



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA
(PROPAC)

EFFECTO DEL CONSUMO DE UNA BARRA DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) Y AVENA (*Avena sativa*) SOBRE EL NIVEL DE TRIGLICÉRIDOS SÉRICOS Y EL PERFIL DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EN HUMANOS

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias de los Alimentos**

Presenta

M. en C. Aurea Karina Ramírez Jiménez

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

C.U. Santiago de Querétaro, Qro., Noviembre de 2015

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

AGRADECIMIENTOS

El más sincero de mis agradecimientos a mi familia, por todo el apoyo y las palabras de aliento que me impulsaron a seguir adelante. Especialmente a mis hijos, Samara, Melisa y Francisco que con su paciencia y cariño fueron mi inspiración para concluir exitosamente este proyecto. A Aurelio y mis padres por la fuerza que me transmitieron en esos momentos de flaqueza. Muchas gracias porque simplemente no hubiera sido posible realizar este proyecto.

A la Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña, por su guía y apoyo en todo sentido durante todos estos años. A la Dra. Fabiola León Galván porque en ella encontré una guía y una amiga. A la Dra. Elizabeth Tejero por su disposición y su increíblemente rápida respuesta cada vez que le solicité algo. A la Dra. Rosalía Reynoso por alentarme a superar retos y al Dr. Jorge Luis Rosado por siempre estar dispuesto a ayudarme con una sonrisa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para realizar mis estudios.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por haberme dado la oportunidad de pertenecer a esta excelente casa de estudios.

Al la Dra. Laurence Molina y Dr. Franck Molina por haberme recibido con brazos abiertos durante mi estancia de investigación.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República

**EFFECTO DEL CONSUMO DE UNA BARRA DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)
Y AVENA (*Avena sativa*) SOBRE EL NIVEL DE TRIGLICÉRIDOS SÉRICOS Y
EL PERFIL DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EN HUMANOS**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

M.C. Aurea Karina Ramírez Jiménez

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

SINODALES

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Presidente

Dra. Fabiola León Galván
Secretario

Dra. María Elizabeth Tejero Barrera
Vocal

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Suplente

Dr. Jorge Luis Rosado Loria
Suplente

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química

Firma

Firma
Firma

Firma
Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2015
México

RESUMEN

La hipertrigliceridemia es una condición preocupante en la población Mexicana debido a que es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular. Las estrategias actuales para la prevención de dislipidemias y alteraciones en el perfil de lípidos incluyen el desarrollo de alimentos funcionales como una alternativa para el manejo de la hipertrigliceridemia. El frijol común es un alimento tradicional mexicano reconocido por ser una fuente significativa de compuestos bioactivos o nutraceuticos, entre los que destacan compuestos fenólicos, fibra dietética total (insoluble, almidón resistente y oligosacáridos), saponinas y fitoesteroles, que han sido asociados a efectos hipolipidémicos. En este sentido, el desarrollo de productos alimenticios a base de frijol se considera una alternativa para mejorar el estado de salud. En estudios previos, se desarrolló la formulación de una barra de frijol (*P. vulgaris*) y avena (*A. sativa*) que mostró tener un buen perfil nutricional y nutraceutico en estudios *in vitro*. Para validar estos resultados, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del consumo de la barra frijol-avena sobre triglicéridos séricos (TG) y proteínas plasmáticas involucradas en el metabolismo de lípidos mediante un estudio clínico con mujeres Queretanas. El estudio clínico (aleatorizado, en paralelo) tuvo una duración de dos meses y se llevó a cabo con 32 mujeres entre 18 y 49 años con niveles de triglicéridos elevados que fueron divididas en grupo tratamiento (TG=208.18 $\pm$ 56.97 mg/dL) y un grupo control (TG=182.28 $\pm$ 51.39 mg/dL). El grupo control recibió solamente orientación nutricional, mientras que el grupo tratamiento además consumió 50 g del producto diariamente. Se realizó la toma de muestras sanguíneas al inicio y al final del estudio, obteniendo suero y plasma para la determinación de perfil lipídico, glucosa y marcadores bioquímicos. Las características promedio de las participantes fueron: 34.03 $\pm$ 8.95 años, 74.78 $\pm$ 13.51 Kg de peso y 30.44 $\pm$ 5.43 de índice de masa corporal. Al finalizar el estudio, el nivel de TG disminuyó en el grupo tratamiento en 34% (-60.69 [CI: -95.91, -25.47]) y los de glucosa en 2.2% (-3.3 [CI95: -6.41, -0.18]). Las variables bioquímicas como proteína C-reactiva (-0.63 [-1.84, 0.58]) y resistencia a la insulina (índice HOMA: -0.65 [-2.89, 1.61]) no mostraron diferencias significativas entre grupo. Para evaluar cambios en las concentraciones de proteínas plasmáticas involucradas en el metabolismo de lípidos, se utilizó un microarreglo de anticuerpos de 182 proteínas relacionadas con obesidad. Se encontró la expresión diferencial de cuarenta proteínas con un radio de expresión de 1.2 y doce proteínas reguladas con un radio de expresión mayor a 2. El análisis bioinformático mediante el programa IPA de QIAGEN, CYTOSCAPE-BINGO y ONTOLOGIZER, mostró que las principales rutas metabólicas reguladas estuvieron relacionadas con una mayor eficiencia en depuración de TG y disminución en síntesis de ácidos grasos, en donde destacan las proteínas DLK1 y ANGPTL4, así como la regulación hormonal mediada por las proteínas TSHB y ghrelina. Estos resultados son promisorios, puesto que la sola intervención sin el control dietético redujo significativamente los niveles de TG, sentando un precedente para futuras investigaciones en la prevención de la hipertrigliceridemia.

Palabras clave: proteínas, inflamación, triglicéridos, frijol común, barra frijol-avena.

ABSTRACT

Hypertriglyceridemia is a serious condition in Mexican population and it is considered a major risk factor for cardiovascular disease. Current efforts to prevent dyslipidemia and lipids alteration include the development of functional products as an alternative for management of hypertriglyceridemia. Common beans. Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are a recognized good source of bioactive compounds, mainly phenolic compounds, total dietary fiber (insoluble and soluble fiber, resistant starch and oligosaccharides), saponins and phytosterols that exert hypolipidemic effects. In this sense, the development of beans-based food products is an alternative for improving the general health status. In a previous work, a beans-oats snack bar formulation we found a promising potential of a beans-oats baked snack bar as functional product. In order to validate those results, the aim of this works was to assess a clinical trial was conducted with Mexican women to assess the effect of daily consumption of the functional product on serum TG and certain plasma proteins involved in lipids metabolism in a clinical trial. The clinical trial was a 2 months, randomized parallel study where 32 women with elevated TG were randomized into treatment group (208.18 ± 56.97 mg/dL) and control group (182.28 ± 51.39 mg/dL). Control group received nutritional orientation whereas treatment group received the orientation and consumed 50 g of the product per day. Fasting blood samples were collected at baseline and the end of the study, obtaining serum and plasma for analysis of lipids profile, glucose and biomarkers. The average age of women was 34.03 ± 8.95 year, weight 74.78 ± 13.51 Kg and IMC 30.44 ± 5.43 . At the end of the study, fasting serum TG in the treatment group decreased by 34% (-60.69 [CI: -95.91 , -25.47]) and glucose by 2.2% (-3.3 [CI95: -6.41 , -0.18]). Biomarkers such as C-reactive protein and insulin resistance did not show statistical differences between groups. To determine changes in plasma proteins, a 182 protein Human Obesity Antibody Array was used. Forty differentially expressed proteins were found when fold-change was set at 1.2, and twelve proteins regulated when fold- change was 2 or higher. Bioinformatics analysis by IPA from QIAGEN, CYTOSCAPE-BINGO y ONTOLOGIZER showed that main the pathways regulated were related to an improved efficiency of TG clearance, a reduction in fatty acids synthesis being the main proteins DLK1 and ANGPTL4, furthermore, hormonal response mediated by TSHB and ghrelin were also relevant. These results are promising since the merely intervention with the functional product reduced serum TG without any diet restriction, giving insights for further research in prevention of hypertriglyceridemia.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
1.1 Enfermedades no transmisibles en México	2
1.1.2 Hipertrigliceridemia	3
1.1.2.1 Metabolismo de triglicéridos	3
1.1.2.2 Fisiopatología de la hipertrigliceridemia	6
1.1.3 Prevalencia de hipertrigliceridemia en mujeres: muestra de estudio	8
1.1.4 Manejo dietético de hipertrigliceridemia	8
1.2 Alimentos funcionales	9
1.2.1 Frijol común (Phaseolus vulgaris L.)	10
1.2.1.1 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante	10
1.2.1.2 Fracción no digerible (FND)	12
1.2.1.3 Saponinas	13
1.2.1.4 Fitoesteroles	14
1.2.2 Mecanismo de acción de compuestos bioactivos de frijol en el metabolismo de triglicéridos	15
1.2.2.1 Regulación de procesos de saciedad y apetito	15
1.2.2.2 Efecto intestinal	17
1.2.2.2.1 Disrupción de micelas lipídicas	17
1.2.2.2.2 Inhibición de lipasa pancreática	17
1.2.2.3 Regulación hepática de enzimas lipogénicas	18
1.2.2.4 Depuración de lipoproteínas	18
1.2.3 Avena (Avena sativa)	19
1.2.3.1 β -glucanos	19
1.2.4 Desarrollo de productos funcionales a base de frijol y avena	20
1.2.5 Legislación de alimentos funcionales	22
1.2.6 Estudios clínicos de intervención	23
1.2.6.1 Criterios de inclusión y exclusión	23
1.2.7 Enfoque proteómico: microarreglos de proteínas	24
1.2.7.1 Microarreglos de proteínas	25
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo general	28
5.2 Objetivos específicos	28
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1 Estrategia experimental	29
6.2 Materiales biológicos	30
6.3 Reactivos	30
6.4 Diseño del estudio de intervención	30
6.4.1 Criterios de inclusión	31
6.4.2 Criterios de exclusión	32
6.4.3 Criterios de eliminación	32

6.4.4 Reclutamiento	32
6.4.5 Evaluación nutricional y clínica	33
6.4.6 Historia clínica y antropometría.....	34
6.4.7 Evaluación de hábitos alimenticios	35
6.4.7.1 Frecuencia de consumo de alimentos	35
6.4.8 Orientación nutricional	35
6.4.9 Dieta y administración de la barra.....	36
6.4.9.1 Características del refrigerio	37
6.4.10 Evaluación de cambios en antropometría y composición corporal	38
6.5 Evaluación clínica	39
6.5.1 Perfil de lípidos y glucosa basal.....	39
6.5.2 Proteína C-reactiva ultrasensible (us-PCR)	39
6.5.3 Resistencia a insulina	41
6.6 Métodos analíticos	42
6.6.1 Preparación de las muestras	42
6.6. Cuantificación de compuestos fenólicos.	43
6.6.2.1 Extracto metanólico	43
6.6.2.2 Cuantificación de taninos condensados.....	43
6.6.2.3 Cuantificación de flavonoides totales.....	44
6.6.3 Capacidad antioxidante	44
6.6.3.1 Determinación de capacidad antioxidante por el método ABTS.	44
6.6.3.2 Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH.....	44
6.6.3.3 Determinación del perfil de compuestos fenólicos por HPLC	45
6.6.3.3.1 Obtención de extractos de fenoles libres y ligados	45
6.6.3.3.2 Determinación de compuestos fenólicos presentes en extractos de fenoles libres y ligados por HPLC	46
6.6.3.3.3 Determinación de compuestos fenólicos presentes en la barra de frijol común	46
6.6.4 Determinación de fibra insoluble.....	46
6.6.5 Determinación de fibra soluble.....	47
6.6.6. Cuantificación de almidón resistente	47
6.6.7 Digestibilidad de carbohidratos	48
6.6.7.1 Almidón total	48
6.6.7.2 Almidón disponible.....	49
6.6.8 Cuantificación de oligosacáridos.....	49
6.6.9 Determinación del índice de absorción de agua	50
6.6.10 Determinación de la capacidad de absorción de aceite (CAA)	50
6.6.11 Perfil electroforético de proteínas	50
6.6.11.1 Extracción de proteína total	50
6.6.11.2 Cuantificación de proteína por el método de Bradford.....	51
6.6.11.3 Preparación de gel de acrilamida SDS	52
6.6.11.4 Tinción del gel.....	52
6.6.11.5 Electroforesis en chip.....	53
6.6.12 Microarreglos de proteínas	53
6.7 Análisis estadístico	55
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
7.1 Caracterización de las materias primas	56
7.1.1 Índice de absorción de agua y sólidos solubles	56
7.1.2 Capacidad de absorción de aceite (CAA)	58
7.1.3 Cuantificación de compuestos fenólicos	59

7.1.3.1 Contenido de flavonoides totales	59
7.1.3.1 Contenido de taninos condensados.....	61
7.1.4 Capacidad antioxidante	62
7.1.5 Contenido de compuestos fenólicos cuantificados por HPLC.....	65
7.1.5.1 Perfil de compuestos fenólicos	65
7.1.6 Contenido de carbohidratos indigestibles	70
7.1.6.1 Perfil de fracciones de almidón y fibra dietética	70
7.1.6.2 Contenido de oligosacáridos.....	73
7.1.7 Perfil electroforético de frijol común (P. vulgaris).....	74
7.1.7.1 SDS-PAGE de harinas de frijol común	74
7.2 Estudio clínico.....	77
7.2.1 Resultados de reclutamiento	77
7.2.2 Análisis inicial de antropometría y marcadores clínicos.....	80
7.2.3 Cambios en los parámetros antropométricos evaluados	83
7.2.4 Análisis final de antropometría y marcadores clínicos	87
7.4 Microarreglos de proteínas	96
7.4.1 Análisis bioinformático: IPA Qiagen	100
7.4.2 Análisis de enriquecimiento de ontología de genes	114
7.4.2.1 CYTOSCAPE - BINGO	114
7.4.2.2 ONTOLOGIZER.....	119
7.5 integración de las vías reguladas.....	123
VIII.CONCLUSIÓN.....	125
IX.BIBLIOGRAFÍA.....	127

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación de dislipidemias en México de acuerdo a la NOM-037-SSA2-2012.....	3
2. Contenido de flavonoides totales y taninos condensados en harinas de frijol común (<i>P. vulgaris</i> L.).....	11
3. Composición química y nutracéutica de barras de frijol (<i>P. vulgaris</i>) y avena (<i>A. sativa</i>).....	21
4. Clasificación del estado nutricional de acuerdo al índice de masa corporal..	35
5. Preparación de la curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales mediante el método de Bradford.....	51
6. Reactivos para la preparación de geles de acrilamida	52
7. Índice de absorción de agua (IAA) y contenido de sólidos solubles (SS) en harinas de frijol horneado var. Bayo Madero	57
8. Capacidad antioxidante de harinas de frijol común (<i>P. vulgaris</i>) crudo, cocido y horneado.....	63
9. Cambios en el perfil de compuestos fenólicos por efecto del procesamiento de harinas de frijol común	66
10. Perfil de compuestos fenólicos ligados en frijol Bayo Madero	68
11. Diferentes fracciones de almidón, digestibilidad <i>in vitro</i> y fibra dietética de harinas de frijol común var. Bayo Madero	71
12. Contenido de oligosacáridos presentes en las harinas de frijol común (<i>P. vulgaris</i>).....	73
13. Contenido de proteína total en harinas de <i>P. vulgaris</i>	75
14. Condiciones iniciales de participantes en el estudio clínico.....	80
15. Condiciones finales de participantes en el estudio clínico.	87
16. Efecto del consumo de la barra de frijol-avena sobre antropometría y composición corporal de las participantes en el estudio clínico.....	88
17. Efecto del consumo de la barra de frijol-avena sobre antropometría y composición corporal de las participantes en el estudio clínico.....	90
18. Efecto del consumo de la barra de frijol-avena sobre marcadores clínicos de las participantes en el estudio clínico.....	92
19. Clasificación de las proteínas incluidas en el microarreglo de acuerdo a la ontología de genes.....	97
20. Proteínas diferencialmente expresadas por efecto del consumo de la barra	102
21. Clasificación de proteínas diferencialmente expresadas de acuerdo a su función biológica o desorden metabólico.....	104
22. Principales procesos y proteínas reguladas obtenidas por el programa BINGO.....	117
23. Principales categorías y proteínas sobre-representadas después del análisis de unión padre-hijo en el programa ONTOLOGIZER	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de triglicéridos	4
2. Absorción, digestión y metabolismo de triglicéridos	5
3. Estructura de las saponinas identificadas en frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	13
4. Estructura de los fitoesteroles más abundantes en frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	15
5. Mecanismos de acción de fitoquímicos de frijol implicados en la reducción de trigliceridemia	16
6. Estrategia experimental del proyecto de investigación	30
7. Diagrama de flujo de la elaboración de la barra de frijol-avena.....	39
8. Fundamento de los microarreglos de proteínas	55
9. Capacidad de absorción de aceite de harinas de frijol común (<i>P. vulgaris</i>) var. Bayo Madero sometido a diferentes tratamientos	59
10. Concentración de flavonoides totales en frijol común (<i>P. vulgaris</i>) var. Bayo Madero sometido a diferentes tratamientos	60
11. Concentración de taninos condensados en frijol común (<i>P. vulgaris</i>) var. Bayo Madero sometido a diferentes tratamientos térmicos.....	62
12. Gel de electroforesis para proteínas de frijol común (<i>P. vulgaris</i>)	77
13. Gel de electroforesis para muestras de frijol Bayo madero crudo y horneado	77
14. Diagrama de flujo de reclutamiento y selección de participantes para estudio clínico	80
15. Prevalencias de marcadores clínicos de las participantes en estudio	83
16. Cambios en mediciones antropométricas de participantes a lo largo de dos meses de estudio clínico	85
17. Tipos de grasa abdominal	87
18. Imagen de la señal fluorescente de los microarreglos de proteínas.....	99
19. Normalización de controles positivos de los diferentes microarreglos.....	100
20. Ruta NF- κ B que indica la regulación de las proteínas expresadas diferencialmente.....	106
21. Predicción del efecto de las proteínas reguladas sobre la vía de NF- κ B..	107
22. Red metabólica relacionada con desórdenes cardiovasculares.....	108
23. Predicción del efecto de las proteínas reguladas sobre la vía señalización de aterosclerosis.....	111
24. Mapa de calor de los procesos regulados relevantes en metabolismo de lípidos.....	111
25. Proteínas involucradas en la inhibición de procesos relacionados con el metabolismo de lípidos	112

26. Red biológica de proteínas sobre-expresadas después del análisis mediante el programa BINGO.....	115
27. Red funcional de proteínas sobre-expresadas obtenido mediante el análisis intersección padre-hijo en el programa ONTOLOGIZER	120
28. Red funcional de proteínas sobre-expresadas obtenido mediante el análisis unión padre-hijo en el programa ONTOLOGIZER	121
29. Integración metabólica de las posibles rutas reguladas por efecto del consumo del refrigerio.....	123

I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha observado una transición alimentaria en México, una evolución en la cantidad, disponibilidad y densidad calórica de los alimentos que ha provocado un incremento de desórdenes asociados al consumo energético excesivo. Dentro de este tipo de desórdenes, se incluyen las enfermedades no transmisibles (ENT) siendo las principales las enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y enfermedades pulmonares crónicas (OMS, 2012).

Uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y diabetes son las dislipidemias. La hipertrigliceridemia se ha reportado como la dislipidemia más frecuente, con una prevalencia del 55% al 58% en población mexicana (Munguía-Miranda, *et al.*, 2008; Cifuentes-Goches, *et al.*, 2012). Se ha propuesto que el manejo dietético en personas con triglicéridos altos, puede atenuar esta condición.

Diferentes enfoques han sido abordados por instituciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), cuya estrategia propone la formulación de productos alimentarios con mejores propiedades nutricionales (OMS, 2004). Las tendencias para este nicho de mercado, apuntan hacia el consumo de productos convenientes y listos para consumo, como es el caso de botanas o refrigerios que además proporcionen beneficios para la salud (Sloan, 2012).

Una alternativa para enriquecer productos alimentarios es la adición de fitoquímicos, sustancias presentes en las plantas que tienen propiedades nutraceuticas y funcionales. En México existe una gran diversidad de especies vegetales con potencial funcional, incluyendo aquellas que se consumen como parte de la dieta tradicional. En esta categoría se encuentra el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), el cual ha formado parte de la cultura culinaria en nuestro país desde tiempos ancestrales. Se han explorado sus propiedades como agente antioxidante (Cardador-Martínez, *et al.*, 2002; Xu & Chang, 2008; Xu & Chang, 2009), anticancerígeno (Aparicio-Fernández, *et al.*, 2008; Campos-Vega, *et al.*, 2012; Cruz-Bravo, *et al.*, 2011; Vergara-Castañeda, *et al.*,

2012) y su posible potencial hipolipidémico (Han, *et al.*, 2003; Han, *et al.*, 2004; Chávez-Santoscoy, *et al.*, 2014).

Otro alimento que ha incrementado su demanda recientemente en el mercado mexicano es la avena (*Avena sativa*), un cereal que ha sido fuertemente asociado a la disminución de ECV debido a la presencia de β -glucanos, un tipo de fibra soluble que ha mostrado ser efectiva en la reducción del colesterol sérico (FDA, 1997).

La combinación de leguminosas y cereales se ha utilizado como una forma de mejorar la calidad proteica (Tharanathan y Mahadevamma, 2003) de granos y semillas. En el caso particular del frijol y la avena, se complementa también el perfil de fibra dietética, un compuesto implicado en la disminución de los niveles de lípidos.

Existe un estudio previo, en el cual se desarrolló la formulación y se evaluó el potencial nutracéutico un refrigerio horneado a base de harina de frijol y avena (Ramírez-Jiménez, 2010). Los resultados obtenidos mostraron cantidades significativas de fibra dietética soluble, almidón resistente y compuestos antioxidantes, los cuales han sido asociados a la disminución de lípidos sanguíneos. En base a lo anterior, el presente proyecto tuvo por objetivo evaluar el potencial funcional e hipolipidémico de este producto en un estudio clínico con mujeres hipertrigliceridémicas, buscando además proponer un posible mecanismo para explicar este efecto.

II. ANTECEDENTES

1.1 Enfermedades no transmisibles en México

Las enfermedades no transmisibles (ENT) representan la causa principal de mortalidad a nivel mundial y se definen como un grupo heterogéneo de padecimientos que evoluciona a lo largo del tiempo contribuyendo a la mortalidad de un individuo (Córdoba-Villalobos *et al.*, 2008). Existen cuatro tipos principales de ENT: enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y enfermedades pulmonares crónicas (OMS, 2012). Su incidencia está determinada por un conjunto de factores de riesgo que incluyen obesidad,

niveles anormales de lípidos, hipertensión, dieta inadecuada y sedentarismo (Epping-Jordan, Galea, Tukuitonga y Beaglehole, 2005).

De acuerdo a los datos presentados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2013), las enfermedades del corazón son la causa principal de mortalidad en territorio nacional. Uno de los factores de riesgo primarios para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV) son las dislipidemias (Yusuf, *et al.*, 2004; Kiran, 2010; Navarro-Hernández, *et al.*, 2015). Las dislipidemias se definen como un conjunto de alteraciones en la concentración normal de lípidos en sangre y se clasifican de acuerdo a la patología presentada como se muestra en el Cuadro 1 (NOM-037-SSA2-2012, 2012).

Cuadro 1. Clasificación de dislipidemias en México de acuerdo a la NOM-037-SSA2-2012.

