un valor intermedio (17.43%), y para colon distal, los grupos experimentales presentaron valores ligeramente mayores al basal. Los grupos con colesterol presentaron mayor índice de proliferación celular, excepto para colon distal. La información generada al respecto en la literatura es contradictoria, probablemente porque aún no existe la correlación precisa entre la denominación y estructura funcional de la fibra dietética.

Al comparar los valores de proliferación y muerte celular solo se encontró un coeficiente de correlación moderado en colon proximal, que establece una relación negativa entre muerte y proliferación, lo cual probablemente explique los valores semejantes de los grupos experimentales y el basal en algunos de los parámetros estudiados.

Un aumento en el consumo de grasas y disminución de fibra, por períodos cortos de 1-2 semanas, no modifican la tasa de proliferación celular rectal en humanos sanos (Gregoire et al., 1991). El consumo de fibras solubles aumenta de manera modesta el índice de proliferación celular en ciego de ratones y ratas (Howard et al., 1995). La presencia de salvado de trigo (fibra insoluble) produjo una mayor área de proliferación celular en colon de cerdos (Jin et al., 1994).

La presencia de pectina y salvado de avena en ciego presentan una mayor concentración de AGVs, lo cual, correlaciona positivamente con la zona de proliferación celular y el número total de células por cripta. Sin embargo, en colon distal no existe correlación entre la concentración de AGVs y proliferación celular. Por lo que se sugiere que el efecto de la fibra dietética sobre la cinética de colon distal se realiza mediante diferentes mecanismos (Zhang y Lupton, 1994).

Los mecanismos relacionados con proliferación celular son diversos. Sin embargo, en el binomio fibra-intestino grueso, uno de los más importantes es la concentración de ácido butírico y el patrón de fermentación, los procesos que

desencadenan están aún en discusión, ya que existen reportes contradictorios al respecto (Boffa et al., 1992; Edwards et al., 1992)

La mayoría de estudios relacionados con fibra-colon, actualmente, están inmersos en el tema de carcinogenesis, los parámetros que se estudian son: proliferación, diferenciación celular y apoptosis (Hong et al., 1997). Sin embargo, existen resultados contradictorios sobre el efecto de la fibra y colesterol o lípidos sobre estos parámetros. Algunos datos indican que la fibra y lípidos modulan la proliferación celular de colon de manera específica (Lee et al., 1993)

Lo anterior puede ser el resultado de que el termino FD representa un rango amplio de materiales, algunos capaces de proteger contra patologías del TGI, pero algunos otros elementos de la FD pueden inducir o aumentar la carcinogénesis. En general, la experimentación con animales indica que las fibras solubles no protegen sobre dichos padecimientos y sin embargo algunas fomentan carcinogénesis, los mecanismos aun están en discusión (Harris, 1999).

Por otra parte se propone, que el salvado de trigo, en comparación con el salvado de maíz o de avena, disminuye significativamente los niveles de diferentes promotores de tumores (Reddy, 1999). En ratas, esta fibra insoluble disminuye la presencia de criptas aberrantes, un marcador importante utilizado comúnmente para evaluar la eficacia de agentes quimiopreventivos (Earnest et al., 1999). El efecto protector es más evidente cuando en las dietas se reduce en contenido de energía en un 10 o 20% (Kritchevsky, 1999).

Por lo que respecta a diferenciación celular, se ha reportado que tanto las fibras fermentables como no fermentables, reducen la permeabilidad paracelular, específicamente en colon distal, posiblemente como elemento importante de la diferenciación celular, los mecanismos al parecer son diferentes y están en discusión (Mariadason et al., 1999).

Resulta necesario continuar con la búsqueda de los mecanismos involucrados en el efecto de la fibra dietética y lípidos sobre metabolismo y modificaciones a nivel de parámetros morfométricos y fisiológicos del intestino como principales órganos relacionados.