Desorden lipídico	Colesterol total (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	C-LDL (mg/dL)	C-no-HDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)
<i>Hipercolesterolemia</i>	> 200	< 150	≥ 130	-	-
<i>Hiperlipidemia mixta</i>	> 200	> 150	≥ 130	≥ 160	-
<i>Hipertrigliceridemia</i>	< 200	> 150	< 130	-	-
<i>Hipoalfalipoproteinemia</i>	-	-	-	-	< 40

C-LDL- Lipoproteínas de baja densidad (Low Density Lipoprotein, por sus siglas en inglés); C-HDL- Lipoproteínas de alta densidad (High Density Lipoprotein, por sus siglas en inglés); C-no-HDL – Colesterol no HDL, es la diferencia entre el valor de colesterol total y HDL.

Dentro de esta clasificación, la hipertrigliceridemia se ha reportado como la dislipidemia más frecuente, con una prevalencia del 55-58% en población mexicana (Munguía-Miranda *et al.*, 2008, Cifuentes-Goches *et al.*, 2012).

1.1.2 Hipertrigliceridemia

1.1.2.1 Metabolismo de triglicéridos

Los triglicéridos (TG) son macronutrientes provenientes de la dieta; una vez ingeridos, aproximadamente el 95% se digieren y se absorben, representando del 30-40% de los requerimientos totales de energía para el organismo (Sitrin, 2014). En una situación de exceso energético, los triglicéridos se sintetizan de

novo en el hígado, a partir de ciertas moléculas precursoras como glucosa, algunos aminoácidos y etanol, mediante un proceso denominado lipogénesis (Schutz, 2004). Una vez cubierta la demanda energética, el destino final de los triglicéridos es el almacenamiento en el tejido adiposo.

La estructura típica de un triglicérido (Figura 1) consiste de tres ácidos grasos unidos por un enlace éster a un esqueleto de glicerol (Sitrin, 2014). La presencia de la cadena de hidrocarburos le confiere carácter hidrofóbico variable, dependiendo de la saturación y longitud de la cadena.

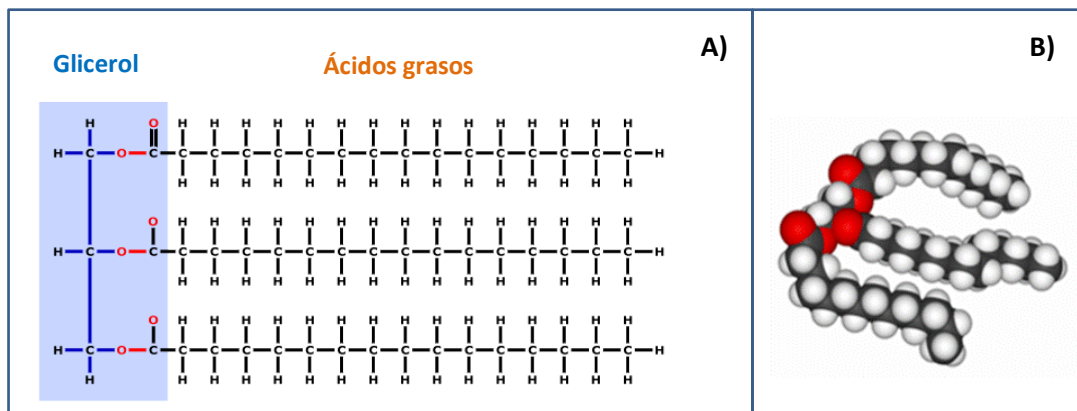


Figura 1. Estructura química de triglicéridos

A) Fórmula desarrollada con representación de con ácidos grasos saturados

B) Estructura tridimensional, en donde las insaturaciones se observan como desviaciones en la conformación de las cadenas de ácidos grasos.

Adaptado de <https://courses.ecampus.oregonstate.edu/ans312/one/>

Después de una ingesta de alimentos los triglicéridos presentes sufren dos procesos antes de ser metabolizados: digestión y absorción. En la Figura 2 se esquematiza el proceso de digestión, absorción y metabolismo de estos compuestos.

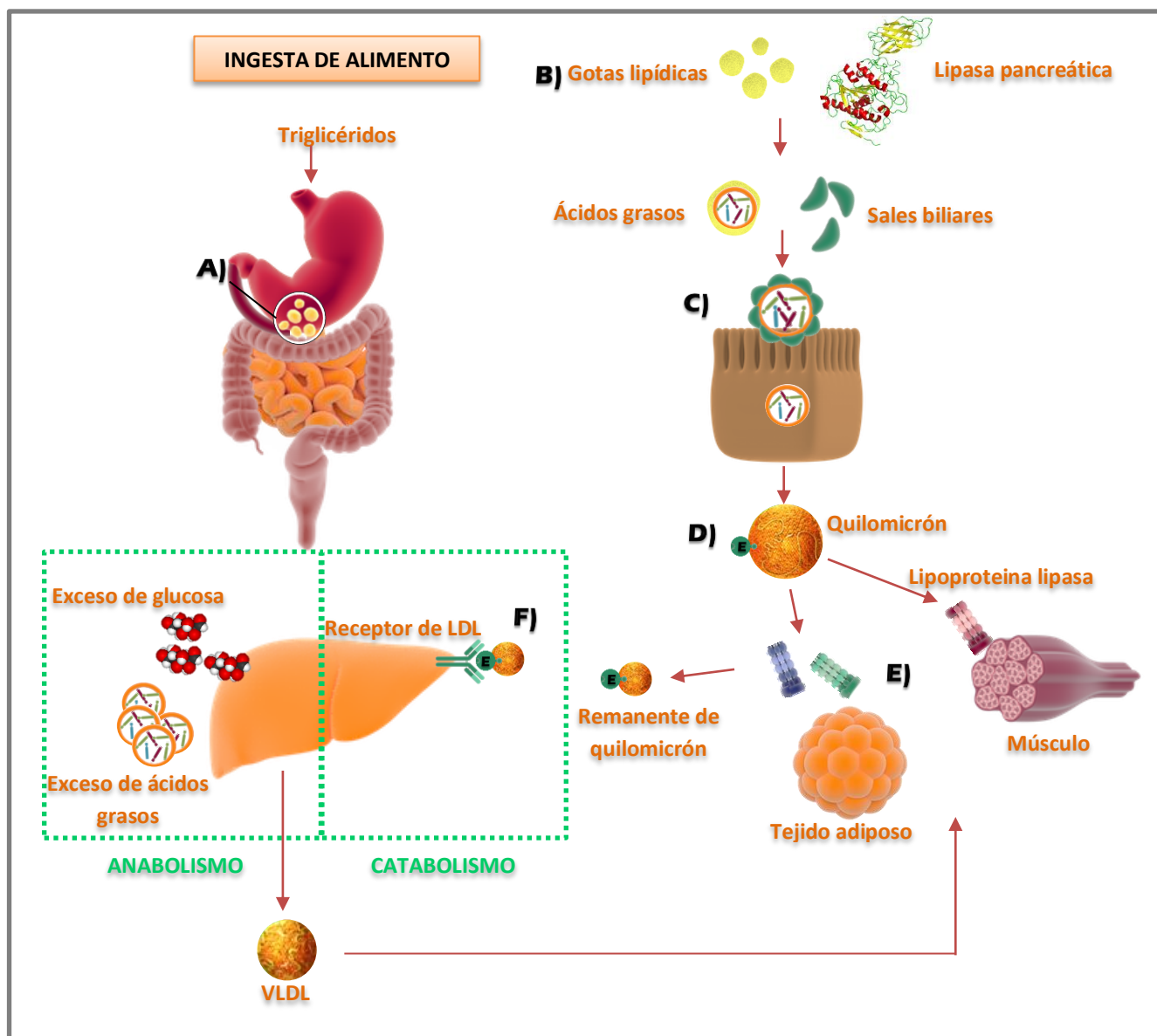


Figura 2. Absorción, digestión y metabolismo de triglicéridos

Las ilustraciones se realizaron con la ayuda de la herramienta: library of Science & Medical Illustrations (<http://www.somersault1824.com/science-illustrations/>)

La digestión de estos compuestos inicia en la boca con la acción de la lipasa lingual, que inicia el proceso de liberación de ácidos grasos y continúa en el estómago, en donde el ambiente ácido, la lipasa gástrica y las contracciones gástricas dan como resultado la secreción hacia el duodeno de una emulsión que contiene pequeñas formaciones de lípidos (Figura 1, A). Este paso tiene el propósito de obtener moléculas más sencillas (diglicéridos principalmente) que forman pequeñas gotas lipídicas con una mayor superficie, permitiendo la acción del complejo colipasa-lipasa pancreática (Sitrin, 2014). Este sistema enzimático es hidrosoluble interfacial, por lo que solo actúa en la superficie de

las gotas lipídicas (B), siendo responsable de la hidrólisis del 50 al 60% del total de los triglicéridos (Birari & Bhutani, 2007).

Los productos de la hidrólisis, los ácidos grasos libres, forman micelas mixtas con las sales biliares, sustancias de naturaleza anfipática que facilitan el transporte hacia los enterocitos (celulas intestinales) para su absorción (C). Una vez en el enterocito, los ácidos grasos son liberados y reempaquetados en forma de triglicéridos en quilomicrones, una clase de lipoproteínas encargada la distribución hacia tejidos periféricos a través del torrente sanguíneo (D). Los triglicéridos son liberados de dichas lipoproteínas mediante la acción de la lipoproteína lipasa (E), una enzima endotelial que facilita el transporte hacia el interior de los tejidos (Iqbal y Hussain, 2009).

Los remanentes de quilomacrón depletados de triglicéridos se catabolizan en el hígado (F), en donde son endocitados de manera directa o mediante el reconocimiento de la apoproteína E por los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) presentes en la superficie hepática (Hussain *et al.*, 1996).

El hígado es el órgano productor de otra clase de moléculas transportadoras de triglicéridos, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), ricas en triglicéridos sintetizados *de novo* a partir del exceso de ácidos grasos ingeridos o producidos a partir del exceso de glucosa (Urquiza-Hernández, 2008). De hecho, la medición clínica de triglicéridos en sangre en condiciones de ayuno, es en realidad la cuantificación de VLDL.

1.1.2.2 Fisiopatología de la hipertrigliceridemia

Como se mencionó anteriormente, la hipertrigliceridemia es una condición caracterizada por una elevación de triglicéridos en sangre por arriba de 150 mg/dL. Se clasifica como leve, moderada y severa cuando la concentración en ayunas es de 1.7, 2.3 y 5.7 mmol/l, respectivamente (Watts, *et al.*, 2013). Las posibles causas de esta alteración incluyen varios procesos entre los que se encuentran una menor tasa de aclaramiento de triglicéridos (Ros & Laguna, 2006), patologías como resistencia a insulina y obesidad (Klop *et al.*, 2013) y malfuncionamiento de la lipoproteína lipasa (Goodarzi *et al.*, 2004).

El primero de ellos se refiere a la eficiencia de depuración o aclaramiento de los triglicéridos circulantes en forma de quilomicrones o VLDL, para lo cual es necesaria la acción de la lipoproteína lipasa. La deficiencia en esta enzima, ya sea genética o adquirida como en el caso de insuficiencia renal, puede inhibir la correcta remoción y entrega de triglicéridos a tejidos periféricos. Esto a su vez, provoca que no se lleve a cabo un adecuado reconocimiento de las lipoproteínas ricas en triglicéridos por receptores hepáticos para su degradación, las cuales permanecen en el torrente sanguíneo (Ros & Laguna, 2006).

Ciertas alteraciones como resistencia a insulina y obesidad, también son causa de altas concentraciones de triglicéridos y ácidos grasos libres. En esta situación, la hipertrigliceridemia es consecuencia de la lipólisis excesiva del tejido adiposo, provocada por una disfunción de la lipasa sensible a la hormona, la cual es dependiente de insulina (Klop *et al.*, 2013). El exceso de ácidos grasos libres son captados por el hígado como fuente de nuevas VLDL que son liberadas hacia torrente sanguíneo exacerbando la hipertrigliceridemia.

La resistencia a insulina es una patología estrechamente relacionada con la hipertrigliceridemia. Durante esta condición, no sólo se aumenta la síntesis *de novo* de VLDL, también se inhibe la actividad de la lipoproteína lipasa, debido a que es dependiente de la insulina (Goodarzi *et al.*, 2004).

La hipertrigliceridemia más frecuente se presenta acompañada de niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL), la cual se demostrado conlleva un riesgo aterogénico (Ros & Laguna, 2006). Este tipo de dislipidemia es adquirida, por lo general por exceso de ingesta energética y se asocia fuertemente a la obesidad visceral y resistencia a la insulina (Brunzell & Ayyobi, 2003).

El exceso de triglicéridos en el organismo se almacena en el tejido adiposo, por tanto la ingesta excesiva de estos compuestos está proporcionalmente relacionada con la expansión de adiposidad.

1.1.3 Prevalencia de hipertrigliceridemia en mujeres: muestra de estudio

En México, la prevalencia de sobrepeso y obesidad es mayor en mujeres, siendo de 73% en comparación con el 69% que se presenta en hombres (ENSANUT, 2012). Dependiendo de la región, la edad y el periodo estudiado, la incidencia de hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia también se presenta con mayor frecuencia en la población femenina. De acuerdo a un estudio realizado por Martínez-Hernández *et al.* (2007), al analizar una muestra de 165 individuos mayores de 20 años, el valor promedio de triglicéridos fue mayor para el sexo femenino (314 mg/dL) con relación al masculino (276 mg/dL).

En el presente proyecto, la muestra de estudio comprende un grupo de mujeres entre 18 y 49 años con elevación de triglicéridos séricos en el rango de 150 mg/dL a 370 mg/dL. Las mujeres han sido uno de los subgrupos que con mayor frecuencia se consideran para el estudio de condiciones médicas, esto debido a ciertos factores, como el hecho de que las mujeres presentan una mayor adherencia a las recomendaciones en programas nutrimentales. González *et al.*, (2007) realizó un análisis del porcentaje de adherencia en pacientes adultos con sobrepeso y obesidad. Los resultados reportados, indican que el género masculino presenta 16% de adherencia mientras que el femenino tuvo un 37%.

1.1.4 Manejo dietético de hipertrigliceridemia

Se ha propuesto que el manejo dietético en personas con triglicéridos altos, puede atenuar esta condición. Al respecto, existen algunos estudios clínicos que han evaluado el efecto del consumo de frijol común sobre la disminución de triglicéridos (Jenkins *et al.*, 1983; Shutler *et al.*, 1989). En el primer estudio se evaluó el consumo de 140 g de frijoles cocidos y enlatados a lo largo de 4 meses en un estudio clínico con 7 participantes del sexo masculino (Jenkins *et al.*, 1983). Se observaron disminuciones en triglicéridos séricos en el orden del 25%.

En el estudio realizado por Shutler *et al.* (1989), el tiempo de evaluación fue de 14 días y los participantes (13 hombres normocolesterolémicos) consumieron 450 g diarios de frijol enlatado). Nuevamente se observaron reducciones en el nivel de triglicéridos de 10.8%.

La evidencia clínica y de estudios in vitro de las propiedades hipolipidémicas de ciertos compuestos bioactivos del frijol, ha incrementado el interés por incluirlo como ingrediente en productos alimentarios. Las estrategias para prevención de ENT incluyen la formulación de alimentos con mejores propiedades nutricionales (OMS, 2004). Las tendencias para este nicho de mercado, apuntan hacia el consumo de productos convenientes y listos para consumo, como es el caso de botanas o refrigerios que además proporcionen beneficios para la salud (Sloan, 2012).

1.2 Alimentos funcionales

Actualmente, la comida ya no se considera solamente una manera de satisfacer el hambre o proveer los nutrientes esenciales, también se espera que tenga beneficios fisiológicos para una buena salud y vida productiva (MacDonald *et al.*, 2009)

La dieta es un factor que afecta la incidencia de muchas enfermedades no transmisibles, tales como enfermedades del corazón, diabetes mellitus y tumores malignos (cáncer), que representan las tres principales causas de mortalidad en México (INEGI, 2013).

Numerosos estudios se han realizado para determinar el impacto de compuestos bioactivos presentes en los alimentos, en la reducción de este tipo de enfermedades (Davis *et al.*, 2004; Slavin *et al.*, 2004; Queiroz-Monici *et al.*, 2005; Veeriah *et al.*, 2006; Marotti *et al.*, 2007; Ramasamy y Arwal, 2008; Bakker *et al.*, 2010).

Los alimentos funcionales son fuente importante de compuestos con diferentes beneficios para la salud, se definen como aquellos que poseen de manera natural elementos bioactivos, los cuales, consumidos en dosis superiores a las presentes en el alimento, presumiblemente tienen un efecto favorable sobre la salud además de su aporte nutrimental (Shi *et al.*, 2002). Pueden formar parte de la dieta normal y además proporcionar beneficios médicos incluyendo la prevención y tratamiento de enfermedades (Morrissey, 2002). Existe gran controversia en cuanto a una definición exacta de alimento funcional, frecuentemente se utiliza de manera indistinta con el término alimento

nutracéutico. No obstante, existe un consenso general de clasificar a los nutraceuticos como compuestos aislados o purificados provenientes de la dieta, que también pueden ser utilizados con fines curativos o preventivos para ciertas enfermedades (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998; Wildman, 2001).

En este sentido, existe una gran variedad de alimentos tradicionales de la cultura Latinoamericana que han cobrado importancia por su contenido de compuestos bioactivos con alto valor nutricional y funcional.

1.2.1 Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol común (*P. vulgaris*) es originario de Mesoamérica y ha sido un alimento muy importante para la población mexicana, se considera una fuente importante de proteína, carbohidratos y vitaminas (Serrano y Goñi, 2004).

Además de los macronutrientes, ciertos compuestos bioactivos tienen relevancia por su actividad biológica. Destacan los compuestos fenólicos, la fracción no digerible del frijol, saponinas y fitoesteroles.

1.2.1.1 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

Los compuestos fenólicos se encuentran concentrados principalmente en la cascarilla o testa de frijol (Oomah *et al.*, 2005; Gálvez-Ranilla *et al.*, 2007). Los más abundantes son flavonoides, tales como glucósidos de flavonol, taninos condensados (proantocianidinas) y antocianinas (Beninger y Hosfield, 2003; De Mejía *et al.*, 2003; Romani *et al.*, 2004), además de diversas formas glicosídicas de flavonoides como quercetina, kaempferol y miricetina (Díaz-Batalla *et al.*, 2006).

El contenido de estos compuestos en frijol común (*P. vulgaris*) depende de la variedad, condiciones climáticas, condiciones de almacenamiento y procesamiento. Dos variedades cultivadas en México por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuaria (INIFAP), se han venido estudiando desde hace algunos años como fuente de compuestos fenólicos. Dichas variedades, Bayo Madero y Negro 8025, han mostrado tener niveles significativos de flavonoides totales, taninos condensados y capacidad antioxidante (Cardador-Martínez *et al.*, 2002; Feregrino-Pérez *et al.*, 2008;

Campos-Vega *et al.*, 2009). Estudios previos han demostrado su potencial para prevenir cáncer de colon en un modelo animal (Vergara-Castañeda *et al.*, 2012), además de tener un efecto quimiopreventivo en células HT-29 de adenocarcinoma humano (Cruz-Bravo *et al.*, 2011).

En el Cuadro 2, se muestra la concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante para estas dos variedades para el grano crudo y después de ser sometido a dos procesos térmicos: cocción tradicional (94 °C/ 2.5 hrs) y horneado (60 °C/12 hrs).

Cuadro 2. Contenido de flavonoides totales y taninos condensados en harinas de frijol común (*P. vulgaris* L.)

Muestra	Flavonoides totales (µg eq. rutina/g muestra)	Taninos condensados (mg eq. (+)-catequina/g muestra)	Capacidad antioxidante* TEAC2 (µmoles equivalentes trolox/g muestra)
FCN	3.29 ± 0.04 ^c	9.89 ± 0.28 ^a	9.05 ± 0.07 ^b
FCCN	1.95 ± 0.05 ^d	8.92 ± 0.15 ^b	11.88 ± 0.34 ^a
FHN	3.84 ± 0.14 ^{b, c}	9.86 ± 0.12 ^a	11.46 ± 0.14 ^a
FCB	3.54 ± 0.135 ^{b, c}	5.68 ± 0.08 ^{c, d}	9.64 ± 0.28 ^b
FCCB	1.56 ± 0.05 ^d	5.26 ± 0.06 ^d	9.75 ± 0.17 ^b
FHB	2.39 ± 0.09 ^d	5.86 ± 0.07 ^{b, c}	10.06 ± 0.49 ^b

FCN- Frijol Negro 8025 crudo, FCB- Frijol Bayo Madero crudo, FCCN- Harina de frijol Negro 8025 cocido y liofilizado, FCCB- Harina de frijol Bayo Madero cocido y liofilizado, FHN- Harina de frijol Negro 8025 horneado, FHB- Harina de frijol Bayo Madero horneado. Los resultados representan la media de tres experimentos independientes ± el error estándar. Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas (p<0.05) en la prueba de Tukey.* Prueba realizada mediante el ensayo de ABTS (Ramírez-Jiménez, 2010)

La cocción tradicional disminuye el contenido de flavonoides y taninos condensados en la semilla, mientras que el método de horneado provoca un aumento de ambos compuestos. Dicho fenómeno se ha observado durante el horneado de *Phaseolus spp.* y otros granos como *Mucuna pruriens*, atribuyéndose a una mejor extracción de compuestos fenólicos por efecto de ruptura de las estructuras membranales de la célula o a la degradación de ciertos compuestos fenólicos insolubles (Siddhuraju y Becker 2001; Boateng *et al.*, 2008).

Diversos ensayos realizados *in vitro*, comprueban la alta capacidad antioxidante del frijol común (Cardador-Martínez *et al.*, 2002; Beninger y Hosfield, 2003; Xu y Chang, 2007; Xu *et al.*, 2007; Aparicio-Fernández *et al.*, 2008). Se ha sugerido que los taninos condensados y fenoles totales presentes

en la cascarilla de la semilla son los responsables de esta capacidad antioxidante (Heimler *et al.*, 2005; Oomah *et al.*, 2005; Gálvez-Ranilla *et al.*, 2007; Xu y Chang, 2007; Xu *et al.*, 2007; Xu y Chang, 2008). Respecto a los métodos de procesamiento, en el estudio de Ramírez-Jiménez (2010), se observa que la cocción tradicional no afecta significativamente el poder antioxidante, mientras que al aplicar un calentamiento seco (horneado) la capacidad antioxidante aumenta. Esta tendencia coincide con la mayor concentración de compuestos fenólicos en las muestras horneadas. De acuerdo a Duenas *et al.* (2005) y Siddhujaru (2006), la estabilidad de compuestos antioxidantes durante el calentamiento seco puede deberse a la formación de compuestos de maillard como el hidroximetilfurfuraldehído (HMF) el cual produce una alta capacidad antioxidante.

1.2.1.2 Fracción no digerible (FND)

Esta fracción de los alimentos se define como la parte resistente a la digestión y absorción en el intestino delgado, por lo cual llega intacta al colon donde sirve como sustrato fermentativo a la microbiota local (Saura-Calixto *et al.*, 2000).

La FND incluye a la fibra dietética soluble e insoluble, almidón resistente, oligosacáridos, ciertos polifenoles, péptidos bioactivos y otros compuestos asociados. Se ha demostrado que la FND tiene un efecto biológico en la disminución de los niveles de colesterol sanguíneo, disminución de riesgo de cáncer de colon y enfermedades cardiovasculares, actividad bifidogénica (Sajilata *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2008), incremento del volumen fecal y beneficios especiales para los diabéticos (Paredes-López y Valverde, 2006). Además, se ha señalado que el almidón resistente de las leguminosas reduce la respuesta glicémica e insulinémica post-prandial en mayor medida que el almidón presente en cereales y tubérculos (Vargas-Torres *et al.*, 2004).

Los valores reportados de fibra dietética total en el grano, van desde 16% hasta 38.29%, de fibra dietética insoluble (FDI) y de 1.3% a 6.92%, de fibra dietética soluble (FDS), dependiendo de la técnica de cuantificación (Carmona-García *et al.*, 2007; Campos-Vega *et al.*, 2009; Ramírez-Jiménez, 2010).

1.2.1.3 Saponinas

Las saponinas son metabolitos glicosilados que contienen agliconas esteroidales o triterpenoides, lo que le proporciona naturaleza anfipática y la propiedad de actuar como detergente (Lorent, *et al.*, 2014). Las saponinas exhiben cierta citotoxicidad, debido a su capacidad para lisar eritrocitos (Francis *et al.*, 2002; Gauthier *et al.*, 2009), sin embargo existe cada vez mayor evidencia acerca de su papel como agente hipocolesterolémico en modelos *in vitro* e *in vivo* (Obloh y Omorfa, 2008; Chávez-Santoscoy *et al.*, 2013).

Las saponinas mayoritarias en frijol común son soyasaponina A (Figura 3) y soyasaponina Bm cuya concentración se encuentra en el rango de 6.79 to 20.83 mg/g y 18.8 to 23.48 mg/g, respectivamente (Guajardo-Flores *et al.*, 2012).

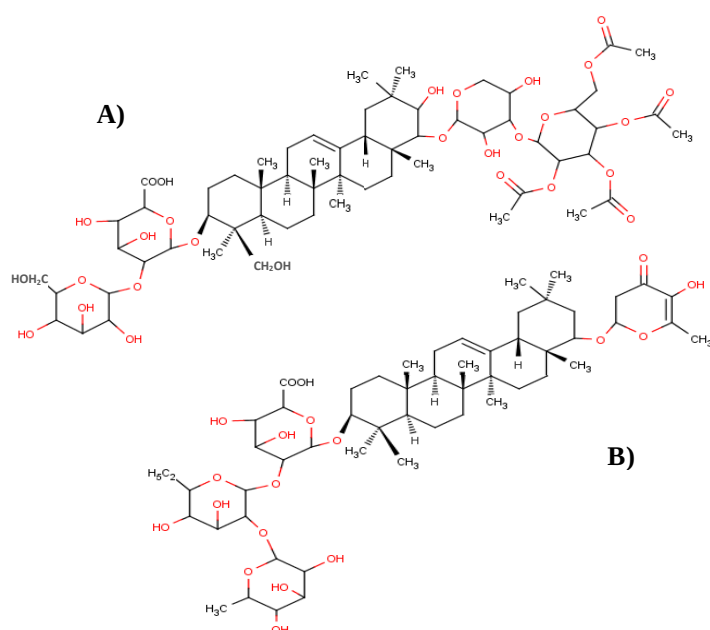


Figura 3. Estructura de las saponinas identificadas en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

A) Soyasaponina Af, B) Soyasaponina ag (Adaptado de Chávez-Santoscoy *et al.*, 2013)

Se sabe que estos compuestos son fermentados en el colon, produciendo metabolitos denominados sapogeninas, una de las cuales, la diosgenina ha

sido asociada con una mayor secreción de colesterol biliar, mejorando su excreción (Kosters *et al.*, 2003).

1.2.1.4 Fitoesteroles

Los fitoesteroles tienen una estructura similar al colesterol, característica que permite la acción de estos compuestos en el lumen intestinal, interfiriendo en la absorción de colesterol hacia el torrente sanguíneo (Ostlund, 2004). En el frijol común, la estructura más abundante es β -sitosterol, seguido de estigmasterol y campesterol (Figura 4). La concentración de β -sitosterol en la semilla se encuentra en el intervalo de 27.2 a 86.5 mg/100g (Ryan *et al.*, 2007; Iriti, *et al.*, 2009; Chávez-Santoscoy *et al.*, 2014).

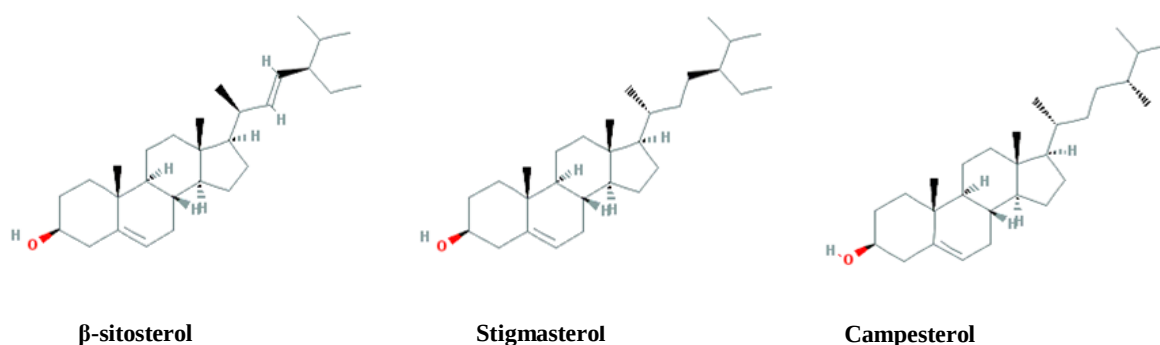


Figura 4. Estructura de los fitoesteroles más abundantes en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

(PubChem Compound, NCBI Database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>)

De acuerdo al Programa Nacional de Educación sobre Colesterol (NCEP, por sus siglas en inglés), la ingesta diaria de 2 g de colesterol reduce los niveles de lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) y el riesgo de enfermedades cardiovasculares (NCEP, 2001).

1.2.2 Mecanismo de acción de compuestos bioactivos de frijol en el metabolismo de triglicéridos

Diversos compuestos provenientes de frijol común tienen un efecto biológico en el metabolismo de lípidos. Los mecanismos mediante los cuales ejercen esta acción, se resumen en la Figura 5.



Figura 5. Mecanismos de acción de fitoquímicos de frijol implicados en la reducción de trigliceridemia

VLDL- lipoproteínas de muy baja densidad (Very Low Density Lipoproteins, por sus siglas en inglés), LDLR- receptor de lipoproteínas de baja densidad, FAS- sintasa de ácidos grasos (Fatty Acid Synthase, por sus siglas en inglés), ACC- acetil-coA carboxilasa, FFAR2- receptor de ácidos grasos 2 (Free Fatty Acids Receptor 2), FFAR3- receptor de ácidos grasos 3 (Free Fatty Acids Receptor 3), AGCC- Ácidos grasos de cadena corta.

1.2.2.1 Regulación de procesos de saciedad y apetito

La regulación de la ingesta de alimentos es el resultado del balance de dos mecanismos principales: apetito y saciedad. La sensación de saciedad está fuertemente asociada al consumo de FND. Dentro de este grupo de

compuestos bioactivos, la fibra dietética insoluble ejerce una acción mecánica incrementando el volumen del bolo fecal y disminuyendo el tiempo de tránsito intestinal (Cummings, 2001), teniendo como resultado una menor absorción de lípidos en el intestino.

Por otra parte, la fibra soluble tiene dos características especiales, la capacidad de retención de agua y fermentabilidad. La capacidad de absorción de agua permite la formación de soluciones muy viscosas, propiedad que induce la disminución en la absorción de lípidos debido a que aumenta su excreción (Cohn *et al.*, 2010), disminuye el vaciamiento gástrico y provoca distensión intestinal aumentando la sensación de saciedad (Schroeder *et al.*, 2013).

La segunda característica importante de la fibra soluble es su facilidad para ser fermentada por la microbiota colónica, produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC) predominantemente ácido acético, butírico y propiónico (Campos-Vega *et al.*, 2009; Hernández-Salazar *et al.*, 2010). Los AGCC ejercen su mecanismo de acción, mediante la activación de dos receptores epiteliales, localizados en las células L intestinales (Yu y Kim, 2012). Específicamente dos receptores acoplados a proteínas G se han identificado como blancos de AGCC: el receptor de ácidos grasos 2 (FFAR2 por sus siglas en inglés, también llamado GPR43) y el receptor de ácidos grasos 3 (FFAR3 también llamado GPR41) (Stoddart *et al.*, 2008). La activación de estos receptores inicia cascadas de señalización que desencadenan la producción de neuropéptidos anorexigénicos o supresores de apetito y la inhibición de hormonas orexigénicas, promotoras del apetito.

Los neuropéptidos secretados por la activación de FFAR2 y FFAR3 son ghrelina (GHRL), una hormona orexigénica, además de colecistoquinina (CCQ), el péptido tirosina-tirosina (PYY) y el péptido similar a glucagón 1 (GLP-1), estos últimos relacionados con la sensación de saciedad (Yu y Kim, 2012).

Nilsson *et al.* (2013), evaluó el efecto del consumo de frijol sobre la regulación de estos neuropéptidos en una intervención clínica con 16 hombres sanos. Los sujetos consumieron frijol como merienda, mientras que un grupo control consumió pan blanco de trigo. Al siguiente, se realizó el análisis de plasma de los participantes, encontrándose un aumento del 51% en PYY, una reducción en ghrelina del 14% y una disminución de apetito del 15%. Los autores

atribuyen esta modulación de neuropéptidos a los SCFA debido a que se encontraron en alta concentración en el plasma del grupo que consumió frijol.

1.2.2.2 Efecto intestinal

A nivel intestinal, es posible disminuir la absorción de triglicéridos y de lípidos en general por diferentes procesos que incluye la disrupción de micelas intestinales, inhibición de lipasa pancreática, regulación de enzimas lipogénicas y una mejora en la depuración de lipoproteínas circulantes.

1.2.2.2.1 Disrupción de micelas lipídicas

Debido al carácter hidrofóbico de los triglicéridos, éstos deben ser primero solubilizados para ser susceptibles a la acción de las enzimas encargadas de su degradación. Los productos de la lipólisis forman micelas mixtas con las sales biliares para su transporte a través del intestino (Sitrin, 2014).

La similitud estructural y anfipática de ciertos fitoquímicos del frijol, tales como saponinas y fitoesteroles, permiten desplazar lípidos como triglicéridos y colesterol de las micelas mixtas (Brown *et al.*, 2010). Este efecto, se ha demostrado en estudios *in vitro* con un modelo de micelas de colesterol, en donde se observó que dos extractos de frijol común, uno rico en fitoesteroles y otro en saponinas, inhibieron la solubilidad micelar en un 14.24%, sugiriendo que la unión de los fitoesteroles da un carácter más hidrofóbico a la micela, reduciendo su absorción (Chávez-Santoscoy *et al.*, 2013; Chávez-Santoscoy *et al.*, 2014).

1.2.2.2.2 Inhibición de lipasa pancreática

La lipasa pancreática (LP) es la enzima encargada de realizar la hidrólisis de triglicéridos antes de ser absorbidos en el intestino. Se ha demostrado que los compuestos fenólicos provenientes de diversas plantas disminuyen la absorción de ácidos grasos libres, mediante un mecanismo de inhibición de la LP (Birari & Bhutani, 2007). Aunque no se tiene el conocimiento de estudios específicos sobre polifenoles de frijol común, se ha demostrado que polifenoles provenientes de otras fuentes tienen actividad inhibitoria sobre la LP, como es

el caso de extractos ricos en polifenoles de te oolong (*Camellia sinensis*), semillas de uva (*Vitis vinífera*) y hojas de mango (*Mangifera indica*) (Naka *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2006)

1.2.2.3 Regulación hepática de enzimas lipogénicas

Se denomina lipogénesis al proceso de síntesis de ácidos grasos y su posterior esterificación y ensamblaje con glicerol para la formación de triglicéridos. En este proceso participan dos enzimas clave: la sintasa de ácidos grasos (FAS por sus siglas en ingles) y la acetil-coA carboxilasa (ACC). ACC es la enzima encargada de catalizar la carboxilación de acetil-coA para producir malonil-coA, molécula que será utilizada en un paso posterior para formar un ácido graso (Tong, 2005). Por otra parte, FAS es un complejo enzimático cuya función principal es catalizar la síntesis de palmitato (un ácido graso de cadena larga de 16 carbonos) a partir de acetil-coA y malonil-coA en presencia de NADPH (NCBI, 2015).

Se sabe que el frijol común tiene un efecto inhibitorio sobre ambas enzimas. Chavez-Santoscoy *et al.*, (2014a) realizó un estudio en el cual un extracto de sitosterol proveniente de la testa de frijol negro (3 mg/ml) redujo la expresión de ARNm y la abundancia de proteínas como FAS y ACC en un cultivo primario de hepatocitos de rata. Además, observó un aumento de la proteína carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT-1), una enzima catabólica implicada en la b-oxidación de triglicéridos.

Se sabe también que el ácido propiónico, uno de los productos de la fermentación colónica de la fracción no digerible de frijol (Campos-Vega *et al.*, 2009; Cruz-Bravo *et al.*, 2011), reduce el proceso de lipogénesis mediante la inhibición de la enzima FAS (Conterno *et al.*, 2011).

1.2.2.4 Depuración de lipoproteínas

Dentro de las lipoproteínas circulantes en el torrente sanguíneo, los quilomicrones y VLDL son las que realizan el transporte de triglicéridos de manera activa. El consumo de frijol ha sido asociado a la disminución de este tipo de lipoproteínas, específicamente, existe un estudio en el que ratas Sprague-Dawley fueron alimentadas con una dieta a la cual se le incorporaron

diferentes proporciones de frijol común. Después de 7 días de consumo, los triglicéridos en sangre disminuyeron en 30% (Zhu *et al.*, 2012). En otro estudio, se encontraron reducciones en triglicéridos y VLDL al adicionar frijol blanco a la dieta de ratas hiperlipidémicas (Abdel-Rahim *et al.*, 2013).

1.2.3 Avena (*Avena sativa*)

La avena común (*A. sativa*) es un cereal importante a nivel global, cuya demanda ha crecido recientemente en el mercado mexicano por su fuerte asociación con una dieta saludable.

La avena se ha distinguido entre los cereales por sus características multifuncionales y su perfil nutricional (Sadiq *et al.*, 2008). La presencia de compuestos nutraceuticos como β -glucanos y algunos antioxidantes han incrementado el interés en este cereal como ingrediente alimentario (FDA, 1997).

1.2.3.1 β -glucanos

Los β -glucanos son los principales elementos de la pared celular del endospermo de la avena y son polisacáridos que consisten en largas cadenas lineales de residuos de glucosa unidos por enlaces β -(1-3) y β -(1-4) (Alminger y Eklund-Jonsson, 2008). Forman parte de la fibra soluble y se cree que son los componentes activos responsables de la reducción de glucosa en sangre y respuesta insulinémica después de una comida alta en este tipo de fibra (Behall *et al.*, 2006). Durante su paso a través del estómago y del intestino delgado, ciertos β -glucanos insolubles son parcialmente convertidos a su forma soluble, formando soluciones altamente viscosas, capaces de atrapar toxinas y otros componentes como glucosa y grasas. Además, no son digeridos hasta que alcanzan el intestino grueso donde son degradados por las bacterias intestinales (Dongowski *et al.*, 2005).

La importancia de estos compuestos ha sido bien documentada y reconocida por la Agencia de Alimentos y Drogas (FDA, 1997). La avena fue uno de los primeros alimentos en ser autorizados para declarar en la etiqueta nutricional beneficios a la salud en casi todas sus presentaciones, incluyendo avena

entera, en hojuelas y harina integral. De manera que cualquier producto elaborado con avena tiene permitido incluir la leyenda “reduce el riesgo de enfermedades del corazón” en su empaque, lo cual significa una ventaja competitiva en el sector de productos funcionales. Si se toma en cuenta, que en México dichos productos no están regulados, un alimento con beneficios avalados por un organismo internacional reconocido cobra gran importancia.

1.2.4 Desarrollo de productos funcionales a base de frijol y avena

El incremento en enfermedades no transmisibles (ENT) en México, como: sobrepeso, obesidad, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y cáncer, ha provocado que un sector muy importante de consumidores incremente el consumo de alimentos nutraceuticos (Sloan, 2009).

El estilo de vida rápido y la incorporación de la mujer al trabajo han impulsado el crecimiento de segmentos enfocados a la elaboración y comercialización de comidas o refrigerios convenientes. Los productos con mayor demanda son aquellos con bajo contenido calórico, reducidos en grasa, o con adición de algún compuesto que represente beneficios a la salud (Sloan, 2009).

Existen algunos estudios que han planteado el desarrollo productos funcionales, que además ofrezcan la ventaja de ser convenientes. En 2009, Anton *et al.*, evaluaron el contenido nutricional de una botana de almidón de maíz fortificada con harina de frijol común (*P. vulgaris* L.), encontrando un incremento sobre todo en proteína. Por su parte, Lazou *et al.*, (2010), evaluaron sensorialmente extrudidos de harina de maíz adicionados con lenteja como una manera de incrementar el contenido de fibra.

En estudios preliminares (Ramírez-Jiménez, 2010), se desarrolló una barra de frijol común y avena que mostró tener un buen perfil nutrimental, comparable con productos que se comercializan en el mercado mexicano. En el Cuadro 3 se muestra la caracterización química y nutraceutica de este producto.

Cuadro 3. Composición química y nutracéutica de barras de frijol (*P. vulgaris*) y avena (*A. sativa*)

	Barra frijol-avena	Barra All-Bran Linaza Integral
Proteína (%)	12.46 ± 0.05	10
Lípidos (%)	14.82 ± 0.10	20
Carbohidratos (%)	62.01 ± 0.11	57
Cenizas (%)	3.89 ± 0.05	-
Humedad (%)	6.80 ± 0.005	-
FDT (%)	13.00 ± 0.08	9.2
FDI (%)	10.80 ± 0.21	-
FDS (%)	2.20 ± 0.003	-
Almidón resistente (mg)	473 ± 0.63	
Rafinosa (mg)	8.22 ± 0.61	
Estaquiosa (mg)	25.34 ± 1.45	
Flavonoides totales ¹	5.64 ± 0.51	
Taninos condensados ²	8.473 ± 0.10	
Capacidad antioxidante ³		
ABTS ³	6.17 ± 0.21	
DPPH ³	9.54 ± 0.13	

FDT- Fibra dietética total, FDI-Fibra dietética insoluble, FDS- Fibra dietética soluble

¹ mg eq. de rutina / g muestra

² mg eq. de (+)-catequina/ g muestra

³ mmoles equivalentes trolox/g muestra

El contenido de proteína ($12.54\% \pm 0.05$) de la barra frijol-avena fue superior al de una barra comercial, además de tener la ventaja de ser reducida en lípidos ($14.86\% \pm 0.18$ en contraste con $>20\%$ en una barra de linaza y avena). Además, la concentración de flavonoides totales (5.64 ± 0.51 mg eq. rutina/g), taninos condensados (8.937 ± 0.11 mg eq. (+)-catequina/g) y oligosacáridos (rafinosa 8.22 ± 0.35 mg/g y estaquiosa 25.34 ± 1.45), fueron equiparables al del frijol común por sí solo. El contenido de fibra dietética de las barras (21.44% del contenido de carbohidratos), estuvo por arriba de lo declarado en una formulación encontrada en el mercado. Los parámetros tecnológicos medidos por pruebas físicas, indicaron que la textura de las barras de frijol y avena fue mejor que una barra comercial, sin embargo, al realizar la evaluación sensorial de las mismas, se encontró que el consumidor prefiere las características sensoriales de los productos ya existentes. En base a estos resultados, se realizó una optimización del producto en cuanto a atributos sensoriales

obteniéndose una formulación aceptable por el consumidor y que conserva sus características funcionales (Gómez-Palomares, 2012).

Tomando en cuenta la evidencia clínica y el potencial de los compuestos bioactivos presentes en frijol como agentes hipolipidémicos, en el presente proyecto se evaluó el potencial funcional de una botana elaborada a base de frijol y avena como una alternativa en la prevención de la hipertrigliceridemia.

En México se comercializan varios productos clasificados en la categoría de productos funcionales, ofreciendo beneficios a la salud pero sin estudios que validen dichas declaraciones. Para que un alimento efectivamente declare propiedades nutraceuticas o funcionales, es necesario tener el sustento científico suficiente.

1.2.5 Legislación de alimentos funcionales

En nuestro país no existe una legislación para la regulación de productos funcionales por lo que muchos productos que declaran reducir factores de riesgo de varias enfermedades crónicas o mejorar la calidad de vida circulan libremente. En el caso de Estados Unidos, la FDA permite la declaración de propiedades que reducen el riesgo de padecer enfermedades, sólo en el caso de que existan evidencias científicas públicamente disponibles (FDA, 1996).

De manera general, aquellos países que permiten la declaraciones de propiedades hacia la salud, lo hacen únicamente si tienen un sustento científico y han sido corroboradas con la población del país destino (Valdés Martínez y Ruíz Ortiz, 2009).

Diversos intentos de demostrar estos beneficios han tenido un enfoque tradicional, mediante estudios *in vitro* o en modelos animales. Los modelos en ratones son la metodología experimental más utilizada para realizar estos ensayos, no obstante, dejando de lado la facilidad de estos modelos, 65 millones de años de evolución indican que existen grandes diferencias entre humanos y ratones, sobretodo en cuanto al ciclo de vida, metabolismo, activación y respuesta inmune (Mestas y Hughes, 2004). Por tanto, a menudo no se pueden realizar recomendaciones concluyentes o válidas del todo al transferir los resultados de experimentos con animales hacia el hombre.

1.2.6 Estudios clínicos de intervención

En los últimos diez años, el número de estudios en humanos se ha incrementado rápidamente. Los estudios clínicos experimentales se utilizan para comparar la eficacia de un determinado tratamiento en el ser humano, comparando la respuesta que muestra un grupo de interés clínico que ha recibido la terapia de prueba con otro grupo control que no recibe tratamiento (Calva-Mercado, 2000).

1.2.6.1 Criterios de inclusión y exclusión

Uno de los puntos importantes para realizar un estudio clínico son las características que los sujetos que participan deben presentar, es decir el establecimiento de criterio de inclusión y exclusión. La variable principal de evaluación en el presente proyecto es la concentración de triglicéridos séricos, por tanto se tomó como criterio principal para la selección de participantes. El intervalo de trigliceridemia se estableció entre 150 y 370 mg/dL, valores que se encuentran entre el límite alto y el máximo permitido antes de iniciar un tratamiento farmacológico con fibratos o niacina (500 mg/dL) (Oh y Lanier, 2007).

Otro criterio a cumplir estuvo en relación al sexo de los participantes. Para reducir la heterogeneidad al escoger una muestra mixta de hombres y mujeres, se decidió trabajar con un solo género. Las mujeres han sido uno de los subgrupos que con mayor frecuencia se consideran para el estudio de condiciones médicas como se describió en el apartado 1.1.3.

La edad de las participantes también fue tomada en cuenta para realizar la selección. El intervalo requerido para la inclusión en el estudio fue de 18 a 49 años, rango establecido de acuerdo a las características del mercado al que está enfocado el producto (Gómez-Palomares, 2012).