La tendencia actual en la alimentación humana es regresar a los alimentos integrales y naturales (granos, frutas, verduras), ya que estos contienen fotoquímicos que proporcionan una adecuada función del colon, disminuyen las necesidades de defensas oxidativas y modifican de manera benéfica las lipoproteínas (Bruce et al., 2000).

Resulta necesario continuar con un estudio citoquímico e inmunohistoquímico sobre las diversas estirpes epiteliales (caliciformes, enteroendocrinas y de Paneth) y apoptosis, para complementar la información sobre el efecto del salvado de maíz natural y modificado en el proceso de proliferación, diferenciación y muerte epitelial

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES EXPERIMENTALES

1.- La inclusión del 10% de fibra en la dieta disminuye la ganancia de peso de ratas en crecimiento.

2.- La eficiencia alimenticia fue menor en ratas que recibieron salvado de maíz natural o celulosa. La conversión alimenticia fue más adecuada para el grupo basal fibra de maíz ácida alcalina

3.- El nivel elevado de colesterol (1%), en la dieta de ratas en crecimiento, aumenta un 27% el peso de hígado por acúmulo de lípidos, independientemente de la presencia de fibra.

4.- El pH del contenido cecal fue cercano al neutro, siendo mayor para el grupo Basal (7.17) y ligeramente ácido en los grupos que recibieron fibra de maíz ácida alcalina (6.54, 6.63).

5.- El consumo de celulosa o salvado de maíz ácido alcalino a niveles elevados, independientemente de la presencia de colesterol, produjo un aumento en el peso del intestino grueso

6.- En ciego y colon distal, se encontró un aumento en el espesor de mucosa y profundidad de criptas en la mayoría de grupos experimentales

7.- En colon proximal el porcentaje de células caliciformes y columnares presentó diferencias estadísticas, el grupo basal tuvo valores intermedios.

8.- En ciego se encontró un aumento en el número de células enteroendocrinas, principalmente en ratas que recibieron salvado de maíz natural y celulosa en la dieta.

9.- El índice de proliferación celular fue mayor en ratas que consumieron celulosa y salvado de maíz ácido alcalino extrusado en colon proximal, y salvado ácido alcalino para colon distal.

10.- El número de células en proceso de muerte fueron ligeramente menores para el grupo basal en ciego y colon distal, y semejantes al basal en colon proximal.

11.- Al comparar los valores de proliferación y muerte celular solo se encontró moderada correlación negativa en colon proximal

12.- El análisis descriptivo ultraestructural de las células epiteliales no muestra diferencias importantes por la presencia de fibra y colesterol en la dieta.

CONCLUSIONES GENERALES

- 1.- Las ratas que recibieron niveles elevados de fibra en la dieta, tuvieron menor ganancia de peso, sin embargo la conversión alimenticia fue adecuada.

- 2.- La presencia de fibra de maíz ácida-alcalina, independientemente del colesterol, aumentó el peso de intestino grueso, dato que coincide con valores mayores en espesor de mucosa y profundidad de criptas en ciego y colon distal, así como con pérdida de la correlación entre proliferación y muerte celular.

- 3.- El peso de hígado aumentó significativamente por la inclusión del 1% de colesterol en la dieta, sin que la presencia de fibra de maíz ácida alcalina disminuyera la acumulación de lípidos.

- 4.- El salvado de maíz modificado con tratamientos ácido, alcalino y extrusión presentó efectos de fibra dietética de tipo insoluble.

REFERENCIAS

AFIP. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Métodos Histotecnológicos. Editado por Edna B. Propnet, Bob Mills, Jacquelyn B. Arrington, Leslie H Sobin. Versión en Castellano editada y traducida por Clara S. Haffess, Forabel G. Mullick. 1995;253.

Aguilar-Nascimento JE, García A, De Lima SA, Pereira AC. Effect of an elemental diet on the mechanical resistance and morphology of the colon in rats. *Nutrition* 1998;14:287.

Albarrán RE, González HM, Martínez LE, Villa RP. Estudio descriptivo y semicuantitativo de las modificaciones del intestino grueso por efecto de los componentes de la dieta. *Memorias del XI Encuentro de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina U.A.N.L. Octubre 1993;29*

Albarrán RE, González HM, García RP. Efecto de los componentes de la dieta sobre la morfología del intestino delgado. Estudio semicuantitativo. *Memorias del XII Encuentro de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina U.A.N.L. Octubre 1994;199*

Anderson JW, Jones AE, Mason SR. Ten different dietary fibers have significantly different effects on serum and liver lipids of cholesterol-fed rats. *J. Nutr.* 1994;124:78.

Aranbulo PV. Veterinary Public Health: perspectives at the threshold of the 21st century. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1991;11:255.

Arjmandi BH, Ahn J, Nathani S, Reeves RD. Dietary soluble fiber and cholesterol affect serum cholesterol concentration, hepatic portal venous short-chain fatty acid concentrations and fecal sterol excretion in rats. *J. Nutr.* 1992a;122:246.

Arjmandi BH, Craig J, Nathani S, Reeves RD. Soluble dietary fiber cholesterol influence in vivo hepatic and intestinal cholesterol biosynthesis in rats. *J. Nutr.* 1992b;122:1559.

Arjmandi BH, Sohn E, Juma S, Murthy SR, Daggy BP. Native and partially hydrolyzed psyllium have comparable effects on cholesterol metabolism in rats. *J Nutr.* 1997;127:463.

Armstrong PV. Epidemiología del cáncer en China. *Foro Mundial de la Salud.* 1982;3:108.

Asp NG, Furda I, DeVries JW, Schweizer TF, Prosky L. Dietary fiber definition and analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 1988;47:688.

Bach Knudsen KE, Wisker E, Daniel M, Feldheim W, Eggum BO. Digestibility of energy, protein, fat and polysaccharides in mixed diets: comparative studies between man and the rat. *Br. J. Nutr.* 1994;71:471.

Barcelo A, Claustre J, Moro F, Chayvialle JA, Cuber JC, Plaisancie P. Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut* 2000;46:218.

Barry JL, Hoebler C, Macfarlane GT, Macfarlane S, Mathers JC, Reed KA, Mortensen PB, Nordgaard I, Rowland IR, Rumney CJ. Stimulation of the fermentability of dietary fibre in vitro: a European interlaboratory study. *Br. J. Nutr.* 1995;74:303.

Bear DJ, Rumpler WV, Miles CW, Fahey GCJr. Dietary fiber decreases the metabolizable energy content and nutrient digestibility of mixed diets fed to humans. *J. Nutr.* 1997;127:579.

Benevenga N.J, Gahl MJ, Crenshaw TD, Finke MD. Protein and amino acid requirements for maintenance and amino acid requirements for growth of laboratory rats. *J. Nutr.* 1994;124:451.

Beynen AC, Boogaard A, Van Laack HLJM, Katan MB. Cholesterol metabolism in two strains of rats with high or low response of serum cholesterol to a cholesterol-rich diet. *J. Nutr.* 1984;114:1640.

Bremner AS. *Veterinary Public Health. Vet. Rec.* 1997;141:452.

Bivin SW, Crawford PM, Brevier RN. Chapter 4. Morphophysiology In: *The laboratory rat.* Edited by Henry J Baker, J Russell Lindsey S, Steven H. Wesbroth. Academic Press. New York 1979;79.

Boffa LC, Lupton JR, Mariani MR, Ceppi M, Newmark HL, Scalmati A, Lipkin M. Modulation of colonic epithelial cell proliferation, histone acetylation, and luminal short chain fatty acids by variation of dietary fiber (wheat bran) in rats. *Cancer Research* 1992;52:5906.

Bright-See E, McKeown-Eyssen GE. Estimation of per capita crude and dietary fiber supply in 38 countries. *Am. J. Clin. Nutr.* 1984;39: 821.