Un criterio de inclusión de suma importancia es la firma de un consentimiento informado. De acuerdo a los lineamientos de ética del Código de Helsinki (2000), los participantes deben firmar el consentimiento informado, un documento en donde expresan su aceptación para participar en el estudio y seguir los procedimientos para llevarlo a cabo.

De igual importancia que los criterios de inclusión son los de exclusión, éstos permiten minimizar la heterogeneidad de la muestra de estudio, permitiendo al investigador incrementar la eficacia de la evaluación (Calva-Mercado, 2000). Se excluyen aquellos factores que afecten significativamente los resultados del estudio como presencia de enfermedades crónicas graves, tratamientos farmacológicos o la elevación de marcadores clínicos que no cumplan con lo establecido por la NOM-037-SSA2-2012 para la clasificación de hipertrigliceridemia.

Otro punto a considerar en estudios de intervención, es el tamaño muestral para poder apreciar cambios en los parámetros deseados. Una limitación en la mayoría de los estudios actuales es un tamaño de muestra pequeño, además de tiempos de intervención cortos y el uso de sujetos sanos (Villanueva *et al.*, 2005). De acuerdo a lo reportado por Ramírez-Jiménez *et al.*, (2015) en una revisión que recopila la información de varios estudios clínicos que evalúan el efecto hipolipidémico del consumo de frijol, el tamaño de muestra utilizado es muy variable. El intervalo reportado va de 7 participantes en un estudio longitudinal de 4 meses, a 80 participantes en un estudio paralelo aleatorizado.

1.2.7 Enfoque proteómico: microarreglos de proteínas

Las tecnologías ómicas son una fuerte herramienta para demostrar la efectividad una intervención dietética, además de ayudar a descubrir, medir o validar biomarcadores. El estudio del proteoma, incluye el análisis de conjuntos de proteínas expresadas en un tiempo determinado y bajo ciertas condiciones. La aplicación de esta ciencia a la nutrigenómica provee un panorama general del impacto de compuestos específicos sobre cierto organismo, tejido o célula en un momento particular (García-Cañas *et al.*, 2009).

El valor potencial de la proteómica en la investigación relacionada con el campo de la nutrición, ha sido reconocido en la última década por varios autores (Kussmann and Affolter, 2006; Milner 2007; de Roos, 2008; de Roos and McArdle, 2008). La ventaja principal es que determina el producto funcional de la expresión génica (proteínas) y permite la identificación de modificaciones que se relacionan con la activación o inactivación de las proteínas por efecto de la intervención de la dieta (de Roos, 2010).

La hipertrigliceridemia es una condición fuertemente asociada al metabolismo del tejido adiposo, un órgano que modula la producción de diversas proteínas plasmáticas que son consideradas marcadores de riesgo de obesidad y enfermedades cardiovasculares, sobre todo de aquellas que están involucradas en procesos inflamatorios (van de Woestijne *et al.*, 2011). Ésta condición está mediada por tres mecanismos principales: el aumento en la infiltración local de macrófagos productores de citocinas inflamatorias (Bullo *et al.*, 2003; Weisberg *et al.*, 2003), el aumento en estrés del retículo endoplasmático que provoca la activación de cascadas de señalización inflamatorias como la vía de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK por sus siglas en inglés) y la vía del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B por sus siglas en inglés) (Hotamisligil, 2010), y una mayor liberación de ácidos grasos libres que pueden unirse al receptor tipo Toll 4 (TLR4) lo que exacerba la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), otra importante citocina inflamatoria (Shi *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2007)

1.2.7.1 Microarreglos de proteínas

El desarrollo de la tecnología ha permitido la creación de metodologías mínimamente invasivas y capaces de analizar una vasta variedad de información en relativamente poco tiempo. Existe además una demanda emergente del descubrimiento y validación de nuevos biomarcadores en el campo de enfermedades como obesidad y sobrepeso (Kussmann *et al.*, 2006), así como enfoques que apuntan al desarrollo de dietas personalizadas, para lo cual se hace necesario el uso de tecnologías que manejen grandes volúmenes de información.

Los microarreglos de proteínas son una tecnología de alto rendimiento, que permite el análisis de unas pocas hasta miles de proteínas en un solo análisis. La estructura de un microarreglo consiste en un soporte sólido de vidrio o una membrana en la cual se imprimen anticuerpos para las diferentes proteínas de interés. Dichos anticuerpos se inmovilizan en un espacio delimitado formando una matriz de proteínas de alta densidad (Hu *et al.*, 2011). Actualmente se usan tres tipos, los microarreglos analíticos, los funcionales y los de fase reversa. Los primeros se utilizan usualmente con muestras complejas para

medir afinidad, especificidad y cambios en los niveles de expresión de proteínas (Hall *et al.*, 2007). En esta categoría se encuentran los arreglos de anticuerpos, los más utilizados para diagnóstico clínico. En este tipo de arreglos, una variedad de anticuerpos se inmovilizan a través de uniones covalentes al soporte sólido y se pone en contacto con la muestra; posteriormente se añade un segundo anticuerpo biotinilado que se une al complejo proteína-anticuerpo. El segundo anticuerpo puede ser detectado mediante la adición de estreptavidina, un compuesto con alta afinidad a biotina que comúnmente se conjuga con un fluoróforo (Bertone y Snyder, 2005).

Por otra parte, los microarreglos funcionales contienen proteínas funcionales completas y se utilizan para estudiar actividad bioquímica principalmente interacciones entre proteínas (Hall *et al.*, 2007). Por último, en los microarreglos de fase reversa se utilizan proteínas celulares de la muestra de interés para inmovilizarse en el arreglo, posteriormente anticuerpos contra estas proteínas se añaden y el complejo formado puede medirse mediante técnicas de quimioluminiscencia (Mueller *et al.*, 2010).

III. JUSTIFICACIÓN

En México, la hipertrigliceridemia es el tipo de dislipidemia más común, presentando prevalencias del 55% al 58% de la población total. Se sabe que este desorden es un factor de riesgo para el desarrollo de otras patologías crónicas como obesidad y enfermedades cardiovasculares, la causa principal de mortalidad en nuestro país. La prevención y manejo dietético de la hipertrigliceridemia se ha propuesto como una alternativa efectiva para su atenuación. En este sentido, han surgido recientemente diversos estudios sobre las propiedades hipolipidémicas de alimentos vegetales tradicionalmente consumidos en México, como es el caso del frijol común. De igual manera, se han hecho numerosos esfuerzos para incorporar a esta leguminosa en la formulación de alimentos listos para consumo con un mejor perfil nutricional y funcional.

En investigaciones previas se elaboró un refrigerio a partir de harinas de frijol común y avena, el cual mostró tener un buen perfil nutricional y nutracéutico en estudios *in vitro*. Para poder validar dichas propiedades, es necesario tener un sustento científico adecuado, razón por la que a lo largo de este proyecto, se evalúa el efecto del consumo del refrigerio sobre el nivel de triglicéridos en una población que presenta hipertrigliceridemia, realizando un estudio clínico de intervención.

Debido a que dicha enfermedad tiene un fuerte vínculo con procesos inflamatorios, específicamente con el incremento de citocinas y adipocinas inflamatorias, se determinaron los cambios de ciertas proteínas plasmáticas relacionadas con el metabolismo lipídico.

IV. HIPÓTESIS

El consumo diario de un refrigerio de frijol-avena disminuye el nivel de triglicéridos séricos y el perfil de proteínas plasmáticas en mujeres mexicanas con hipertrigliceridemia.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de un refrigerio de frijol-avena sobre la concentración de triglicéridos séricos y perfil de proteínas plasmáticas en mujeres hipertrigliceridémicas después de 2 meses de consumo.

5.2 Objetivos específicos

- 5.2.1 Caracterizar el perfil nutracéutico de harina de frijol común sometido a diferentes tratamientos térmicos, para la variedad Bayo Madero.
- 5.2.2 Monitorear los cambios en antropometría y composición corporal por efecto del consumo de la barra durante 2 meses de estudio clínico.
- 5.2.3 Determinar el efecto del consumo de una barra de frijol-avena sobre el perfil lipídico y glucosa en sangre.
- 5.2.4 Evaluar la concentración de proteína C-reactiva, insulina, resistencia a insulina y su asociación con hipertrigliceridemia.
- 5.2.5 Estudiar cambios en proteínas plasmáticas relacionadas con el metabolismo lipídico después de 2 meses de consumo del producto mediante microarreglos de proteínas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategia experimental

En la Figura 6 se muestra la estrategia general de la investigación.

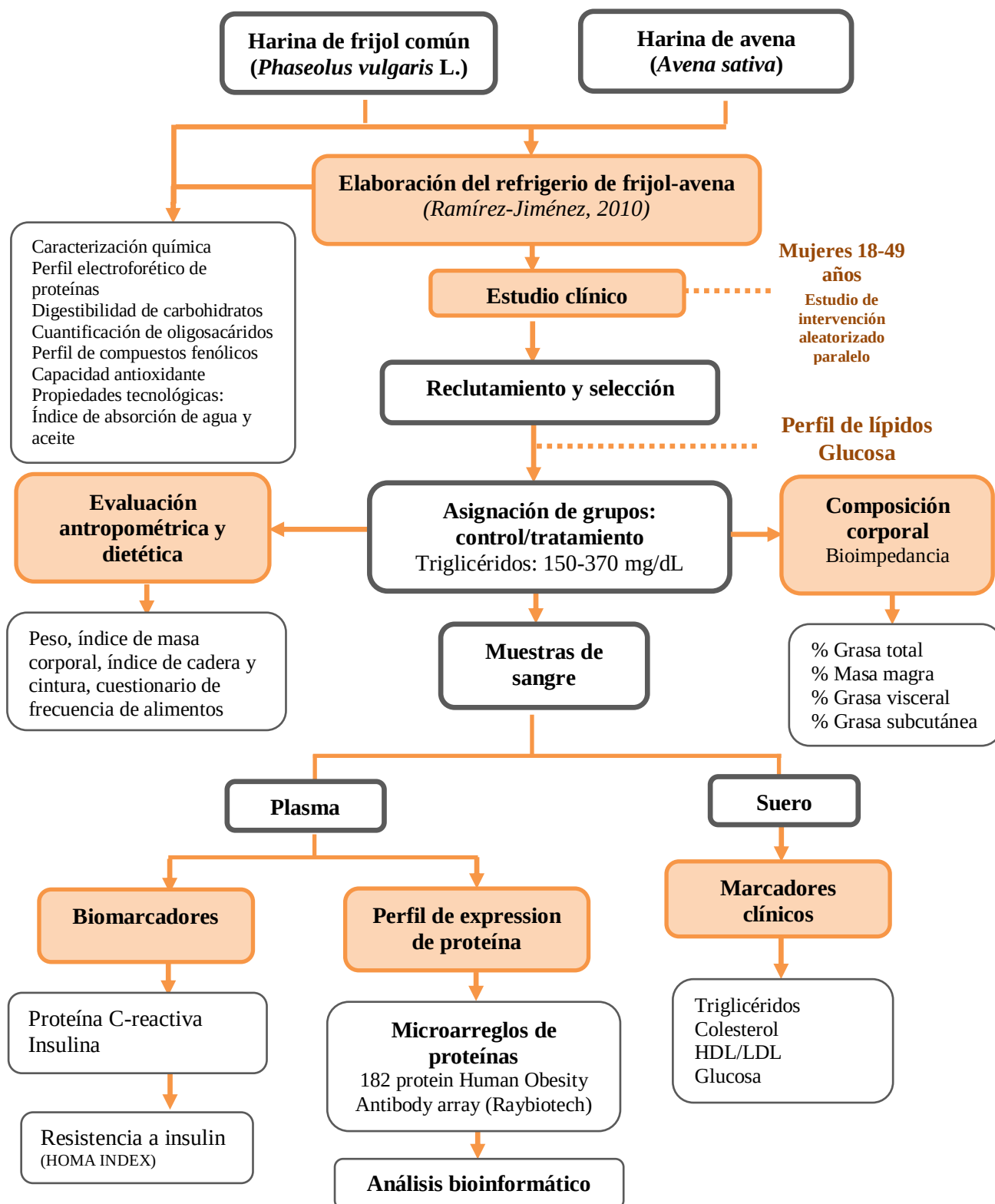


Figura 6. Estrategia experimental del proyecto de investigación

6.2 Materiales biológicos

El refrigerio de frijol-avena se elaboró con frijol común (*P. vulgaris*) de la variedad Bayo, donado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), campo experimental del Bajío. La avena (*A. sativa*) fue comprada en el comercio local en presentación de hojuelas. El resto de los ingredientes para la formulación de las barras fueron obtenidos de comercializadoras de materias primas locales.

6.3 Reactivos

La α -amilasa, proteasa, amiloglucosidasa, tripsina bovina pancreática, α -quimiotripsina bovina pancreática, vainillina, rutina, (+)-catequina, dimetil sulfóxido, rojo de metilo, estándares de rafinosa y estaquiosa, β -mercaptoetanol, así como el kit de glucosa son de la marca Sigma Chemical Co., (USA). El sulfato de sodio y calcio, hidróxido de sodio y potasio, éter etílico, fosfato de sodio y potasio, etanol, ácido clorhídrico, ácido tricloroacético, ácido acético y metanol de la marca J.T. Baker. De igual manera, la rutina, DPPH y trolox fueron adquiridos de Aldrich Chemicals.

La urea, marcador de proteínas (Benchmark Protein ladder), buffer 10X TBE, Glicina ultrapura, TRIS grado MB serán de Invitrogen (Burlington, Ont, Canadá). El kit Protein Assay, DTT, TEMED, Bis-acrilamida 30% y reactivos para isoelectroenfoque de Bio-Rad (Hércules, CA, USA). Las tiras de gradiente inmovilizado 7 cm (Immobiline Drystrip) y el aceite mineral de GE, Healthcare (Uppsala, Suecia). Chaps ultrapure y SDS fueron adquiridos en USB corporation (Cleveland, OH USA).

6.4 Diseño del estudio de intervención

Se realizó un estudio de intervención en paralelo y aleatorizado. Se seleccionaron mujeres adultas en un intervalo de edad de 18 a 49 años, de un grupo de voluntarias que fueron reclutadas en la Ciudad de Querétaro. Las voluntarias fueron citadas en la Clínica Universitaria de Nutrición en la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ, en donde firmaron un formato de consentimiento informado (Anexo I) y llenaron su historia clínica, que consistió

en un cuestionario sobre su registro médico, alimentación y actividad física (Anexo II). Se les realizó un diagnóstico clínico y antropométrico, después del cual, aquellas que presentaron triglicéridos elevados ($150 < TG < 370$ mg/dL) fueron seleccionadas para la formación de los grupos de estudio. Una vez asignados los grupos (tratamiento y control), ambos recibieron orientación nutricional al inicio del estudio (Anexo III). El grupo tratamiento consumió además una porción de 50 g de producto (equivalente a 6 barras) diariamente durante dos meses.

Los grupos se conformaron de la siguiente manera:

- Grupo 1 (tratamiento): Administración de barra frijol-avena a individuos con diagnóstico de triglicéridos séricos $>150 - < 370$ + orientación nutrimental
- Grupo 2 (control): Individuos con diagnóstico de triglicéridos séricos $>150 - < 370$ + orientación nutrimental

El apego al tratamiento fue monitoreado de manera semanal de acuerdo al formato que se muestra en el Anexo IV, mismo que se llenaba el día de la entrega de producto. Las participantes registraron el consumo de alimento diario en el formato indicado en el Anexo V, el cual entregaban de manera semanal.

6.4.1 Criterios de inclusión

- Mujeres, de 18 a 49 años de edad
- Participación voluntaria
- Firma de consentimiento informado
- Presentar hipertrigliceridemia aislada ($150 < TG < 370$ mg/dL), definida según los criterios del Panel de tratamiento para adultos III (ATP III por sus siglas en inglés), sin tratamiento farmacológico actual.
- Consumo habitual de frijol o gusto por este alimento

6.4.2 Criterios de exclusión

- Presencia de patologías crónicas severas como diabetes mellitus II, hipertensión arterial no controlada, síndrome de intestino irritable y/o cualquier tipo de cáncer.
- Tratamientos farmacológicos antiinflamatorios
- Valores de glucosa > 100 mg/dL, colesterol total > 240 mg/ dL, colesterol ldl > 160 mg/dL
- Intolerancias alimentarias referidas por interrogatorio, que les impidan el consumo de alimentos con fibra, o presenten malestar ante el consumo de frijol.

6.4.3. Criterios de eliminación

- Aquellos que una vez iniciado el estudio requieran un tratamiento médico
- Quienes no cubran con todas las evaluaciones requeridas durante el estudio.
- Sujetos que voluntariamente decidan no participar una vez que iniciaron el estudio, inflamación aguda, disminución drástica de peso reciente, o que estén bajo medicación que influya en la investigación.
- Quienes obtengan un apego menor del 90% medido semanalmente
- Aquellos que a criterio del investigador ameriten ser eliminado si fuera necesario.

La totalidad del estudio, se realizó siguiendo los lineamientos de ética del Código de Helsinki incluyendo un documento para firma de consentimiento informado. Este estudio fue sometido a evaluación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales (FCN) de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), obteniendo la aprobación el 4 de Octubre de 2013 (Anexo VI).

6.4.4 Reclutamiento

La convocatoria para participar en el estudio se hizo por medios escritos y orales, en forma de cartel o poster que fueron pegados en las diferentes

facultades de la UAQ, así como en centros de investigación y centros médicos. También se distribuyeron volantes en lugares de reunión como cafeterías y salidas de la Universidad, centros de investigación y clínicas. Dicha convocatoria contenía información con una breve introducción sobre los beneficios del consumo de frijol, descripción del estudio, criterios de inclusión, beneficios y contacto.

6.4.5 Evaluación nutricional y clínica

Una vez que se realizó el reclutamiento, las interesadas asistieron a la Clínica de Nutrición de la FCN en la UAQ campus Juriquilla. El proceso que se siguió para la selección de los sujetos se describe a continuación:

1. Se les informó verbalmente sobre el proceso de selección y las evaluaciones que se realizarían en esa sesión y a lo largo del estudio, incluyendo una descripción del consentimiento informado y llenado de la historia clínica.
2. Una vez que el consentimiento se firmó, se procedió a tomar las muestras sanguíneas por parte de personal de la clínica Universitaria de Nutrición.
3. Se determinó la composición corporal mediante un equipo de Bioimpedancia eléctrico Scan Plus II. Posteriormente se tomaron medidas antropométricas, peso y talla. Estas evaluaciones las realizaron dos nutriólogas de la FCN que fueron capacitadas para tal propósito.
4. Las participantes acudieron al centro de cómputo de la FCN para realizar un cuestionario de frecuencia de alimentos validado por dicha facultad (Galván-Portillo, *et al.* 2011).
5. Los resultados se entregaron por escrito a cada una de las participantes y se les notificó la asignación al estudio clínico.
6. El total de participantes se aleatorizó en los dos grupos de estudio y se procedió a dar una sesión de orientación nutrimental basada en los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2005.

6.4.6 Historia clínica y antropometría

La historia clínica se construyó en base a los antecedentes personales médicos, patológicos, familiares, así como el registro de consumo de medicamentos y factores de estilo de vida (ejercicio y dieta).

Las mediciones antropométricas tomadas de manera adecuada son un indicativo del estado nutricional del individuo. Este procedimiento se realizó en base a los criterios establecidos por el Panel de Tratamiento para Adultos III (ATP III por sus siglas en inglés) y fue ejecutado por dos nutriólogas de la FCN, las cuales han sido estandarizadas en esta técnica. Las mediciones realizadas fueron: peso, estatura, circunferencia de cintura y cadera.

El índice de masa corporal (IMC) puede calcularse a partir de estos datos con la siguiente fórmula:

$$\text{IMC} = \text{Peso (Kg)} / \text{Estatura (m)}^2$$

En esta ocasión, el IMC se obtuvo por medio de un equipo de Bioimpedancia eléctrica.

En cuanto a la circunferencia de cintura y cadera, de acuerdo al ATP III, una circunferencia de cintura mayor a 88 cm y un índice de cintura-cadera (ICC) mayor a 0.8 conllevan un riesgo alto de desarrollar síndrome metabólico.

$$\text{ICC} = \text{Circunferencia de cintura (cm)} / \text{Circunferencia de cadera (cm)}.$$

En el Cuadro 4 se muestran los valores de referencia para la clasificación poblacional del estado nutricional de acuerdo al IMC.

Cuadro 4. Clasificación del estado nutricional de acuerdo al índice de masa corporal

Categoría	IMC (Kg/m²)
Bajo peso	18.5
Normal	18.5 - 24.9
Sobrepeso	25.0 - 29.9
Obesidad grado I	30.0 - 34.9
Obesidad grado II	35.0 - 39.9
Obesidad grado III (extrema)	> 40.0

(ATP III, 2012)

6.4.7 Evaluación de hábitos alimenticios

6.4.7.1 Frecuencia de consumo de alimentos

Este cuestionario brinda información sobre la frecuencia con la que cierto alimento es consumido en un periodo de tiempo, en este caso, un año. El cuestionario que se aplicó en el presente estudio ha sido estandarizado por la FCN para contestarse directamente en un equipo de cómputo, con una hoja de cálculo de Excel. Los grupos de alimentos incluidos en el cuestionario son cereales, lácteos altos en grasa, lácteos bajos en grasa, frutas, verduras, leguminosas, aguacate, aceites vegetales, grasas animales, pescados y mariscos, carne roja, aves, huevo, carne procesada, cereales refinados, cereales integrales, alcohol y azúcares agregados.

Esta sesión fue dirigida por dos nutriólogas de la FCN que estuvieron presentes para dar las instrucciones de llenado del cuestionario, indicaciones sobre porciones de alimentos y ayudar a contestar el formato a las personas que no sabían utilizar la computadora.

6.4.8 Orientación nutricional

Para la orientación nutricional se realizaron dos sesiones por día con grupos de 10 personas cada una. La encargada de llevar a cabo esta parte de la metodología fue una nutrióloga del Posgrado de Alimentos del Centro de la República.

El objetivo general de esta orientación fue dar a conocer de manera general los grupos alimentarios y la manera de tener una alimentación adecuada. De acuerdo a la NOM-037-SSA2-2012, para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias una vez que se detectan niveles elevados de TG se debe proceder a dar recomendaciones nutrimentales.

Para ambos grupos de estudio, se les dio a conocer el plato del bien comer, se les explicó cómo están conformados los diferentes grupos alimentarios y se les entregó una formato con el Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes.

Para el grupo que consumió el refrigerio, esta sesión también tuvo la finalidad de hacer énfasis en la sustitución de alimentos altamente calóricos, que generalmente se consumen entre comidas, por el refrigerio de frijol-avena. La manera en que se recomienda consumir el producto, es como refrigerio o colación entre comidas y se resaltó el hecho de que no pretende sustituir una comida completa.

La distribución de la ingesta calórica que se recomendó fue la siguiente:

- Carbohidratos 55%
- Proteínas 20%
- Grasas – 25%
 - o Relación grasas saturadas, poliinsaturadas y monoinsaturadas 1:1:1
- Fibra > 30 g/día

Durante esta sesión se les indicó la manera de llenar los formatos de adherencia a las recomendaciones y consumo de la barra, que se describen en el anexo IV. Estos formatos se usaron para monitorear el consumo del producto, agrado, satisfacción y apego de las mujeres al consumo del refrigerio. En el caso de aquellas que sólo recibieron orientación alimentaria, se monitoreó el consumo de alimentos y calorías a lo largo del estudio.