Bruce B, Spiller GA, Klevay LM, Gallagher SK. A diet high in whole and unrefined foods favorably alters lipids, antioxidant defenses, and colon function. *J Am. Coll. Nutr.* 2000;19:61.

Burnstein MJ. Dietary factors related to colorectal neoplasms. *Surg. Clin. North. Am.* 1993;73:13.

Casas R, Rosenberg FJ, Astudillo VM. Relationships between animal production, animal health and veterinary public health in America Latina and The Caribbean. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1991;10:1087.

Cassidy MM, Lightfoot GF, Grau EI, Story JA, Kritchevsky D, Vahouny VG. Effect of chronic intake of dietary fibers on the ultrastructural topography of rat jejunum and colon: a scanning electron microscopy study. *Amer. J. Clin. Nutr.* 1981;34:218.

Chávez A, De Chávez MM, Roldan JA, Bermejo S, Ávila A. Cambios dietéticos en México y su relación con las enfermedades crónico degenerativas. IV Simposio Internacional sobre fibra dietética. Cd. de México. 1993;7.

Chercut C, Aube AC, Mekki N, Dubois C, Lairon D, Berry JL. Digestive and metabolic effects of potato and maize fibres in human subjects. *Br. J. Nutr.* 1997;77:33.

Compher CW, Frankel WL, Tazelaar J, Lawson JA, McKinney S, Segall S, Kinosian BP, Williams NN, Rombeau JL. Wheat bran decreases aberrant crypt foci, preserves normal proliferation, and increases intraluminal butyrate levels in experimental colon cancer. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 1999;23:269.

Davies NT. The effect of dietary fiber on mineral availability. *J. Plant. Food* 1978;3:113.

Dawwes JC. Biological techniques in electron microscopy. Barnes & Noble Inc. New York 1971;15.

Desrosier NW. Elementos de tecnología de los alimentos. Ed CECOSA. Mexico. 1991;42.

Dobson MJ. The merits of comparative oncology. Vol 4. Veterinary science and growth points an comparative medicine. Edited Michell A.R. CAB International 1993;78.

Drucker JD, Ehrlich P, Asa SL, Brubaker. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide. Proc. Nat. Acad. Sci. 1996;93:7911.

Earnest DL, Einspahr JG, Albert's DS. Protective role of wheat bran fiber: data from marker trials. Am. J. Med. 1999;106(1 A): 32S.

Edwards CA, Wilson RG, Hanlon L, Eastwood MA. Effect of the dietary fibre content of life long diet on colonic cellular proliferation in rat. Gut 1992;33:1076.

Fairweather-Tait SJ, Wright AJ. The effect of sugar-beet fibre and wheat bran on iron and zinc absorption in rats. Br. J. Nutr. 1990;64: 547.

Fawcett WD. Bloom and Fawcett a textbook of histology. Eleventh ed. Ed. WB Saunders Company Toronto. 1986;660.

Fennema RO. Química de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. 1993;137.

Freeman JH. Dietary fibre and cancer. In: CRC handbook dietary fiber in human nutrition. Gene A. Spiller 2th edition. 1993;477.

Folino M, McIntyre A, Young GP. Dietary fibers differ in their effects on large bowel epithelial proliferation and fecal fermentation-dependent events in rats. J. Nutr. 1995;125:1521.

Fujino T, Fried B, Ichikawa H, Tada I. Rapid expulsion of the intestinal trematodes *Echinostoma trivolis* and *E. caproni* from C3H mice by trapping with increased goblet cell mucins. J. Parasitology 1996;26:319.

Gallaher DD, Chen CL. Beef tallow, but not corn bran or soybean polysaccharide, reduces large intestinal and fecal bile acid concentrations in rats. Nutr. Cancer 1995;23:63.

Geneser-Finn. Histología. 2da ed. Ed. Medica Panamericana. Buenos Aires. 1993;380.

González HM, Albarrán RE, Villa RP. Nutritional properties of processed dietary fiber. Memorias del Congreso Internacional de Bioquímica y Biología Molecular. Nueva Delhi, India. 1994a.

González HM, Campollo O, Albarrán RE. Efectos fisiológicos y metabólicos de la fibra de maíz modificada. Rev. Gastroenterol. Méx. 1994b;59:78s.

Gordon DT, Besch-Williford C, Eilersieck MR. The action of cellulose on the intestinal mucosa and element absorption by the rat. J. Nutr. 1983;113:2545.

Goto H, Kanamori S, Hayakawa T, Sugiyama S, Ozawa T. Effects of dietary fiber on prostanoic acid concentration in cecal mucosa of rats. Biochem. Mol. Biol. Int. 1996;38:437.

Greger JL. Non-digestible carbohydrates and mineral bioavailability. J. Nutr. 1999;29:1434S.

Gregoire R, Yeung KS, Stadler J, Stern HS, Kashtan H, Neil G, Bruce WR. Effect of high-fat and low fiber meals on the cell proliferation activity of colorectal mucosa. Nutr. Cancer 1991;15:21.

Hamilton PW, Williamson KE, Grimes J, Arthur K, Wilson RM. Three-dimensional computerized analysis of epithelial cell proliferation in the gastrointestinal tract. Br. J. Cancer 1994;69:1027.

Hara H, Haga S, Aoyama Y, Kiriya S. Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. J. Nutr. 1999;129:5942.

Harris PJ, Ferguson LR. Dietary fibres may protect or enhance carcinogenesis. Mutant. Res. 1999;443:1, 95.

Hold RJ, Gregory JD. Organization of veterinary public health in the United States of America and Canada. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 1992;11:147.

Hong MY, Chang WC, Chapkin RS, Lupton JR. Relationship among colonocyte proliferation, differentiation, and apoptosis as a function of diet and carcinogen. Nutr. Cancer 1997;28:20.

Howard MD, Gordon DT, Garleb KA, Kerley MS. Dietary fructooligosaccharide, xylooligosaccharide and gum arabic have variable effects on

cecal and colonic microbiota and epithelial cell proliferation in mice and rats. *J. Nutr.* 1995;125:2604.

Howard-Jones N. El código ético del COICM sobre los experimentos con animales. *Crónica de la OMS.* 1985;39:55.

Ishido T, Itabashi M, Ochiai A, Hirota T, Yokota T, Saito D. Morphometric analysis of colorectal dysplasia with image processing. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1994;118:619.

Ishikawa N, Wakelin D, Mahida YR. Role of T helper 2 cells in intestinal goblet cell hyperplasia in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology* 1997;113:549.

Jacobs LR, Schneeman BO. Effect of dietary wheat bran on rat colonic structure and mucosal cell growth. *J. Nutr.* 1981;111: 789.

Jacobs LR. Effects of dietary fiber on mucosal growth and cell proliferation in the small intestine of the rat: a comparison of oat bran, pectin, and guar with total fiber deprivation. *Am. J. Clin. Nutr.* 1983;37:954.

Jenkins PA, Thompson HPR. Mechanisms of small intestinal adaptation. *Dig. Dis.* 1994;12:15.

Jiang YH, Lupton JR, Chang WC, Jolly CA, Aukema HM, Chapkin RS. Dietary fat and fiber differentially alter intracellular second messengers during tumor development in rat colon. *Carcinogenesis* 1996;17:1227.

Jin L, Reynolds LP, Redmer DA, Caton JS, Crenshaw JD. Effects of dietary fiber on intestinal growth, cell proliferation and morphology in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 1994;72:2270.

Jorgensen H, Zhao XQ, Knudsen KE, Eggum BO. The influence of dietary fiber source and level on the development of the gastrointestinal tract, digestibility and energy metabolism in broiler chickens. *Br. J. Nutr.* 1996;75:379.