6.4.9 Dieta y administración de la barra

Las participantes del estudio consumieron una dosis de 50 g (6 barras) diariamente a lo largo de 2 meses. La forma de consumo fue como refrigerio

dividido en dos tomas, una por la mañana y una por la tarde. Es importante resaltar que la ingesta de este producto, tuvo como propósito ser un refrigerio solamente y no sustituir las comidas principales.

6.4.9.1 Características del refrigerio

El refrigerio administrado consistió en una barra elaborada a partir de harina de frijol (30%) y avena (24%), como lo describe Ramírez-Jiménez (2010). Se trata de un producto crujiente, tipo botana laminada que tiene la ventaja de portabilidad, conveniencia y facilidad de consumo. No necesita refrigeración para almacenamiento y puede consumirse sólo o acompañado.

La presentación para el consumidor es en empaque metalizado con barrera a la luz, humedad y oxígeno. Cada paquete contiene 6 barras de dimensiones 70mm x 40mm x 4 mm.

Las barras se elaboraron en las instalaciones del Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC), Facultad de química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), en donde se tiene montada una pequeña planta piloto exclusiva para la producción de este producto. La preparación de las barras estuvo a cargo de 6 alumnos de la carrera de Ingeniero Químico en Alimentos, bajo los lineamientos que marcan las buenas prácticas de manufactura (NOM-120-SSA1-1994) y en conformidad con la NOM-187-SSA1/SCFI-2002. En la Figura 7 se describe la forma de elaboración del refrigerio.

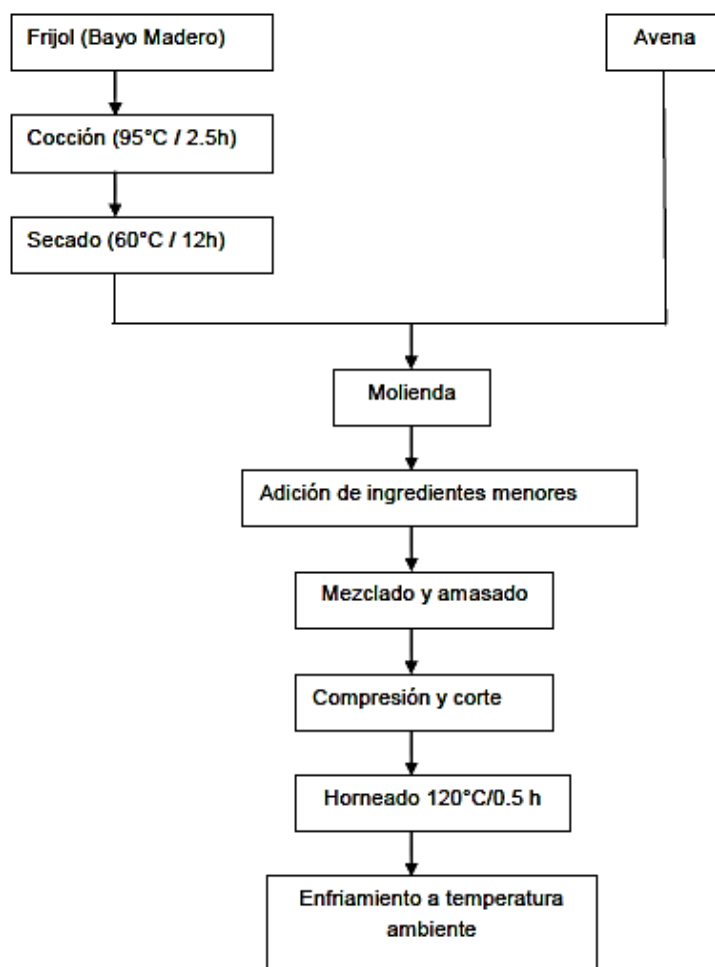


Figura 7. Diagrama de flujo de la elaboración de la barra de frijol-avena

En cuanto al contenido nutrimental, una porción diaria del refrigerio (50 g) tiene un contenido energético de 310 kcal. Proporciona 46.63 g de carbohidratos, de los cuales 13.6 g son de fibra dietética total, 14.68 g de proteína y 7.34 g de grasas. Esta cantidad es equivalente a 85.7 g de frijol cocido.

6.4.10 Evaluación de cambios en antropometría y composición corporal

La evolución del peso, índice de masa corporal (IMC), porcentaje de grasa corporal, grasa visceral, masa magra, cintura y cadera de las participantes se midió de manera semanal usando un equipo portátil Omron de Bioimpedancia modelo Hbf 501.

6.5 Evaluación clínica

Las muestras de sangre se recolectaron después de un ayuno de 12 h, realizándose una toma al inicio del tratamiento y al final (después de 2 meses). Éste procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones de la clínica de nutrición de la FCN.

Para tal propósito, se realizó una venopunción en el brazo para la extracción de sangre hacia tubos de vacío (Vacutainer) con tapón morado, que contienen EDTA como anticoagulante, con tapón amarillo sin anticoagulante y con tapón verde conteniendo heparina de sodio. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta su uso posterior. El fluido se procesó dentro de las 4 horas siguientes para la separación de suero y plasma, después de lo cual se procedió inmediatamente al almacenamiento a -70 °C.

6.5.1 Perfil de lípidos y glucosa basal

La sangre sin anticoagulante se utilizó para separar el suero y determinar el perfil lipídico y glucosa basal. Para tal propósito, los tubos vacutainer se centrifugaron a 2500 RPM durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf para almacenarse en alícuotas de 500 µl.

La determinación de triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL se realizó mediante un método espectrofotométrico, utilizando el kit comercial Spinreact (Spinreact, S.A.Girona, España) y el equipo Mindray BS-120 (DS, EUA).

Las muestras almacenadas en tubos con anticoagulante se utilizaron para aislamiento de plasma. Para tal propósito, los tubos vacutainer se centrifugaron a 2500 RPM durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf para almacenarse en alícuotas de 500 µl.

6.5.2 Proteína C-reactiva ultrasensible (us-PCR)

La cuantificación de proteína C-reactiva ultrasensible se realizó en plasma, mediante el kit inmunoenzimático hs-CRP de la marca Accubind (Monobind Inc, Lake Forest, USA).

En este método se utilizaron placas de 96 pozos, cada uno recubierto de una capa de estreptavidina, un compuesto de alta afinidad por la biotina. Al agregar una solución que tiene una mezcla del anticuerpo secundario biotinilado, el anticuerpo primario unido a la enzima peroxidasa de rábano picante y un colorante, se forma un complejo entre la streptavidina y la biotina, permitiendo que la mezcla quede fija en el fondo del pozo. Posteriormente se agrega la muestra que contiene el antígeno (proteína C-reactiva) que se unirá a su respectivo anticuerpo y el peróxido de hidrógeno (sustrato de la enzima peroxidasa), la reacción que se lleva a cabo emite una coloración que puede leerse en un espectrofotómetro y es proporcional a la cantidad de antígeno. La concentración de los compuestos de interés se puede obtener mediante una de calibración con soluciones de concentración conocida.

El procedimiento para realizar esta técnica estuvo de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

1. Se diluyó la solución concentrada diluyente de suero a 200 ml con agua desionizada o destilada. La solución se almacenó a 4°C.
2. Para la preparación de la solución de lavado, se diluyó el contenido del frasco con la solución concentrada a 1000 ml y se almacenó a temperatura ambiente (máximo 60 días).
3. Se preparó la solución de trabajo necesaria para la cantidad de muestras, mezclando volúmenes iguales del reactivo seña A y reactivo señal B. Una vez preparada, esta mezcla debe usarse dentro de las 36 h siguientes.
4. Las muestras de plasma se diluyeron en una proporción 1:200 antes de realizar el análisis, para lo cual se tomaron 10 µl del espécimen de cada paciente en 2 ml de diluyente de suero.
5. Para el análisis se realizaron duplicados de todas las muestras y se realizó una curva estándar utilizaron los calibradores proporcionados por el kit cuya concentración estuvo en el intervalo de 0 a 300 µg/ml del antígeno de proteína C-reactiva.
6. Se añadieron 25µl de calibrador o muestra en los pozos designados en la placa y se añadieron 100 µl del reactivo de la enzima us-PCR

(conteniendo IgG monoclonal de ratón biotinilada y anti us-PCR conjugado con peroxidasa de rábano picante) a cada pozo.

7. Se agitó suavemente por 20-30 segundos para mezclar y posteriormente se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el contenido de la placa se decantó completamente y se agregaron 350 µl de solución de lavado.
8. Se repitió el paso 7 dos veces para completar tres lavado, inmediatamente se agregaron 100 µl del reactivo de trabajo a todos los pozos y se incubó por 15 min.
9. Se agregaron 50 µl de la solución stop agitando durante 20-30 s. La placa se leyó en un espectrofotómetro de la marca varioskan dentro de los 30 minutos siguientes a 450nm. Los resultados se reportaron en µg/ml.

6.5.3 Resistencia a insulina

La cuantificación de insulina se realizó en plasma, mediante el kit Rapid Insulin Test de la marca Accubind (Monobind Inc, Lake Forest, USA). El fundamento de la técnica es el mismo que se describió para la cuantificación de us-PCR en la sección 6.5.2.

El procedimiento para realizar esta técnica estuvo de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

1. Se preparó la solución de lavado diluyendo el contenido del frasco con la solución concentrada a 1000 ml y se almacenó a temperatura ambiente (máximo 60 días).
2. Para el análisis se realizaron duplicados de todas las muestras y se realizó una curva estándar utilizaron los calibradores proporcionados por el kit cuya concentración estuvo en el intervalo de 0 a 300 µUI/ml de insulina.
3. Se añadieron 50 µl de calibrador o muestra en los pozos designados en la placa y se añadieron 100 µl del reactivo del reactivo enzimático de insulina (que contiene IgG x-insulina monoclonal de ratón marcada con

una enzima, x-insulina IgG purificada monoclonal de ratón biotinilizada) a cada pozo.

4. La placa se agitó suavemente por 20-30 segundos para mezclar y posteriormente se incubó por 60 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el contenido de la placa se decantó completamente y se agregaron 350 µl de solución de lavado.
5. Se repitió el paso 7 dos veces para completar tres lavado, inmediatamente se agregaron 100 µl del reactivo de trabajo a todos los pozos y se incubó por 15 min.
6. Se agregaron 50 µl de la solución stop agitando durante 15-20 s. La placa se leyó en un espectrofotómetro de la marca varioskan dentro de los 30 minutos siguientes a 450nm. Los resultados se reportaron en µUI/ml.

La resistencia a insulina se determinó mediante el cálculo del índice HOMA de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{HOMA} = \text{glucosa} * \text{insulina} / 405$$

6.6 Métodos analíticos

6.6.1 Preparación de las muestras

Las semillas crudas se molieron finamente (KRUPS GX4100, México) hasta pasar por un tamiz malla 60 y se almacenaron en bolsa de papel y polietileno a 4°C hasta su uso posterior.

Para la cocción, las semillas de frijol común se sometieron a un tratamiento térmico de acuerdo a la metodología descrita por Aparicio-Fernández *et al.*, (2005). Brevemente, se pesaron 500 g de muestra y se agregarán 2.5 L de agua destilada. La cocción se llevó a cabo por 2.5 hrs a 90 °C ± 1 en un plato caliente marca Corning. Una vez terminado el tratamiento, se tomaron 500 g de frijol incluyendo el agua de cocción, se dejaron enfriar a temperatura ambiente para después congelarse a -70 °C por 24 h. Posteriormente se liofilizaron 150g, se molieron, tamizaron y almacenaron como se indicó para frijol crudo.

El resto del frijol cocido se secó en un horno de convección marca Felisa (Hafo series 1600). La muestra (500 g incluyendo el agua de cocción) se transfirió a

charolas de aluminio procurando tener un espesor de 1cm y se secó a 60 °C por 12 h. Una vez transcurrido este tiempo, el frijol se enfrió a temperatura ambiente, se molió, tamizó y almacenó hasta realizar los análisis correspondientes.

En cuanto al refrigerio de frijol-avena, las muestras se prepararon siguiendo el procedimiento descrito por Ramírez (2010) y optimizado por Gómez-Palomares (2012) como se describió en la Figura 7. El producto final se molió hasta pasar por una malla 60 y se almacenó en bolsas plásticas a 4°C hasta su uso.

6.6. Cuantificación de compuestos fenólicos.

La cuantificación se llevó a cabo en el extracto metanólico de las muestras en estudio.

6.6.2.1 Extracto metanólico

Para obtener el extracto metanólico de acuerdo al método descrito por Cardador-Martínez *et al.* (2002), se colocó 1 g de muestra en un matraz y se adicionaron 10 ml de metanol. Se cubrieron los frascos con papel aluminio y se agitaron durante 24 h a 25°C. Pasado este tiempo, el extracto se transfirió a tubos Corning de 50 ml y se centrifugó a 5000 RPM por 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se utilizó para la cuantificación de compuestos fenólicos por métodos espectrofotométrico, por HPLC y para determinación de capacidad antioxidante.

6.6.2.2 Cuantificación de taninos condensados

Se utilizó la metodología descrita por Deshpande y Cheryan (1985,1987) con las modificaciones sugeridas por Feregrino-Pérez *et al.* (2008) para su adaptación en microplaca. Se colocaron 50 µl del extracto metanólico en los pozos de la microplaca y se adicionaron 200 µl de reactivo de vainillina 1% - HCl 8% (1:1). Las muestras se analizaron por triplicado a una absorbancia de 540 nm en un espectrofotómetro Thermo Electron Corporation (Multiskan AscentR, Model 51118307). Las lecturas se compararon contra una curva estándar de (+)-catequina con un intervalo de 0-1 mg/ml del estándar de

referencia. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de (+)-catequina/gr muestra.

6.6.2.3 Cuantificación de flavonoides totales

De acuerdo al método de Oomah *et al.* (2005), se colocaron 50 μ l del extracto metanólico en la microplaca y se adicionaron 180 μ l de agua destilada, seguido de 20 μ l de solución de 2-aminoetil-difenilborato al 1% en metanol. Las muestras se analizaron a una absorbancia de 404 nm en espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, Multiskan AscentR, Model 51118307). Los resultados, se compararon contra una curva estándar de rutina con un intervalo de 0 a 50 μ l/ml, siendo expresados como mg equivalentes de rutina por gramo de muestra.

6.6.3 Capacidad antioxidante

6.6.3.1 Determinación de capacidad antioxidante por el método ABTS.

El ensayo se realizó siguiendo la metodología propuesta por Nenadis *et al.* (2004) con algunas modificaciones. Brevemente, en una placa de 96 pozos se añadieron 0.02 ml de extracto metanólico (expresado como 100 μ M equivalentes de (+)-catequina) y se agregaron 230 μ M de la solución preparada de ABTS (5 ml de una solución acuosa de ABTS 7mM y 88 μ l de una solución de persulfato de sodio ($K_2S_2O_8$) a 140 mM para obtener una concentración final de 2.45 mM, después de almacenarla en oscuridad durante 16 hrs, la solución que contiene el radical se diluyó en etanol hasta que el valor inicial de absorbancia alcanzado fue de 0.7 ± 0.5 a una λ de 734 nm). Tanto el extracto metanólico como los estándares se prepararon por triplicado. La placa se leyó al tiempo 0, 10, 30, 60, 90 y 120 min a 520 nm en un espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, Multiskan AscentR, Model 51118307), manteniéndose cubierta de la luz entre lecturas. La capacidad antioxidante se expresó como μ g equivalentes de Trolox (TEAC).

6.6.3.2 Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH.

Se utilizó el método original de Brand-Williams *et al.* (1995) modificado por Fukumoto y Mazza (2000) adaptado para su uso en microplaca. Brevemente, en una placa de 96 pozos se añadieron 0.02 ml de extracto metanólico

(expresado como 100 µM equivalentes de (+)-catequina) y 0.2 ml de solución de DPPH (150 µM). Tanto el extracto metanólico como los estándares se prepararon por triplicado. La placa se leyó al tiempo 0, 10, 30, 60, 90 y 120 min a 520 nm en un espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, Multiskan AscentR, Model 51118307). La placa se mantuvo cubierta de la luz entre lecturas. La actividad antirradical (ARA) se calculó como el porcentaje de inhibición de DPPH, usando la siguiente ecuación (Burda & Oleszek, 2001):

$$ARA = 100 \times (1 - A_{\text{muestra}} / A_{\text{control}})$$

Dónde:

A muestra= la absorbancia de la muestra a 520 nm

A control= la absorbancia del control (ausencia de antioxidante)

6.6.3.3 Determinación del perfil de compuestos fenólicos por HPLC

6.6.3.3.1 Obtención de extractos de fenoles libres y ligados

Para determinar la totalidad de compuestos fenólicos tanto libres como ligados a alguna macromolécula o pared celular, se analizó el extracto de fenoles libres y el extracto después de una hidrólisis básica de acuerdo a la metodología de Aguayo-Rojas *et al.*, 2012. Brevemente, se obtuvo el extracto de fenoles libres, a partir de una muestra de 0.5 g de harina de frijol desgrasada, que fue adicionada con 10 ml de una mezcla fría de etanol-agua (80:20, v/v) y agitada en un plato magnético por 10 min a 50 rpm. La solución se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Este extracto fue concentrado en el rotavapor a 45°C hasta tener un volumen final de 2 ml, el cual fue almacenado a -20°C protegido de la luz hasta su posterior uso.

Para obtener el extracto de fenoles ligados la pastilla obtenida por centrifugación se resuspendió en 20 ml de NaOH 2 M y se le inyectó nitrógeno gaseoso para desplazar el aire presente en el espacio de cabeza antes de realizar la digestión. Posteriormente, las muestras se hidrolizaron a 95 °C/ 30 min y a 25 °C/ 60 min en un plato de agitación magnético. Se agregó una cantidad suficiente de HCl para neutralizar el NaOH. La solución obtenida se lavó 5 veces con 10 ml de acetato de etilo, aspirando cuidadosamente fase

superior y transfiriéndola a un tubo nuevo en cada ocasión. Finalmente, los extractos se rotaevaporaron hasta sequedad a 45 °C. Las muestras fueron almacenadas en viales protegidas de la luz a -20 °C hasta su uso posterior.

6.6.3.3.2 Determinación de compuestos fenólicos presentes en extractos de fenoles libres y ligados por HPLC

Las muestras del extracto de fenoles ligados resuspendidas en 2 ml de etanol y el extracto de fenoles libres se transfirieron a una columna Sep-Pak (Waters) previamente equilibrada con metanol. Se hicieron cuatro lavados con diferentes eluyentes en el siguiente orden para obtener cuatro fracciones:

F1: 6 ml de agua grado HPLC a pH 7

F2: 6 ml de acetonitrilo al 16%

F3: 6 ml acetato de etilo puro

F4: 2 ml de etanol al 80%

Cada una de las fracciones fue rotaevaporada hasta sequedad bajo las condiciones antes descritas (ver sección 6.6.2.3.1) y resuspendidas en 2 ml de metanol. Para el análisis en HPLC se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6 x 250 mm 5. µm. La fase móvil fue acetonitrilo:agua (ácido acético 1%) en una proporción 90:10 con un flujo de 1 ml/min. Se inyectaron 20 µl de muestra y cada corrida fue de 15 minutos. Para obtener la identificación y cuantificación de los compuestos se utilizaron los siguientes estándares: catequina, rutina, quercetina, vainillina, ácido elágico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido clorogénico y ácido sinápico.

6.6.3.3.3 Determinación de compuestos fenólicos presentes en la barra de frijol común

6.6.4 Determinación de fibra insoluble

La extracción de la fracción insoluble se llevó a cabo por el método de Shiga *et al.* (2003), en donde por cada gramo de frijol pulverizado y liofilizado se adicionaron 50 ml de buffer de fosfato 0.08 mM a pH 6, el pH se ajustó con NaOH 0.275N. En seguida se adicionaron 100 µl de α-amilasa (0.1 ml). El frasco tapado y protegido de la luz se incubó en baño María a 95 °C por 30

min, agitando cada 5 min, después se atemperó y ajustó el pH a 7.5 con NaOH 0.275N.

Posteriormente se adicionaron 100 µl de proteasa (5 mg/ml) y se incubó en baño María a 60 °C por 30 min con agitación continua. La muestra se atemperó y se ajustó el pH a 4-4.6 con HCl 0.375N. Se adicionaron 300 µl de amiloglucosidasa y se incubó nuevamente en un baño de agua por 30 minutos a 60 °C con agitación continua. Al término de la incubación, la muestra se centrifugó a 3500 RPM para después decantar el sobrenadante que se recuperó en matraces de 250 ml. El residuo de la centrifugación corresponde a la fibra insoluble, el cual se pesó y se reportó en porcentaje en base al contenido de carbohidratos.

Fibra insoluble (%) = $\left[\frac{\text{Peso de la pastilla}}{\text{peso de muestra}} \right] \times \% \text{ de carbohidratos} \times 100$

6.6.5 Determinación de fibra soluble

Al sobrenadante recuperado en el apartado 5.6.3 se le adicionó un volumen igual de etanol al 80% y se dejó reposar a temperatura ambiente por 24 hrs. Pasado este lapso de tiempo, se filtró en papel filtro Whatman No. 42, haciendo dos lavados con 10 ml de etanol al 80% y otros dos con 10 ml de acetona. El filtro se dejó secar por 24 hrs en estufa a 60 °C, después de lo cual se atemperó en desecador y se registró el peso. El cálculo de la fibra soluble se realizó de la siguiente manera y se reportó como porcentaje en base al contenido de carbohidratos:

Fibra soluble (%) = $\left[\frac{(\text{Peso filtro} + \text{muestra}) - (\text{peso filtro})}{\text{peso de muestra}} \right] \times \% \text{ de carbohidratos} \times 100$

6.6.6. Cuantificación de almidón resistente

Se realizó mediante la metodología descrita por Saura-Calixto *et al.* (1993) y Shiga *et al.* (2003). Partiendo de la fracción insoluble de la fibra dietética que se extrajo de las muestras, se pesaron 100 mg. Posteriormente se adicionaron 6 ml de KOH 2 M y se mantuvo en agitación continua por 30 min a temperatura ambiente. Se agregaron 3 ml de buffer de acetato de sodio (0.4 M,

pH 4.73) y se ajustó a pH 4.75 con HCl 2N. Enseguida se adicionaron 60 µl de amiloglucosidasa, se mezcló e incubó a 60 °C por 30 min con agitación continua y se centrifugó a 3000 g en una centrífuga Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik, Alemania) por 15 min. Después de recuperar el sobrenadante, el residuo obtenido se resuspendió en 10 ml de agua destilada y se centrifugó nuevamente, hasta completar 2 lavados más. Los sobrenadantes recuperados se unieron y se cuantificó el porcentaje de glucosa por medio del Kit Glucose GO assay (Sigma -Aldrich, St. Louis, MO, EUA). El porcentaje de almidón resistente se calculó como se indica en la siguiente fórmula:

$$\text{Almidón resistente (\%)} = [(\% \text{ glucosa} \times 0.9) / \text{peso de muestra}] \times \% \text{ Carbohidratos} \times 100$$

6.6.7 Digestibilidad de carbohidratos

6.6.7.1 Almidón total

La determinación de almidón total se llevó a cabo mediante la técnica de Goñi *et al.*, 1997. Brevemente, se pesaron 50 mg de muestra en base seca en tubos de centrifuga de 50 ml, se añadieron 3 ml de agua destilada + 3 ml de KOH 4M y se dejó en agitación constante durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió 3 ml de regulador acetato de sodio 0.4M (pH 4.7) + 5.5 ml de HCl 2M y se ajustó a pH de 4.75. Se agregaron 60 µl de amiloglucosidasa y se incubó en baño de agua a 60 °C con agitación durante 45 min. Posteriormente, se centrifugó a 3000 g durante 15 min recuperando el sobrenadante en un matraz aforado de 50 ml. Se realizaron dos lavados más del precipitado repitiendo el paso anterior. Finalmente, esta solución se incubó con el reactivo de glucosa oxidasa/ peroxidasa (GOD/POD) en baño de agua a 37°C durante 10 min. La mezcla se leyó a una absorbancia de 510 nm. La concentración se obtuvo por interpolación de una curva de calibración de glucosa con estándares de 0 a 100 µg/ml, el resultado de la cuantificación se sustituyó en la siguiente ecuación calcular el porcentaje de almidón total.

$$\text{Almidón total (\%)} = (\mu\text{g de glucosa/ ml}) \times \text{volumen} \times 0.9 \times 100 / \mu\text{g de muestra}$$

Dónde:

Volumen= 50 ml

µg de muestra= 50,000

6.6.7.2 Almidón disponible

Para la determinación de almidón disponible se pesaron 500 mg de muestra en base seca, se agregaron 20 ml de agua destilada y se agitó durante 10 min en la plancha de agitación. A continuación se agregaron 100 µl de α-amilasa termoestable (protegido de la luz) y se llevó a ebullición en un baño de agua durante 20 min. Una vez que la muestra alcanzó una temperatura de 30-40° C, se aforó a 100 ml. De la solución anterior, se tomaron 500 µl y se agregaron a un tubo conteniendo 1 ml de regulador de acetato de sodio + 25 µl de amiloglucosidasa y se aforó nuevamente a 100 ml. La mezcla se incubó durante 30 min a 60° C con agitación constante, se centrifugó a 3000 x g durante 5 min y el sobrenadante se aforó a 10 ml. Finalmente se midió la concentración de glucosa como se indicó en la sección 6.6.6.1.