Jub KVF, Kennedy CP, Palmer N (editors). *Pathology of domestic animals.* 4th ed. Ed. Academic Press Inc. San Diego. 1993;74.

Junqueira CL, Carneir J. *Histología Básica.* 4ta ed. Ed. MASSON S.A. Mexico. 1996;271.

Kaplan MM, Bogel K. Historical perspective of the origins and development of international veterinary public health in the world health organization. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1991;10:915.

Khokhar S, Kapoor AC. Effect of dietary fibres on bioavailability of vitamin A and thiamine. *Plant. Food Human Nutr.* 1990;40:259.

Knudsen KEB, Jensen BB, Hansen I. Oat bran but not a beta-glucan-enriched oat fraction enhances butyrate production in the large intestine of pigs. *J. Nutr.* 1993;123:1235.

Konishi F, Oku T, Hosoya N. Hypertrophic effect of unavailable carbohydrate on cecum and colon in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1984;30: 373.

Koruda MJ, Hill C. Dietary fiber and gastrointestinal disease. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1993;177:209.

Kritchevsky D. The role of dietary fiber in health and disease. *J. Environ. Pathol. Oncol.* 1986;6:273.

Kritchevsky D, Tepper SA, Klurfeld DM. Influence of psyllium preparations on plasma and liver lipids of cholesterol-fed rats. *Artery* 1995;21:303.

Kritchevsky D. Protective role of wheat bran fiber: preclinical data. *Am. J. Med.* 1999;106:28s.

Lee DY, Chaokin RS, Lupton JR. Dietary fat and fiber modulate colonic cell proliferation in an interactive site-specific manner. *Nutr. Cancer* 1993;20:107.

Lipkin M. Biomarkers of increased susceptibility to gastrointestinal cancer: new application to studies of cancer prevention in human subjects. *Cancer Res.* 1988;48:235.

Lipski PS, Bennett MK, Kelly PJ, James OF. Ageing and duodenal morphology. *J. Clin. Pathol.* 1992;45:450.

Lund KE, Salf LK, Johnson TI. Baked rye products modify cholesterol metabolism and crypt cell proliferation in rats. *J. Nutr.* 1993;123:1834.

Lundin E, Zhang JX, Huang CB, Reuterving CO, Hallmans G. Oat bran, rye bran, and soybean hull increase goblet cell volume density in the small intestine of the golden hamster. A histochemical and stereologic High-microscopic study. *Scand. J. Gastroenterol* 1993;28:15.

Lupton JR, Kurtz PP. Relationship of colonic luminal short-chain fatty acids and pH to in vivo cell proliferation in rats. *J. Nutr.* 1993;123:1522.

Madrigal HF, Chávez A, Moreno-Terrazas O, García TB, Gutiérrez GV. Food intake and nutritional status of rural Mexican population. *Rev. Invest. Clin.* 1986;39: 9.

Mariadason JM, Catto-Smith A, Gibson PR. Modulation in distal colonic epithelial barrier function by dietary fibre in normal rats. *Gut* 1999;44:394.

McKenzie GJ, Bancroft A, Grecis RK, McKenzie AN. A distinct role for interleukin-13 in th2-cell-mediated immune responses. *Current Biology* 1988;8:339.

Menard D, Dagenais P, Colvert R. Morphological changes and cellular proliferation in mouse colon during fetal and postnatal development. *Anat. Record.* 1994;238:349.

Moore RL, Koornegay ET, Grayson RL, Lindermann MD. Growth, nutrient utilization and intestinal morphology of pigs fed high-fiber diets. *J. Anim. Sci.* 1988;66:1570.

Morikawa Y, Miyamoto M, Okada T. Perinatal development of Brunner's glands in the rat morphometrical study. *Biol. Neonate* 1993;63:258.

Mueller MA, Cleary MP, Kritchevsky D. Influence of dietary fiber on lipid metabolism in meal-fed rats. *J. Nutr.* 1983;113:2229.