Cálculos.

$$\text{Almidón disponible (\%)} = (\mu\text{g de glucosa/ ml}) \times \text{volumen} \times \text{dilución} \times 0.9 \times 100 / \mu\text{g de muestra}]$$

$$\text{Digestibilidad de carbohidratos (\%)} = \frac{\text{Porcentaje de almidón disponible} \times 100}{\text{Porcentaje de almidón total}}$$

6.6.8 Cuantificación de oligosacáridos

La extracción de oligosacáridos se realizó por la técnica descrita por Díaz-Batalla *et al.* (2006) y la identificación por el método de Muzquiz *et al.* (1999) con algunas modificaciones. Brevemente, se pesaron 0.5 g de muestra y se adicionó 10 ml de agua destilada. Se dejó en baño maría a 80 °C por 1 hr con agitación constante y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, el sobrenadante se pasó por filtros de 0.45 µm (Econofilter PTFE, Agilent Technologies). De este filtrado se tomaron 500 µl y se transfirieron a viales ámbar de 1 ml para HPLC. Para el análisis, se usó un HPLC acoplado a un detector de índice de refracción IR utilizando una columna Zorbax para carbohidratos de 4.6 mm x 250 mm x 5 µm. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo-agua en proporción 65:35, en condiciones isocráticas a razón de 1 ml/min. El volumen de inyección de muestra fue de 20 µl.

Los estándares utilizados para realizar las curvas de calibración fueron estaquiosa, verbascosa y rafinosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). El resultado de la concentración de cada uno se expresó en mg/gr de muestra.

6.6.9 Determinación del índice de absorción de agua

Para este análisis se utilizó el método de Anderson *et al.* (1969). Brevemente, se suspendieron 5 g de harina de frijol horneado en 30 ml de agua destilada en tubos para centrífuga de 50 ml. Los tubos se llevaron al vortex por 1 minuto para homogenizar completamente la solución y se centrifugaron a 3000 x g por 10 min a 25 °C. El sobrenadante se transfirió a charolas de aluminio previamente llevadas a peso constante y pesadas. Las muestras se secaron a 105 °C toda la noche, para la determinación de sólidos solubles, los cuales se expresaron en porcentaje. La pastilla remanente de la centrifugación se pesó para el cálculo del índice de absorción de agua, el cual se expresó como el porcentaje obtenido del pellet/g sólidos secos (g/g).

6.6.10 Determinación de la capacidad de absorción de aceite (CAA)

La absorción de aceite (CAA) se determinó de acuerdo a la metodología de Beuchat (1977) con ligeras modificaciones. Para tal propósito, un gramo de harina de frijol horneado se mezcló con 10 ml de aceite vegetal en tubo tarado de 50 ml. Se agitó la solución obtenida durante 2 minutos, se dejó en reposo a 28° C por 30 min después de lo cual se centrifugó a 1500 x g por 20 min. El sobrenadante se desechó, se limpió con papel absorbente el líquido remanente en las paredes del tubo y se pesó. El CAA se calculó y expresó como el peso de líquido retenido por gramo de muestra sólida.

6.6.11 Perfil electroforético de proteínas

Para determinar la calidad proteica de las materia primas, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

6.6.11.1 Extracción de proteína total

La extracción de proteína se realizó por el método reportado por Saravanan y Rose (2004) basado en precipitación con ácido tricloroacético y acetona (TCA-

A), con algunas modificaciones. Brevemente, 2 g de harina de frijol se suspendieron en 3 volúmenes de acetona fría (-20°C por dos horas) con 10% de TCA, 0.07% de 2-Mercaptoetanol. La mezcla se homogenizó durante 15 minutos en hielo con la ayuda de un sonicador (GE-505, Ultrasonic Procesor). Una vez homogenizada, se centrifugó a 2000 x *g* durante 2 minutos a 4°C (Super T21, Sorvall); el sobrenadante se dejó precipitar durante toda la noche a -20°C y se centrifugó a 13000 g durante 30 minutos a 4°C para obtener una pastilla de proteínas que se lavó 3 veces en acetona fría, se secó a temperatura ambiente hasta eliminar el exceso de acetona y se almacenó a -70°C.

6.6.11.2 Cuantificación de proteína por el método de Bradford

La concentración de proteínas totales solubles se determinó mediante el método de Bradford (1976) utilizando el kit comercial Protein Assay (Bio-Rad, Hércules, CA, USA) y albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Se preparó una solución stock de BSA (Sigma Aldrich) con una concentración de 100 mg/mL. Ésta se diluyó en solución de rehidratación (Urea 6 M) a una concentración de 2 mg/mL, a partir de esta solución se prepararon diluciones para la realización de una curva de calibración por duplicado como se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Preparación de la curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales mediante el método de Bradford

Estándar	Concentración de proteínas totales mg/mL	BSA 2 mg/mL (μ L)	Solución de rehidratación + DTT e IPG buffer (μ L)
1	0.0	0	100
2	0.2	10	90
3	0.4	20	80
4	0.6	30	70
5	0.8	40	60
6	1.0	50	50
7	1.2	60	40
8	1.4	70	30

Una vez hechas las diluciones, se preparó el reactivo de trabajo, diluyendo 1:5 el reactivo de Bradford en agua Milli-Q. Se agregaron 20 μ L de cada estándar o

muestra a 1 mL de reactivo de trabajo, se mezclaron y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. La absorbancia se leyó a 595 nm dentro de los siguientes 30 minutos en un equipo Smart-spec (Biorad, Hércules, CA, USA).

6.6.11.3 Preparación de gel de acrilamida SDS

La calidad de la proteína obtenida se evaluó mediante una electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. Para lo cual se elaboró un gel de resolución al 12.5% de acrilamida como se muestra en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Reactivos para la preparación de geles de acrilamida

Reactivo	Gel de resolución	Gel de carga
	Cantidad para 1 gel (μl)	Cantidad para 1 gel (μl)
<i>Fase I</i>		
Acrilamida 30%	1666.5	100
Tris 1M pH 8.8	1500	
Tris 1M pH 6.8		125
SDS	40	10
Agua	793.5	765
Total	4000	1000
<i>Fase II</i>		
TEMED	2	0.5
APS	20	5

Una vez polimerizados los geles, la pastilla de proteínas se descongeló y se resuspendió. Se transferieron 50 μl de muestra a un tubo eppendorf al que se le añadió 50 μl de buffer de carga (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glicerol, 2% SDS, 0.01% azul de bromofenol y 0.4 ml de β-mercaptoethanol) que se llevó a ebullición por exactamente 5 min.

La separación de proteínas por peso molecular se realizó en un equipo de electroforesis (Mini-PROTEAN Tetra, Bio-Rad, Hércules, CA, USA). Se inyectaron 15 μl de la muestra, así como 5 μl del marcador de proteínas (Benchmark Protein Lader, Invitrogen, Burlington, Ont, Canadá). La corrida se realizó a a 80 V por 20 minutos y después a 110 V por 2 h.

6.6.11.4 Tinción del gel

El gel obtenido fue teñido en solución fijadora (0.025% p/v de azul brillante de Coomassie R-250, 40% v/v de metanol, 10% v/v de ácido acético, completar al

volumen con agua) en agitación por 20 min. Una vez pasado este tiempo, el gel se desteñó, para lo cual se sumergirá en una solución con 50% metanol y 10% ácido acético durante toda la noche. La imagen se adquirió en un fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging System (Biorad).

6.6.11.5 Electroforesis en chip

Para la optimización del método de extracción de proteínas, se utilizó la metodología de Pedroche *et al.* (2002). Se partió de 5 g de muestra desgrasada a la que se le agregaron 200 ml de NaOH al 0.2%. Se ajustó el pH a 12 y se dejó en agitación durante 1 h a 25 °C. La solución se centrifugó a 8000 x g (20 min/4°C) repitiendo el proceso dos veces con la pastilla obtenida. El sobrenadante se recuperó y se ajustó el pH a 4.4 (punto isoelectrico del frijol), posteriormente se volvió a centrifugar 8000 x g 20 min/4°C. La pastilla formada se recuperó, se lavó con agua destilada a pH 4.4 (1 ml aproximadamente) y se liofilizó para almacenar el aislado proteico a -20 °C.

Los extractos proteicos obtenidos se sometieron a dos lavados adicionales con 5 ml de acetona. Las pastillas de proteínas obtenidas por ambos métodos se resuspendieron en solución amortiguadora de Urea-PBS 6M para ajustar la concentración a 1 mg/ml.

Para analizar la calidad de la proteína se utilizó un Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies) usando los chips de proteínas de alto y bajo peso molecular en el rango de 14 a 240 kDa y 1.5 a 90 kDa, respectivamente.

6.6.12 Microarreglos de proteínas

Se determinaron 182 proteínas relacionadas con obesidad e inflamación en el plasma de las mujeres participantes. Para tal propósito se usó el arreglo Biotin Label-based Human Obesity Antibody Array de la marca RayBiotech en el formato de placas de vidrio (AAH-BLG-ADI-1-4, RayBiotech, Inc., Norcross, GA, USA).

El fundamento de la técnica (Figura 8) consiste en biotinilar el grupo amino primario de las proteínas contenidas en las muestras de plasma. La muestra que tiene el complejo proteína-biotina se agrega al chip (placa de vidrio) que

contiene el arreglo de las 182 proteínas y se incubaba a temperatura ambiente. Posteriormente las proteínas biotiniladas que se quedaron unidas al chip se marcan con un colorante (equivalente a cy3) conjugado con estreptavidina (compuesto con alta afinidad por biotina) para dar una señal fluorescente que puede leerse en un escáner de fluorescencia.

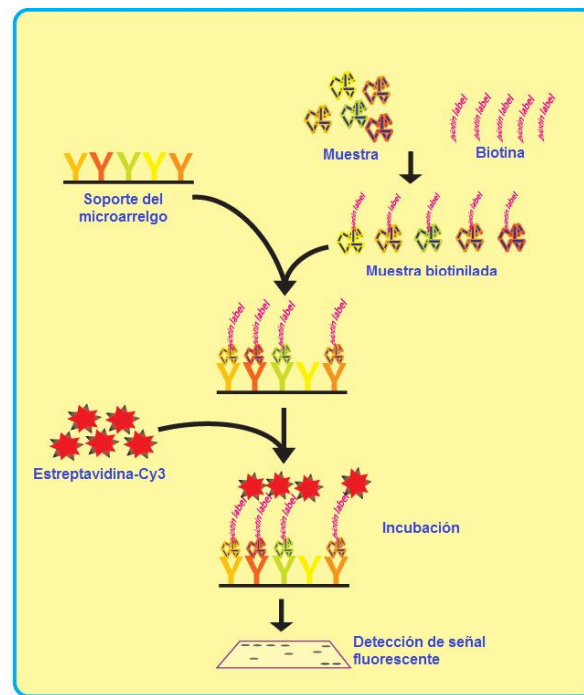


Figura 8. Fundamento de los microarreglos de proteínas

Para el análisis, se prepararon cuatro subconjuntos o pools con las muestras obtenidas al finalizar el estudio clínico. El plasma fue asignado de manera aleatoria (mediante la generación de números aleatorios en una hoja de Excel) a cada subconjunto, que tuvieron entre 3 o 4 muestras. Para esta etapa se excluyeron las participantes que presentaron inflamación aguda mediada como concentración de proteína C reactiva o cuyos niveles de triglicéridos fueran atípicos. En total se analizaron 24 muestras, formando 4 subconjuntos para cada grupo en estudio (control y tratamiento).

Con la finalidad de identificar las unidades experimentales se usó la siguiente codificación: BPF1-BPF4 para los plasmas de la condición final del estudio del grupo tratamiento y CPF1-CPF4 para los plasmas de la condición final del estudio del grupo control.

El experimento con microarreglos se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Cada muestra (20 µl) fue previamente dializada de acuerdo al protocolo indicado por el manual de microarreglos. El dializado se diluyó en solución de marcaje (conteniendo biotina) en proporción de 22 µl por cada 35 de muestra dializada. De esta solución, se agregaron 400 µl al chip previamente bloqueado. Una vez que se realizaron lavados para eliminar los componentes que no se unieron, se agregó la estreptavidina conjugada y se incubó por 1 h. El exceso de estreptavidina se removió y el chip se leyó en un escáner láser GenePix™ 4100A (Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA) a 532 nm, con una ganancia de 800 (PMT gain) y voltaje de 332. La imagen adquirida se analizó con el programa Genepix Pro 6.0.1.27 para obtener la intensidad media de cada pixel.

6.7 Análisis estadístico

Los resultados de los análisis químicos para harinas de frijol, harina de avena y la barra se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y se expresaron como la media $\pm$ error estándar como medida de dispersión de los datos. Las diferencias entre medias se analizaron por la prueba de Tukey.

Para el estudio clínico, las condiciones iniciales y finales de los grupos fueron comparadas entre grupos mediante ANOVA de una sola vía, analizando las diferencias entre medias con el método de Dunnet. El cambio entre punto inicial y final para cada grupo fue evaluado con la prueba t de student. Los resultados de este análisis fueron expresados como la media estimada (Intervalo de confianza [CI95%]).

Los ajustes por efecto de las condiciones iniciales y adherencia al tratamiento se analizaron con un análisis de covarianza (ANCOVA). Un efecto fue considerado significativo cuando $p < 0.05$. Todos los datos fueron analizados en el programa estadístico JMP 8.0 (SAS Institute, 2008).

Para el análisis de microarreglos, se utilizó la mediana de los valores de intensidad obtenidos, a los que se les sustrajo la señal de fondo. La normalización se llevó a cabo mediante la herramienta de análisis proporcionada por el proveedor (Analysis Tool Software for RayBio® Human

Biotin-Label Based Obesity Antibody Arrays - Human L-182 Array, Glass Slide, RayBiotech, Inc., Norcross,GA). Los datos normalizados se usaron para obtener el radio de expresión, calculado como el cociente de la intensidad del tratamiento entre el control. Previamente, las intensidades negativas se sustituyeron por el valor "1". El radio calculado se transformó aplicando el logaritmo base 2 como medida de expresión diferencial, misma que se utilizó para los análisis posteriores. Se consideró que una proteína fue expresada diferencialmente cuando el $\log_2$ del radio fue mayor a 2.

La interpretación de los datos, creación de redes metabólicas y mapas de calor se hizo con la ayuda del software Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®) de QIAGEN (Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity). Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de enriquecimiento de genes para obtener posibles proteínas de interés mediante análisis bioinformático en los programas CYTOSCAPE, BINGO y ONTOLOGIZER.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización de las materias primas

Se sabe que la variabilidad en los insumos puede afectar la calidad del producto final, pudiendo alterar su contenido nutricional y de compuestos bioactivos. Para poder producir un refrigerio adecuado para el estudio clínico, fue necesario en primer lugar medir dicha variabilidad y evaluar el impacto sobre el producto final. En la primera parte de este proyecto, se realizó la caracterización de la materia prima principal (frijol común variedad Bayo Madero) a lo largo de 3 años de producción, mientras que la caracterización nutrimental, nutricional y de estabilidad en almacenamiento del refrigerio, se realizó en paralelo en tres tesis de licenciatura que están en proceso de publicación.

7.1.1 Índice de absorción de agua y sólidos solubles

El índice de absorción de agua (IAA) y el tamaño de partícula del producto son dos factores que modifican la cohesividad de la masa y por tanto la textura del producto, siendo dos variables de interés tecnológico en la fabricación de

alimentos listos para consumo. En el Cuadro 7 se observan los valores obtenidos para IAA y el porcentaje de sólidos solubles (SS).

Cuadro 7. Índice de absorción de agua (IAA) y contenido de sólidos solubles (SS) en harinas de frijol horneado var. Bayo Madero

Año de cosecha	Índice de absorción de agua (g de pellet/g sólido seco)	Sólidos solubles (%)
2008	2.36 ^a ± 0.09	2.53 ^{a,b} ± 0.11
2010	2.49 ^a ± 0.18	2.55 ^{a,b} ± 0.22
2011	2.58 ^a ± 0.03	2.32 ^{a,b} ± 0.25

Los resultados representan la media de tres experimentos independientes ± el error estándar. Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas $p < 0.05$ en la prueba de Tukey

No se encontraron diferencias significativas a lo largo de los años de cosecha en ninguno de los tratamientos analizados, lo que sugiere que una vez obtenida la harina de frijol, tiene un comportamiento estable. En el ámbito industrial, esto es de suma importancia puesto que las variaciones en materia prima son causa de un producto terminado no homogéneo, además de aumentar su susceptibilidad al desarrollo microbiano.

Los resultados de IAA varían entre 2.17 a 2.58 g pastilla/g sólido seco, siendo consistentes con los valores establecidos como indicativo de una cocción completa del frijol, en el intervalo de 2.64 a 3.73 g pastilla/g muestra (Granito *et al.*, 2004). Este parámetro predice el comportamiento de las harinas al momento de reconstituirlas, así como su potencial como ingrediente funcional, puesto que algunos nutrientes y compuestos bioactivos interactúan con el agua. Específicamente las proteínas, carbohidratos y fibra dietética determinan las propiedades hidrodinámicas, delimitando los usos futuros como ingredientes en productos específicos (Sathe *et al.*, 1984).

Para la producción industrial de galletas y barras nutritivas, la absorción de agua es un factor clave en cuanto a fuerza y elasticidad de la masa se refiere, debido a que pequeñas variaciones en la calidad afectaría no solamente las

propiedades sensoriales, sino también induciría el crecimiento microbiano conllevando al deterioro del alimento (Gates, 2007).

7.1.2 Capacidad de absorción de aceite (CAA)

En la Figura 9 se muestra la capacidad de absorción de aceite de las harinas horneadas para cada año de cosecha.

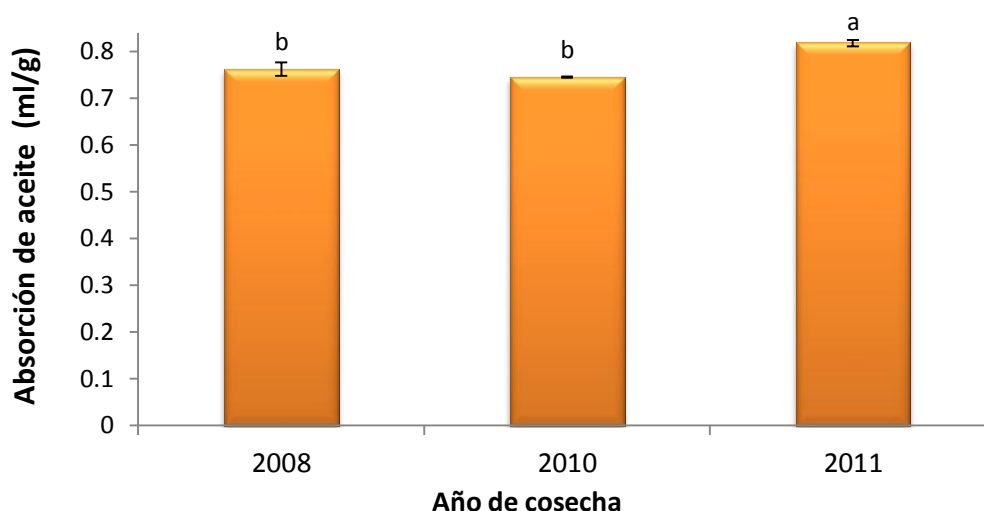


Figura 1. Capacidad de absorción de aceite de harinas de frijol común (*P. vulgaris*) var. Bayo Madero sometido a diferentes tratamientos

Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas $p < 0.05$ en la prueba de Tukey.

La cantidad de aceite retenido estuvo en el intervalo de 0.76 a 0.81 ml/g siendo valores menores que los reportados por Granito *et al.* (2009) y Aguilera *et al.* (2011) en frijol cocido y deshidratado, respectivamente. Estos resultados, sugieren que el proceso térmico adicional aplicado a las harinas efectivamente disminuye la captación de aceite. De acuerdo a Moreno y Bouchon (2008), la aplicación de un pre tratamiento de deshidratación es una estrategia para disminuir la absorción de aceite en productos fritos, debido a que este proceso térmico produce una reducción en el tamaño de poro en la superficie del alimento, disminuyendo la permeabilidad al aceite.

7.1.3 Cuantificación de compuestos fenólicos

7.1.3.1 Contenido de flavonoides totales

La Figura 10 muestra el contenido de flavonoides totales del frijol crudo, cocido y horneado a lo largo de tres cosechas.

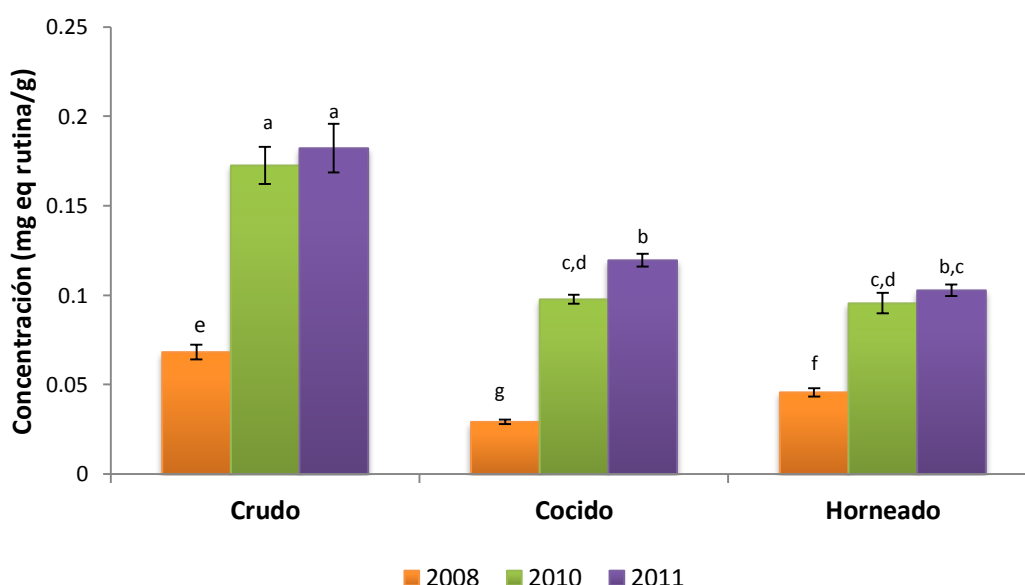


Figura 10. Concentración de flavonoides totales en frijol común (*P. vulgaris*) var. Bayo Madero sometido a diferentes tratamientos

Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas $\alpha=0.05$ en la prueba de Tukey.