Munakata A, Iwane S, Todate M, Nahaji S, Sugawara K. Effects of dietary fiber on gastrointestinal transit time, fecal properties and fat absorption in rats. *Tonoru J. Exper. Med.* 1995;176:227.

NRC. National Research Council. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. 1999;2, 12.

NRC. National Research Council. National Academy Press. Nutrient requirements of laboratory animals. Fourth Revised Edition. 1995;12.

Ning L, Villota R, Artz WE. Modification of corn fiber through chemical treatments in combination with twin-screw extrusion. *Cereal Chem.* 1991;68:632.

Nishina PM, Freedland RA. The effects of dietary fiber feeding on cholesterol metabolism in rats. *J. Nutr.* 1990;120:800.

Olson B. A comparison of commercial fibre sources: barley bran, corn bran, orange fibre and sugar beet fibre. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1995;49:S 226.

Pell JD, Gee JM, Wortley GM, Johnson TI. Dietary corn oil and guar gum stimulate intestinal crypt cell proliferation in rats by independent but potentially synergistic mechanisms. *J. Nutr.* 1992;122:2447.

PIERCE. Catalog & Handbook PIERCE. Life science & analytical research products. A Perstorp Biotec Company. 1994-1995;T289.

Qu Z, Ling PR, Tahan SR, Sierra P, Onderdonk AB, Bristian BR. Protein and lipid refeeding changes protein metabolism and colonic but not small intestinal morphology in protein-depleted rats. *J. Nutr.* 1996;126:906.

Rao GN, Edmondson J, Hildebrandt PK, Bruner RH. Influence of dietary protein fat, and fiber on growth, blood chemistry, and tumor incidences in Fischer 344 rats. *Nutr. Cancer* 1996;25:269.

Reddy BS. Role of dietary fiber in colon cancer: an overview. *Am. J. Med.* 1999;106;16S. 50S.

Reinhold JG, Garcia LJS. Fiber of the maize tortilla. *Am. J. Clin. Nutr.* 1979;32:1326.

Reinhold JG, Garcia LJS, Garzon P. Binding of iron by fiber of wheat and maize. *Am. J. Clin. Nutr.* 1981;34:1384.

Reinhold JG, Garcia EJ, Garcia PM, Garzon P. Retention of iron by rat intestine in vivo as affected by dietary fiber, ascorbate and citrate. *J. Nutr.* 1986;116:1007.

Reyes CP. *Bioestadística aplicada*. Ed. Trillas. México. 1984;36, 113.

Robblee NM, McLellan EA, Bird RP. Measurement of the proliferative status of colonic epithelium as a risk marker for colon carcinogenesis: effect of bile acid and dietary fiber. *Nutr. Cancer* 1989;12:301.

Rodríguez del AJM. *Métodos de Investigación pecuaria*. Ed. Trillas. Mexico. 1991;38, 81.

Romulu P, Rao PJ. Effect of processing on dietary fiber content of cereals and pulses. *Plant. Foods Human Nutr.* 1997;50:249.

Rosado LJ, López P, Morales M, Allen HL. Fiber digestibility and breath-hydrogen excretion in subjects consuming rural and urban Mexican diets. *Am. J. Clin Nutr.* 1991;53:55.

Ross HM, Romrell JL, Kaye FG. *Histología texto y atlas a color*. 3ra ed. Ed. Medica Panamericana. México. 1999;438.

Ruiz A, Estupiñan J. Organización de los servicios de la Salud Pública Veterinaria en América Latina y el Caribe. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1992;11:117.

Ruiz-Roso B, Perez-Olleros L, Garcia-Cuevas M. Effect of natural carob fibers and other dietary fibers on the digestibility of fats and nitrogen in rats. *Nutr. Hosp.* 1999;14:159.

Ryan PG, Dudrick JS, Copeland ME, Johnson RL. Effects of various diets on colonic growth in rats. *Gastroenterology* 1979;77:658.