La concentración de flavonoides, expresada como mg equivalentes de rutina/g muestra, varía en el intervalo de 0.68 ± 0.003 a 0.18 ± 0.013 para el frijol crudo, de 0.029 ± 0.001 a 0.12 ± 0.003 para el cocido y de 0.045 ± 0.002 a 0.102 ± 0.003 para el horneado. Dichos valores se encuentran ligeramente por debajo de lo reportado por Cruz-Bravo *et al.* (2011) para la misma variedad (1.0 mg/g en crudo y 0.69 mg/g en cocido) pero son consistentes con lo observado en nuestro grupo de trabajo Gómez-Palomares (2012) quienes informan valores entre 0.093 y 0.096 mg equivalentes de rutina/g de muestra.

Las muestras crudas exhibieron los niveles más altos de flavonoides en todos los años analizados, los cuales disminuyeron en gran medida al aplicar la cocción. Asimismo, para el grano cocido y horneado sólo se detectó una

diferencia significativa entre tratamientos en la cosecha del 2008. Dichas variaciones pueden deberse principalmente a las condiciones climáticas, de almacenamiento así como factores de proceso.

Se sabe que el tratamiento térmico influye de manera importante en la concentración de compuestos fenólicos. Xu y Chang (2009) pudieron comprobar que después de la cocción de semillas de *P. vulgaris* variedad pinto hubo un decremento de 67-84% en flavonoides totales, mientras que Gálvez-Ranilla *et al.* (2009) encontraron una disminución de flavonoides de 41 ± 0.03 a 21.3 ± 0.4 mg/mg peso seco de la muestra en frijol crudo y cocido del cultivar FT Nobre, proveniente de Brazil. Dependiendo de la temperatura y el tiempo de cocción, la disminución de compuestos fenólicos durante la cocción se ha atribuido tanto a un fenómeno de lixiviación de estos compuesto al agua de cocción (Barroga *et al.*, 1985), como a que el calentamiento induce la degradación de los polifenoles y rompe ciertos enlaces fenólicos (Granito *et al.*, 2007; Xu y Chang, 2009).

La aplicación de calor seco, como sucede durante la deshidratación, ha sido escasamente estudiada en leguminosas, particularmente en *P. vulgaris*. La conservación e incluso ligero incremento de flavonoides sugieren que la aplicación de un tratamiento térmico adicional a la cocción por ebullición, no afecta el contenido de este compuesto bioactivo de manera significativa, sin embargo, datos publicados al respecto de este proceso no ha sido encontrada. Algunos autores han informado el efecto del tostado y deshidratación de granos de leguminosas. Boateng *et al.*, (2008) demostraron un incremento en flavonoides totales después del tostado por microondas de semillas de *Phaseolus spp.* L., (en las cuales engloban también a la soya y *Vigna unguiculata*). Por otra parte, se encontraron niveles significativamente mayores de fenoles totales en granos de *Mucuna pruriens* var. *utilis* deshidratados en comparación con aquellos que fueron hervidos o cocidos en autoclave (Siddhuraju and Becker, 2001).

7.1.3.1 Contenido de taninos condensados

En la Figura 11 se muestran los resultados de la determinación de taninos condensados para las semillas crudas, cocidas y horneadas, en los tres años de cosecha previamente establecidos.

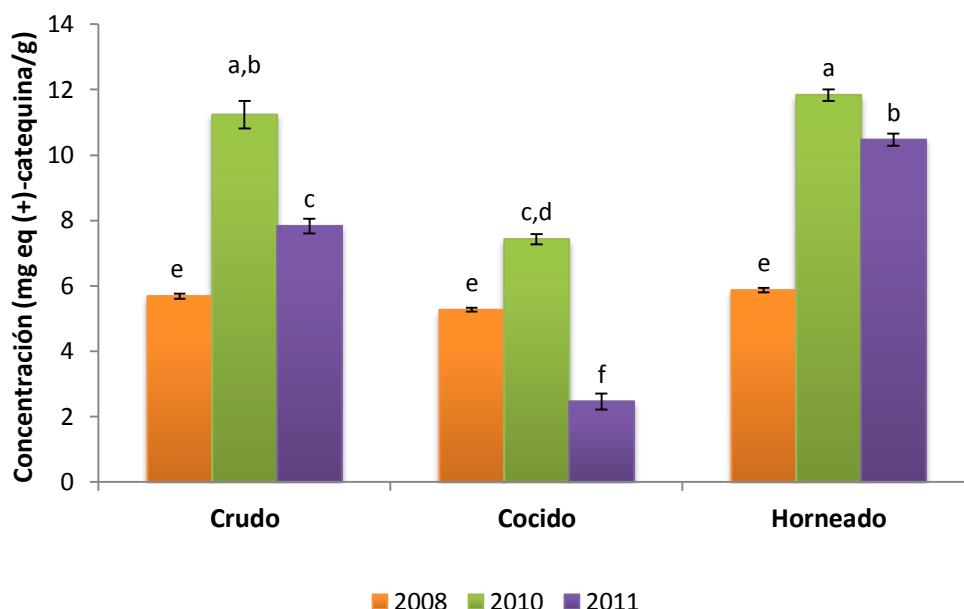


Figura 11. Concentración de taninos condensados en frijol común (*P. vulgaris*) var. Bayo Madero sometido a diferentes tratamientos térmicos

Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas $\alpha=0.05$ en la prueba de Tukey.

Los valores encontrados para taninos condensados, expresados como mg equivalentes de (+)-catequina, varían en el intervalo de 5.68 ± 0.08 a 11.23 ± 0.42 en el frijol crudo, de 2.46 ± 0.25 a 7.42 ± 0.16 en el cocido y de 5.86 ± 0.07 a 11.83 ± 0.18 en el horneado. Estos resultados están en concordancia con lo observado por otros autores. Para frijol Bayo Madero, se han informado contenidos de 17.90 ± 0.23 mg/g para la semilla cruda y de 14.61 ± 0.01 mg/g para la cocida (Cruz-Bravo *et al.*, 2011), además, en nuestro grupo de trabajo, se determinaron taninos condensados por 8.15 ± 0.10 mg eq. de (+)-catequina/g muestra en harinas de frijol Bayo (datos no publicados), así como en un extracto de polisacáridos encontrando 0.8 ± 0.03 mg eq. de (+)-catequina/g muestra (Campos-Vega *et al.*, 2009).

En este caso, no se lograron detectar diferencias en la concentración de taninos condensados en la cosecha 2008 a lo largo de los tratamientos térmicos, caso contrario para los otros años, en donde sí se observa un contenido superior en el frijol crudo, disminuyendo marcadamente con la cocción e incrementando incluso más allá del contenido original de la semilla cruda con la aplicación del horneado.

Nuevamente la disminución del contenido de taninos por efecto de la cocción por ebullición puede deberse a un efecto de lixiviación al caldo, aunque también está relacionado con la formación de complejos entre taninos condensados y proteínas (Reyes-Moreno y Paredes-López 1993) o bien entre estos compuestos y ciertos polisacáridos (Siddhuraju y Becker, 2006), resultando en una pobre capacidad de extracción y cuantificación por el método de la vainillina. Existen pocos estudios sobre esta variedad de frijol en cuanto a cambios en el perfil de compuestos fenólicos por efecto de la cocción, por lo que las referencias que se tienen son con variedades que se asemejan en coloración. En este sentido, Xu y Chang (2009) observaron una disminución en el orden de 32% a 54% de en frijol Pinto al someterlos a un proceso de ebullición.

Por otra parte, el incremento de taninos condensados después del horneado, ha sido observado previamente al someter diferentes leguminosas crudas a tratamientos de tostado y deshidratación. Por ejemplo, Boateng *et al.*, (2008) informaron un aumento en proantocianidinas (mg eq. leucocianidina/g materia seca) en el intervalo de 0.23 a 1 mg/g peso seco y 0.2 a 3.25 mg eq. leucocianidina respectivamente en frijoles tostados en microondas. Este comportamiento, al igual que el observado en flavonoides, ha sido relacionado con la ruptura celular durante el calentamiento o a la degradación de ciertos fenólicos insolubles, mejorando la extractabilidad de estos compuestos (Siddhuraju y Becker, 2001).

7.1.4 Capacidad antioxidante

Los resultados obtenidos de capacidad antioxidante por dos métodos diferentes se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Capacidad antioxidante de harinas de frijol común (*P. vulgaris*) crudo, cocido y horneado.

Frijol	DPPH		ABTS	
	ARA (%)	TEAC ($\mu\text{mol/g}$)	ARA (%)	TEAC ($\mu\text{mol/g}$)
2008				
Crudo	16.11 ^c $\pm$ 1.09	1.40 ^e $\pm$ 0.08	41.21 ^c $\pm$ 0.69	2.28 ^c $\pm$ 0.006
Cocido	14.77 ^c $\pm$ 0.32	1.29 ^e $\pm$ 0.02	41.60 ^c $\pm$ 0.59	2.30 ^c $\pm$ 0.056
Horneado	18.65 ^{b,c} $\pm$ 0.21	1.59 ^e $\pm$ 0.02	42.66 ^c $\pm$ 1.90	2.39 ^c $\pm$ 0.180
2010				
Crudo	56.87 ^a $\pm$ 2.96	4.49 ^a $\pm$ 0.22	87.16 ^a $\pm$ 2.26	5.19 ^a $\pm$ 0.135
Cocido	26.71 ^{b,c} $\pm$ 2.93	2.20 ^{c,d,e} $\pm$ 0.22	47.79 ^c $\pm$ 2.24	2.83 ^c $\pm$ 0.135
Horneado	23.48 ^{b,c} $\pm$ 0.76	1.96 ^{d,e} $\pm$ 0.05	73.00 ^b $\pm$ 1.87	4.33 ^b $\pm$ 0.111
2011				
Crudo	24.25 ^{b,c} $\pm$ 2.12	2.02 ^{d,e} $\pm$ 0.16	76.40 ^{a,b} $\pm$ 4.07	4.53 ^{a,b} $\pm$ 0.242
Cocido	17.09 ^c $\pm$ 3.24	1.47 ^e $\pm$ 0.24	50.439 ^c $\pm$ 5.82	2.99 ^c $\pm$ 0.346
Horneado	30.03 ^b $\pm$ 3.10	2.46 ^{b,c,d,e} $\pm$ 0.23	70.66 ^b $\pm$ 2.67	4.20 ^b $\pm$ 0.160

Los resultados representan la media de tres experimentos independientes $\pm$ el error estándar. Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas $p < 0.05$ en la prueba de Tukey

La actividad antiradical (ARA) así como los valores de TEAC (capacidad antioxidante expresada como μmoles equivalentes trolox/g muestra) obtenidos en el ensayo de DPPH se encuentran en el intervalo de $14.77\% \pm 0.32$ a $62.33\% \pm 3.52$ y de 1.01 ± 0.24 a 5.65 ± 0.07 , respectivamente.

Los reportes existentes en cuanto a capacidad antioxidante para frijol común, muestran gran variabilidad en los resultados. Aun así, los datos del presente estudio son comparables con otros previamente publicados. Por ejemplo, Rocha-Guzmán *et al.* (2007), encontraron valores de 30% de actividad antiradical medida mediante el ensayo de DPPH en un extracto metanólico (50% metanol) a los 45 min de análisis y de 62.28% en extracto de acetona al 70%. Los valores ARA también son similares a los reportados por Oomah *et al.* (2005) para frijol común canadiense. En este estudio se muestra actividad antiradical que va de 4.61% a 17.41%.

De acuerdo a esta metodología, se observa una tendencia general a disminuir la capacidad antioxidante de las muestras crudas al momento de aplicar la cocción, coincidiendo con los datos encontrados en la literatura para *P. vulgaris* (Jiratanan y Liu, 2004; Aparicio-Fernández *et al.*, 2005; Xu y Chang, 2008).

Al aplicar un nuevo tratamiento térmico (horneado), la capacidad antioxidante se mantuvo estable, e incluso incrementó, aun cuando este incremento fue estadísticamente significativo sólo en la cosecha de 2011. Esta conservación puede atribuirse parcialmente a la preparación de la muestra. Generalmente el agua de cocción es descartada y solamente los granos cocidos son analizados, en el presente estudio el agua de cocción se conservó y se deshidrató con los granos cocidos. Rocha-Guzmán *et al.* (2007) analizó la capacidad antioxidante de variedades mexicanas de frijol cocidas en autoclave. De acuerdo a los autores, los compuestos fenólicos de la testa son lixiviados al caldo de cocción y de ahí a los cotiledones. Cuando el caldo se elimina, una considerable cantidad de polifenoles se pierden, disminuyendo por tanto los valores de capacidad antioxidante.

Estos resultados coinciden con el aumento en compuestos fenólicos que se observó en el frijol horneado en comparación con los otros tratamientos (crudo y cocido), lo que sugiere que son estos compuestos los que proporcionan dicha capacidad. Siddhuraju y Becker (2001) y Boateng *et al.* (2008) reportaron un incremento de compuestos fenólicos en frijol sometido a calentamiento seco. De acuerdo a Duenas *et al.* (2005) y Siddhujaru (2006) la estabilidad de flavonoides y otros polifenoles durante el calentamiento puede deberse a la formación de compuestos de maillard como el hidroximetilfurfuraldehído (HMF) el cual produce una alta capacidad antioxidante.

En cuanto a la técnica de ABTS, los valores ARA y TEAC se encontraron en un intervalo de 41.21 ± 0.69 a 87.16 ± 2.26 y de 2.28 ± 0.006 a 5.19 ± 0.135 , respectivamente. En esta ocasión, sí se pudieron detectar diferencias significativas entre método de procesamiento, a excepción de la cosecha 2008, siendo este año, el que presentó los valores menores de capacidad antioxidante.

La limitación con el uso de esta metodología, consiste en la falta de información encontrada en la literatura, al respecto, se encontraron sólo dos artículos que utilizaron esta técnica para determinar capacidad antioxidante en frijol. En el primero, se compararon los resultados obtenidos por el ensayo de DPPH y ABTS en frijol común a los cuales se les aplicaron cuatro tratamientos (remojo, cocción tradicional, adición de NaHCO_3 y una digestión *in vitro*). En este caso, el porcentaje de ARA medido por ABTS fue mayor que el analizado por DPPH (Akillioglu y Karakaya, 2010). Otro estudio mostró resultados similares al determinar TEAC en extractos acuosos y en acetona provenientes de habas, siendo mayores los obtenidos por el ensayo de ABTS (Wolosiak *et al.*, 2010). Las diferencias entre ambos métodos, están relacionadas con el mecanismo de acción de los diferentes radicales. La técnica de ABTS implica un paso de oxidación con persulfato de potasio, previo a la formación del radical ABTS^{*+} . Por la misma naturaleza del radical, tiene menor estabilidad que el DPPH, reacciona más rápido con antioxidantes, típicamente en los primeros 30 minutos de la cinética (Prior *et al.*, 2005), por lo cual debe prepararse en el momento de usarlo. Además, el ABTS^{*+} tiene capacidad de reacción con cualquier compuestos.

La discrepancia en la tendencia mostrada en la capacidad antioxidante por ambos métodos, también puede deberse a que ABTS^{*+} reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado, independientemente de su potencial antioxidante real (Rogisky *et al.*, 2005). Por otra parte, el DPPH es más selectivo, razón por la que no reacciona con los flavonoides carentes de grupos hidroxilo en el anillo B, ni con ácidos aromáticos que contengan un solo grupo hidroxilo (Roginsky *et al.*, 2005), dando valores más bajos que el otro método.

7.1.5 Contenido de compuestos fenólicos cuantificados por HPLC

7.1.5.1 Perfil de compuestos fenólicos

Frecuentemente, los compuestos fenólicos están asociados a la matriz del alimento, principalmente fibra o polisacáridos de la pared celular. Para poder identificar tanto los compuestos libres y ligados u asociados a otras

biomoléculas, los extractos fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los resultados del análisis para el extracto de fenoles libres (extracto metanólico) se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Cambios en el perfil de compuestos fenólicos por efecto del procesamiento de harinas de frijol común

Ácido fenólico (µg/g)	Frijol crudo	Frijol cocido	Frijol horneado
2008			
(+)-Catequina	78.04 [¥] ± 1.67 ^e	630.62 ± 6.55 ^a	220.81 [£] ± 1.99 ^d
Rutina	8.11 ± 0.29 ^b	DLD	DLD
Quercetina	21.08 ± 0.45 ^b	14.67 ± 3.16 ^b	51.62 ± 0.24 ^b
Ácido gálico	113.26 ± 1.06 ^a	103.01 ± 2.61 ^{a,b}	64.34 [¥] ± 0.61 ^d
Ácido clorogénico	137.32 [£] ± 0.12 ^b	227.99 ± 6.13 ^a	67.71 [¥] ± 1.24 ^{c,d,e}
Ácido cafeico	7.71 ± 0.10 ^c	18.94 [¥] ± 0.20 ^a	6.06 ± 0.24 ^{c,d}
Ácido p-cumárico	DLD	DLD	2.66 ± 0.08 ^a
Ácido ferulico	1.37 ± 0.05 ^b	2.04 ± 0.06 ^a	0.97 ± 0.11 ^c
2010			
(+)-Catequina	73.11 ± 26.52 ^e	443.41 ± 13.66 ^b	39.61 ± 0.10 ^e
Rutina	11.30 ± 0.65 ^a	DLD	DLD
Quercetina	509.64 ± 50.23 ^a	549.60 ± 0.13 ^a	DLD
Ácido gálico	65.69 ± 1.49 ^d	91.47 ± 3.05 ^{b,c}	11.69 [¥] ± 6.12 ^e
Ácido clorogénico	119.66 [£] ± 23.40 ^{b,c}	49.40 ± 1.09 ^{d,e}	8.08 [¥] ± 0.10 ^e
Ácido cafeico	5.91 ± 0.29 ^d	5.62 [¥] ± 0.27 ^d	2.54 ± 0.10 ^e
Ácido p-cumárico	DLD	1.86 ± 0.02 ^c	DLD
Ácido ferulico	DLD	DLD	DLD
2011			
(+)-Catequina	196.56 [¥] ± 1.78 ^d	315.85 ± 16.14 ^c	451.54 [£] ± 29.10 ^b
Rutina	7.61 ± 0.38 ^b	6.45 ± 0.42 ^b	6.25 ± 0.21 ^b
Quercetina	570.12 ± 34.37 ^a	80.89 ± 6.62 ^b	83.19 ± 10.32 ^b
Ácido gálico	115.05 ± 2.36 ^a	64.21 ± 0.81 ^d	84.79 [¥] ± 6.12 ^c
Ácido clorogénico	16.57 [£] ± 1.29 ^e	99.07 ± 0.33 ^{b,c,d}	107.69 [¥] ± 20.99 ^{b,c,d}
Ácido cafeico	16.99 [¥] ± 0.64 ^b	5.08 ± 0.31 ^d	4.77 ± 0.01 ^d
Ácido p-cumárico	DLD	2.22 ± 0.03 ^b	2.00 ± 0.05 ^{b,c}
Ácido ferulico	DLD	DLD	1.10 ± 0.01 ^{b,c}

Los resultados son la media de 2 experimentos independientes ± el error estándar. Las letras en subíndice indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en la prueba de Tukey. ^{¥,£} Diferencias significativas entre tratamientos. DLD: por debajo del límite de detección.

Se identificaron 8 compuestos durante el análisis, predominantemente flavonoides como catequina, quercetina, rutina y ácidos fenólicos como ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido p-cumárico y ácido ferulico. Dentro de los flavonoides, la quercetina en cualquiera de sus formas (libre o ligada) es uno de los compuestos fenólicos más abundantes en las

leguminosas (Dinelli *et al.*, 2006). La concentración de quercetina estuvo en el rango de 14.67 a 570 µg/g, resultados que son consistentes con los valores reportados por Aguilera *et al.* (2011). La cocción fue el proceso que afectó en mayor magnitud la concentración de quercetina, obteniéndose disminuciones significativas al aplicar el tratamiento térmico, mientras que el horneado no provocó cambios significativos a las harinas después de la cocción.

En cuanto a catequina y rutina, estos compuestos se encontraron en el intervalo de 39.61 a 630 µg/g y 4.64 a 13.06 µg/g, respectivamente. Durante la cocción y horneado, los niveles de catequina disminuyeron de manera general, manteniéndose estables al aplicar el tratamiento de horneado. En el caso de la rutina, una vez aplicada la cocción, su concentración se redujo hasta no ser detectable en las cosechas 2008 y 2010. Aguilera *et al.*, publicaron resultados similares en 2011, en donde un proceso de deshidratación provocó reducciones drásticas en la cantidad de polifenoles presentes en harinas de frijol Pinto.

Respecto a los ácidos fenólicos, los más abundantes fueron ácido gálico (64.21–184.60 µg/g), ácido clorogénico (8.08–227.99 µg/g) y ácido cafeico (2.54–18.94 µg/g). Estos valores, son más elevados que lo reportado por diversos autores (Díaz-Batalla *et al.*, 2006; Xu & Chang, 2009; Aguilera *et al.*, 2011) probablemente debido a las diferencias en métodos de extracción, así como a las condiciones de cultivo y cosecha del frijol.

No se pudo observar una tendencia clara en cuanto al efecto de la cocción sobre los niveles de ácidos fenólicos puesto que en algunos casos, se vio un aumento en la concentración y en otros disminución. En cambio durante la deshidratación se vio una tendencia general a disminuir la concentración de fenoles libres que estuvo en función del año de cosecha, resultados que contrastan con lo informado por Aguilera *et al.*, (2011) que obtuvo pérdidas significativas de estos compuestos.