Sakaguchi E, Itoh H, Kohno T, Oshima S, Mizutani K. Fiber digestion and weight gain in guinea pigs fed diet containing different fiber sources. *Exp. Anim.* 1997;46:297.

Schidt-Witting U, Enss ML, Coenen M, Gartner K, Hedrich HJ. Response of rat colonic mucosa to high fiber diet. *Amm. Nutr. Metabol.* 1996;40:343.

Schwabe CW. History of the scientific relationships of veterinary public health. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1991;10:933.

Schwiezer TR, Wursch P. The physiological and nutritional importance of dietary fibre. *Experientia* 1991;47:181.

Shothgate DAT. What is dietary fibre? 1. The evolution of a concept. *Fibre Forum* 1984(spring)a;1.

Shothgate DAT. What is dietary fibre? 2. Sources and properties. *Fibre Forum* 1984(Whitsun)b;1.

Slavin JL. Dietary fiber: classification, chemical analysis, and food sources. *J. Am. Diet. Assoc.* 1987;87:1164.

Snipes LR. Anatomy of the cecum of the laboratory mouse and rat. *Anat. Embryol.* 1981;162:455.

Stark A, Nyska A, Madar Z. Metabolic and morphometric changes in small and large intestine in rats fed high-fiber diets. *Toxicol. Pathol.* 1996;24:166.

Tamura M, Suzuki H. Effects of pectin on jejunal and ileal morphology and ultrastructure in adult mice. *Ann. Nutr. Metab.* 1997;41:255.

Tejada I. Control de calidad y análisis de alimentos para animales. Sistema de Educación Continua en Producción Animal A.C. 1992;13.

Tinker LF, Davis PA, Schneeman BO. Prune fiber or pectin compared with cellulose lowers plasma and liver lipids in rats with diet-induced hyperlipidemia. *J. Nutr.* 1994;124:31.

Trowell H. Definition of dietary fiber and hypothesis that is a protective factor in certain diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 1979;29:417.

Van Soest PJ. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1963;46:829.

Van Soest PJ. Cap 6 Analytical systems for evaluation of feeds. In: *Nutritional ecology ruminant*. O & B Books Inc. Durham and Downey. Portland. 1982;75.

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewwis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 1991;74:3583.

Walker AR. Colon cancer and diet, with special reference to intakes of fat and fiber. *Am. J. Clin. Nutr.* 1976;29:1417.

Weisburger JH, Reddy BS, Rose DP, Cohen LA, Kendall ME, Wynder EL. Protective mechanisms of dietary fibers in nutritional carcinogenesis. *Basic Life Sci.* 1993;61:45.

Whiteley LD, Purdon MP, Ridder GM, Bertram TA. The interactions of diet and colonic microflora in regulating colonic mucosal growth. *Toxicol. Pathol.* 1996;24:305.

Yoshioka M, Shimomura Y, Suzuki M. Dietary polydextrose affects the large intestine in rats. *J. Nutr.* 1994;124:539.

Young AE, Cielotti AL, Winborn BW, Traylor BJ, Weser E. Comparative study of nutritional adaptation to defined formula diets in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 1980;33:2106.

Zhang J, Lupton JR. Dietary fibers stimulate colonic cell proliferation by different mechanisms at different sites. *Nutr Cancer.* 1994;22:267.

Zoran DL, Turner ND, Taddeo SS, Chapkin RS, Lupton JR. Wheat bran diet reduces tumor incidence in a rat model of colon cancer independent of effect on distal luminal butyrate concentrations. *J. Nutr.* 1997;127:2217.

Zusman I, Reifen R, Livni O, Smirnoff P, Gurevich P, Sandler B, Nyska A, Gal R, Tendler Y, Madar Z. Role of apoptosis, proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in chemically induced colon cancer in rats fed corncob fiber treated with the fungus *Pleurotus ostreatus*. *Anticancer Res.* 1997;17:2105.