El extracto de fenoles ligados también fue analizado por HPLC. Los resultados de este ensayo se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Perfil de compuestos fenólicos ligados en frijol Bayo Madero

Frijol		Catequina (mg/g)	Ac. Caféico (mg/g)	Rutina (mg/g)	Ac. Elágico (mg/g)	Ac. cumárico (mg/g)	Vainillina (mg/g)	Ac. Sinápico (mg/g)	Ac. Ferúlico (mg/g)	Quercetina (mg/g)	Kaempferol (mg/g)
2010											
Crudo	F1	ND	ND	78.54±0.42 ^g	ND	31.48±0.42 ^{f,g}	ND	53.205±0.85 ⁱ	ND	ND	ND
	F2	565.72±1.00 ^e	ND	206.86±3.43 ^c	ND	20.18±1.60 ^h	ND	378.06±2.24 ^b	67.95±0.48 ^e	ND	ND
	F3	ND	ND	ND	ND	18.49±3.40 ^{h,i}	ND	97.81±0.48 ^g	264.43±0.12 ^d	16.87±1.36 ^d	76.77±.44 ^a
	F4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.95±0.065 ^j	ND	ND
Cocido	F1	ND	ND	ND	ND	34.28±0.77 ^f	ND	104.00±1.00 ^f	ND	ND	ND
	F2	744.09±0.16 ^b	25.64±0.25 ^a	185.25±0.70 ^d	ND	65.68±2.52 ^{b,c}	45.99±0.21 ^c	455.25±2.55 ^a	43.52±0.25 ^g	ND	ND
	F3	ND	ND	80.57±0.49 ^g	ND	99.75±0.39 ^a	53.85±0.41 ^b	ND	102.22±0.23 ^d	ND	75.26±0.05 ^a
	F4	ND	ND	39.66±0.19 ^h	ND	22.48±1.12 ^h	9.61±0.53 ⁱ	ND	1.56±0.07 ^j	ND	4.93±0.42 ^h
Horneado	F1	ND	ND	ND	ND	0.84±0.84 ^g	ND	6.79±0.01 ⁱ	ND	ND	ND
	F2	219.10±0.55 ^g	ND	115.14±0.18 ^f	131.89±0.91 ^b	46.03±0.74 ^e	24.41±2.33 ^{f,g}	194.09±3.15 ^e	ND	ND	7.50±0.54 ^g
	F3	734.08±4.27 ^c	ND	462.87±2.45 ^a	109.46±0.98 ^c	71.71±1.33 ^b	47.58±3.02 ^c	231.64±0.50 ^d	3.26±0.025 ⁱ	25.06±0.92 ^a	45.93±0.15 ^b
	F4	ND	ND	34.32±0.39 ^{h,i}	ND	10.32±0.47 ^{i,j}	14.49±0.38 ^{h,i}	14.91±0.10 ^k	104.91±0.32 ^d	ND	7.68±0.54 ^g
2011											
Crudo	F1	ND	4.77±0.25 ^f	203.31±0.15 ^c	ND	63.00±0.17 ^{b,c}	45.08±0.13 ^c	147.37±0.22 ^f	1.25±0.014 ^j	ND	ND
	F2	1006.26±2.72 ^a	17.88±0.12 ^b	146.96±0.10 ^e	188.41±0.40 ^a	23.10±2.48 ^{g,h}	27.10±0.28 ^{d,e,f}	271.11±0.19 ^c	218.66±0.32 ^c	1.64±0.44 ^d	ND
	F3	ND	ND	29.58±0.26 ⁱ	ND	58.05±2.05 ^{c,d}	117.06±1.29 ^a	89.96±0.07 ^g	558.02±0.12 ^a	11.3±0.68 ^c	ND
	F4	ND	ND	26.06±1.80 ⁱ	ND	ND	ND	3.42±0.00 ⁱ	5.33±0.215 ⁱ	16.46±1.20 ^b	76.70±1.59 ^a
Cocido	F1	ND	ND	75.55±2.17 ^g	ND	57.43±0.39 ^{c,d}	28.41±0.09 ^{d,e,f}	177.04±0.15 ^e	2.37±0.34 ^j	ND	2.58±0.17 ^{g,i}
	F2	662.30±1.9 ^d	10.95±0.08 ^d	209.75±0.39 ^c	83.71±0.26 ^d	18.35±0.42 ^{h,i}	25.74±0.50 ^{e,f,g}	279.02±0.31 ^c	19.23±0.09 ^h	2.00±0.08 ^d	3.32±0.005 ^{h,i}
	F3	ND	ND	ND	ND	31.94±1.39 ^{f,g}	21.54±1.09 ^g	34.15±0.21 ^j	54.36±0.02 ^f	1.385±0.007 ^d	19.31±0.23 ^e
	F4	ND	ND	ND	ND	ND	1.14±0.14 ^j	ND	1.08±0.09 ^j	10.78±0.77 ^c	36.34±0.63 ^c
Horneado	F1	ND	15.34±0.15 ^c	ND	ND	ND	ND	68.75±0.75 ^h	67.62±0.42 ^e	ND	3.13±0.08 ^{h,i}
	F2	ND	10.89±0.34 ^d	185.16±0.92 ^d	ND	51.22±0.22 ^{a,e}	29.68±0.59 ^{a,e}	ND	2.16±0.11 ^j	ND	1.12±0.12 ^{i,j}
	F3	490.33±3.24 ^f	ND	334.31±0.30 ^b	ND	53.47±0.69 ^{d,e}	31.74±1.05 ^d	128.39±0.06 ^f	4.50±0.28 ⁱ	ND	15.05±0.14 ^f
	F4	ND	ND	30.77±4.70 ^j	ND	4.64±0.20 ^{j,k}	15.82±0.19 ^h	ND	118.34±0.31 ^d	26.95±0.63 ^a	32.98±0.81 ^d

Los resultados representan la media de 2 experimentos diferentes ± el error estándar. Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas en la prueba de Tukey p<0.05

Debido a que este extracto presentó un pico alrededor del minuto 2.86 con un área mucho mayor a la de los demás compuestos, no se pudo realizar la cuantificación. Por esta razón, se decidió fraccionar, eluyendo el extracto en una columna Se-Pack (Waters). La fracción 1 (F1) fue recolectada después de eluir con agua (pH=7), la fracción 2 (F2) fue eluida con acetonitrilo al 16%, la fracción 3 (F3) con acetato de etilo puro y la fracción 4 (F4) con etanol al 80%. En el Cuadro 10 se pueden apreciar 10 compuestos identificados que comprenden catequina, quercetina, rutina, kaempferol, vainillina, ácido cafeico, ácido elagico, ácido cumárico, ácido sinápico y ácido ferúlico.

En la fracción 1 se obtuvieron predominantemente ácidos fenólicos (ferúlico y sinápico) y un flavonoide (rutina). Luthria y Corrales (2006) coinciden en estos tres compuestos como los más abundantes en 15 variedades de frijol común crudo. El tratamiento de cocción y horneado provoca una disminución en la concentración estos compuestos, lo cual sugiere que una degradación térmica tuvo lugar.

La fracción F2 fue la que permitió la mejor extracción de los compuestos fenólicos, conteniendo la mayoría de los fenoles identificados. Catequina, rutina, ácido sinápico y ácido ferúlico estuvieron en mayor concentración. Con la aplicación del tratamiento de cocción estos compuestos tienden a incrementar de manera general, observándose también la aparición de especies que no estaban presentes en el frijol crudo. Este fenómeno podría deberse a la formación *de novo* de compuestos a partir de la combinación de los productos de degradación de otras especies de fenoles presentes. Al someterse a horneado, la concentración nuevamente disminuye, comportamiento previamente observado en la cuantificación de taninos condensados. Nuevamente, podría tratarse de un proceso de degradación por efecto de la temperatura o de transformación en otro tipo de compuestos fenólicos.

La fracción F3 con acetato de etilo, permitió visualizar cambios en el perfil de flavonoides y ácidos fenólicos. Por ejemplo, se puede cuantificar kaempferol, flavonoide que en las otras fracciones mencionadas no estaba presente o estaba en concentraciones bajas. A medida que se van aplicando los

tratamientos térmicos, se van detectando más compuestos del tipo flavonoide, lo que podría sugerir una posible liberación de la matriz de la pared celular. Asimismo, las cantidades de estos compuestos aumentan con la aplicación del horneado, probablemente debido al desprendimiento de los fenoles por efecto de la ruptura celular durante el calentamiento o a la degradación de ciertos fenólicos insolubles, mejorando la extracción de los mismos (Siddhuraju y Becker, 2001).

Por último, F4 fue la fracción en la que se identificaron la menor cantidad de fenoles ligados, siendo los más abundantes rutina y ácido ferúlico. El perfil determinado en esta porción fue muy parecido al de la F1, sin embargo los contenidos de esta fracción fueron substancialmente menores a los de la primera.

Existe poca información en la literatura sobre el perfil fenólico en *P. vulgaris*, por lo cual este reporte aporta datos relevantes del cambio en estos compuestos por efecto del tratamiento térmico y año de cosecha.

7.1.6 Contenido de carbohidratos indigestibles

7.1.6.1 Perfil de fracciones de almidón y fibra dietética

Los carbohidratos son los componentes que están en mayor proporción en las semillas de frijol común, el 27% al 60% está conformado por almidón. El resto son polisacáridos no almidonosos y oligosacáridos.

En el Cuadro 11 se resumen los resultados encontrados al cuantificar los valores de almidón total (AT), almidón disponible (AD), almidón resistente (AR), fibra dietética insoluble (FDI), fibra dietética soluble (FDS) y oligosacáridos de las harinas de frijol Bayo Madero. Los valores para almidón total, varían en el intervalo de 44.23% a 51.90%. Dichos contenidos son consistentes con lo previamente reportado para frijol común (Eyarú, Shrestha & Arcot, 2009) y no presentaron diferencias significativas entre tratamiento o año de cosecha.

Cuadro 11. Diferentes fracciones de almidón, digestibilidad *in vitro* y fibra dietética de harinas de frijol común var. Bayo Madero

	Almidón total (%)	Almidón disponible [¥] (%)	Digestibilidad de almidón ^{*¥} (%)	Almidón resistente [¥] (%)	FDI (%)	FDS (%)	Rafinosa (mg/g)	Estaquiosa (mg/g)
2010								
Crudo	51.90 ± 0.62 ^a	32.39 ± 0.04 ^{c,d}	62.42 ± 0.68 ^e	5.33 ± 0.18 ^c	34.34 ± 0.08 ^{b,c}	1.35 ± 0.78 ^b	1.931 ± 0.093 ^{d,e}	21.64 ± 0.162 ^c
Cocido	44.23 ± 0.14 ^b	34.63 ± 0.95 ^{b,c,d}	78.28 ± 1.91 ^{b,c}	6.74 ± 0.16 ^b	31.31 ± 0.05 ^d	3.75 ± 0.06 ^{a,b}	2.42 ± 0.0005 ^e	42.31 ± 0.66 ^{a,b}
Horneado	44.88 ± 0.42 ^b	35.48 ± 1.96 ^{b,c,d}	79.00 ± 3.64 ^{b,c}	8.3 ± 0.45 ^a	41.52 ± 0.50 ^a	2.39 ± 0.57 ^{a,b}	2.47 ± 0.042 ^{c,d,e}	48.49 ± 2.72 ^a
2011								
Crudo	44.50 ± 0.39 ^b	29.58 ± 0.50 ^d	66.47 ± 0.55 ^{d,e}	5.26 ± 0.17 ^c	34.93 ± 0.05 ^{b,c}	3.27 ± 0.11 ^{a,b}	1.49 ± 0.032 ^e	34.19 ± 0.367 ^b
Cocido	45.40 ± 0.12 ^b	42.17 ± 0.62 ^a	92.88 ± 1.12 ^a	7.15 ± 0.10 ^{a,b}	34.41 ± 0.17 ^{b,c}	2.51 ± 0.38 ^{a,b}	4.33 ± 0.261 ^{b,c,d}	37.68 ± 0.668 ^{a,b}
Horneado	45.54 ± 1.09 ^b	39.39 ± 1.43 ^{a,b}	86.49 ± 1.08 ^{a,b}	7.29 ± 0.04 ^{a,b}	32.25 ± 0.92 ^d	4.55 ± 0.76 ^a	4.72 ± 0.543 ^b	35.30 ± 2.770 ^b

FDI- Fibra dietética insoluble, FDS- Fibra dietética soluble

* Diferencia estadística por año de cosecha

¥ Diferencia estadística por tratamiento térmico.

Los resultados representan la media de 2 experimentos diferentes ± el error estándar. Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas en la prueba de Tukey p<0.05

Los tratamientos térmicos afectan significativamente la digestibilidad y la biodisponibilidad de almidón en plantas. Se puede observar del Cuadro 11, que existen diferencias estadísticas en AD, RS y digestibilidad de almidón *in vitro* al comparar por tratamiento, pero ningún efecto fue observado por año de cosecha. Tanto AD como la digestibilidad incrementaron después de la cocción, disminuyendo nuevamente con el horneado, lo cual sugiere la formación de almidón resistente retrogradado. Esto puede confirmarse por el análisis de AR, en donde se encontraron valores más elevados para aquellas muestras que fueron tratadas térmicamente, especialmente después del horneado. Lo anterior está en concordancia con lo publicado por Osorio-Díaz *et al.* (2003), quienes informan niveles similares para frijol crudo y cocido. En este estudio se evaluó el efecto de la deshidratación industrial en frijoles enlatados comercialmente y frijoles procesados en laboratorio, reportando un contenido de AD de 28% a 36%. Los frijoles procesados en laboratorio, la concentración de AD fue menor que en el grano crudo y al mismo tiempo, AR incrementó de 1.89% a 3.02%. De igual manera, los frijoles enlatados y deshidratados comercialmente, presentaron contenidos de AR en menor proporción que cuando se deshidrataron en laboratorio.

La mayor proporción de AR puede deberse a una recristalización extensiva de las fracciones de almidón, fenómeno que ha sido observado después de tratamiento de calentamiento o enfriamiento, posterior a la cocción (Osorio-Díaz *et al.*, 2003).

Las harinas deshidratadas obtenidas en este trabajo contienen niveles significativos de AR, por lo que tienen un buen potencial como ingrediente funcional. La ingesta de AR ha sido asociada con un menor índice glicémico y es sustrato de fermentación colónica (García-Alonso *et al.*, 1998), exhibiendo potencial bifidogénico. En cuanto a fibra dietética, las fracciones FDI y FDS presentaron contenidos que van de 31.31% a 41.52% y 1.35% a 4.55%, respectivamente. Diferencias significativas fueron registradas sólo para IDF comparando entre tratamientos. Los valores de FDI están en concordancia con lo observado por Campos-Vega *et al.* (2009) para la misma variedad, siendo los contenidos de 25.2% en el grano crudo y de 41% en el cocido. A pesar de las diferencias por efecto del tratamiento, la influencia del año de cosecha no

pudo ser establecida debido a la gran variación en FDI durante el periodo de tiempo estudiado.

7.1.6.2 Contenido de oligosacáridos

Los principales oligosacáridos presentes en frijol común son tres: rafinosa, estaquiosa y verbascosa. La carencia de α -galactosidasa en el intestino delgado de individuos monogástricos, permite el paso de estos compuestos al intestino grueso, donde son fermentados produciendo las molestas flatulencias. Lo anterior puede causar incomodidad aunque se han demostrado recientemente los beneficios de los oligosacáridos a la salud colónica. Al igual que el AR, estos compuestos son fermentados por la microbiota del colon incrementado la población de bifidobacterias (Bouhnik *et al.*, 2004). En el Cuadro 12 se muestran las concentraciones de rafinosa y estaquiosa, los oligosacáridos mayoritarios en el frijol común.

Cuadro 12. Contenido de oligosacáridos presentes en las harinas de frijol común (*P. vulgaris*)

Frijol	Rafinosa ^{*‡} (mg/g)	Estaquiosa [‡] (mg/g)
2010		
Crudo	1.931 ± 0.093 ^{d,e}	21.64 ± 0.162 ^c
Cocido	2.42 ± 0.0005 ^e	42.31 ± 0.66 ^{a,b}
Horneado	2.47 ± 0.042 ^{c,d,e}	48.49 ± 2.72 ^a
2011		
Crudo	1.49 ± 0.032 ^e	34.19 ± 0.367 ^b
Cocido	4.33 ± 0.261 ^{b,c,d}	37.68 ± 0.668 ^{a,b}
Horneado	4.72 ± 0.543 ^b	35.30 ± 2.770 ^b

* Diferencia estadística por año de cosecha

‡ Diferencia estadística por tratamiento térmico

Los resultados representan la media de 3 experimentos diferentes ± el error estándar. Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas en la prueba de Tukey $p < 0.05$

Dichos valores son consistentes con lo informado por Díaz-Batalla *et al.*, (2006), con valores de rafinosa el intervalo de 4.4 a 11.4 mg/g en frijol crudo y 3.2 to 11 mg/g en cocido. Concerniente a estaquiosa, ésta estuvo entre 23.7 a 63 mg/g en frijol crudo y 16.8 to 56.7 mg/g en cocido. Verbascosa no fue detectada en ninguna muestra en el análisis por HPLC.

El tratamiento térmico afectó significativamente las concentraciones de rafinosa, siendo el horneado el método que produjo los mayores contenidos de este oligosacárido (1.49 – 4.72 mg/g). Se presentaron cambios en rafinosa, sólo cuando se realizó la comparación por año de cosecha en el tratamiento de horneado. En contraste con estos hallazgos, otros autores observaron reducciones en el contenido de ambos carbohidratos después de la aplicación de tratamiento térmico (Díaz-Batalla *et al.*, 2006; Granito *et al.*, 2009). Sin embargo, en algunos casos, incrementos en estaquiosa, rafinosa y verbascosa han sido detectados en leguminosas cocidas, probablemente debido a las interacciones con macromoléculas. Martín-Cabrejas *et al.* (2006) evaluaron el efecto de la cocción tradicional y la deshidratación industrial en algunas leguminosas. Los autores no pudieron detectar diferencias después de cocción y solamente reducciones modestas se observaron después de la deshidratación.

La estaquiosa es el oligosacárido más abundante en frijol común. En este estudio se encontraron diferencias significativas sólo después de la aplicación de tratamiento térmico en la cosecha 2010. En esta ocasión, las semillas crudas tuvieron los contenidos menores y fueron elevándose al ser cocinadas. Estas aparentes inconsistencias resaltan la importancia de estudios más detallados en el impacto de varios métodos de calentamiento en el contenido de oligosacáridos de frijol común.

7.1.7 Perfil electroforético de frijol común (*P. vulgaris*)

Evaluar la calidad de proteína es importante para detectar cambios de este macronutriente por efecto del procesamiento del frijol. Para este fin, se realizaron ensayos SDS-PAGE de la manera tradicional en gel de poliacrilamida y en Chip, utilizando un equipo Bioanalyzer 2100, probando además dos técnicas de extracción de proteínas.

7.1.7.1 SDS-PAGE de harinas de frijol común

La primera técnica de extracción, consistió en una precipitación de proteínas con una solución de ácido tricloroacético-acetona (TCA-A), se evaluó el rendimiento de proteína mediante el método de Bradford. Cabe mencionar que debido a que no se contó con suficiente cantidad de muestra de la variedad

2008, los estudios posteriores se harán solamente para la variedad 2010 y 2011.

Los resultados de las muestras de los diferentes tratamientos térmicos de frijol se detallan en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Contenido de proteína total en harinas de *P. vulgaris*

Frijol	Concentración de proteínas totales (mg/ml)
	2010
Crudo	0.69 ^a ± 0.003
Cocido	0.84 ^c ± 0.001
Horneado	0.76 ^e ± 0.001
	2011
Crudo	0.90 ^b ± 0.002
Cocido	0.75 ^d ± 0.001
Horneado	1.63 ^f ± 0.002

Los resultados representan la media de 2 experimentos diferentes ± el error estándar. Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas en la prueba de Tukey $p < 0.05$

Los valores de proteína total para los extractos de harina frijol, varían en el intervalo de 0.69 ± 0.003 mg/ml a 1.63 ± 0.002 mg/ml. El año de cosecha afectó significativamente la concentración de proteínas del grano, presentando valores más altos durante la cosecha 2011. Además, se observó que el frijol horneado tuvo concentraciones mayores de proteína, mientras que para el frijol cocido no se observó una tendencia importante.

Para estudiar los cambios en el perfil de proteínas de frijol común a lo largo de los diferentes procesos, se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes como se aprecia en la Figura 12 y 13.

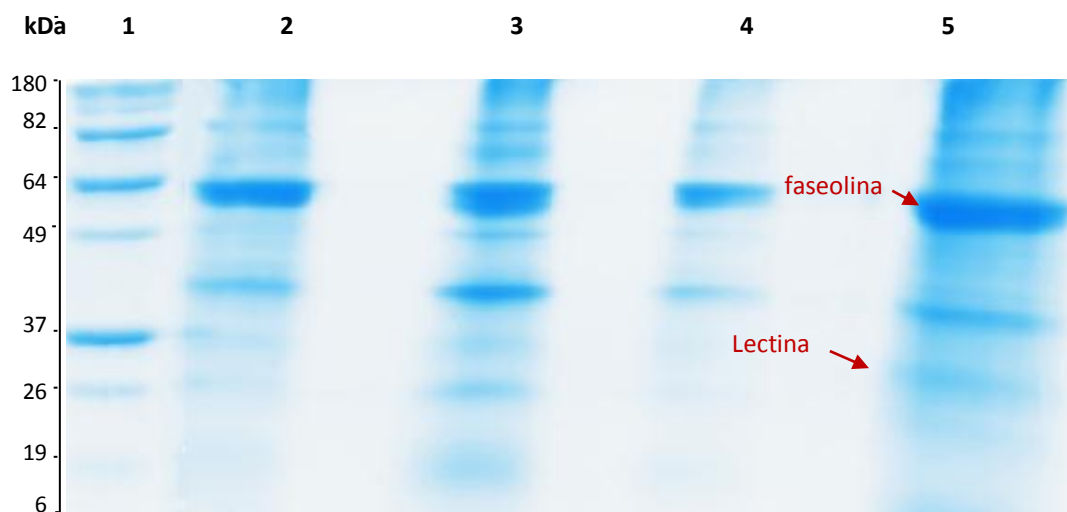


Figura 12. Gel de electroforesis para proteínas de frijol común (*P. vulgaris*)

Carril 1: Marcador de peso molecular, 2: Frijol cocido negro 2011, 3: Frijol Bayo Madero horneado 2011, 4: Frijol Bayo Madero cocido 2011, 5: Frijol Bayo Madero crudo 2011.

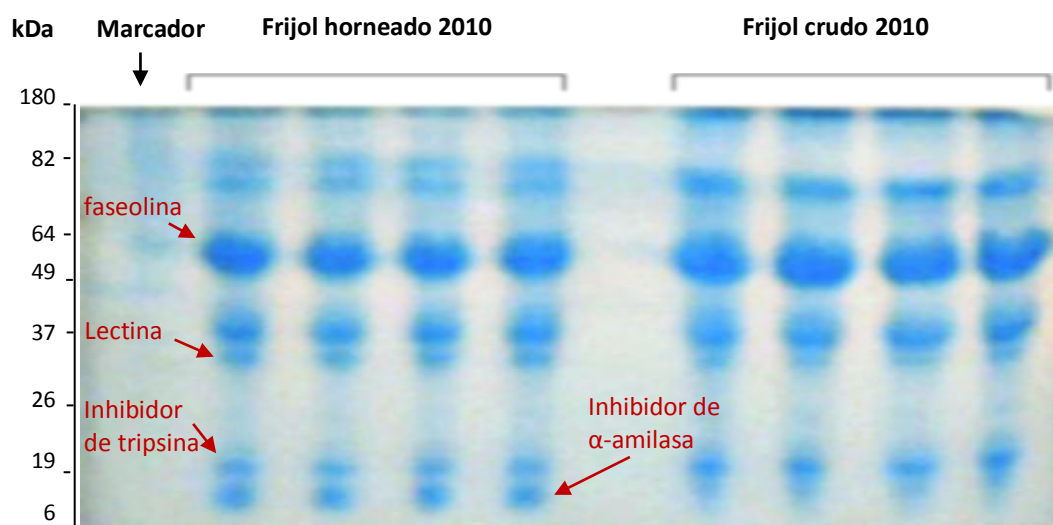


Figura 13. Gel de electroforesis para muestras de frijol Bayo madero crudo y horneado

Carril 1: Marcador de peso molecular, 2-5: Frijol horneado 2010, 7-10: Frijol Bayo Madero crudo 2010.

En la primera imagen se muestran el perfil de proteínas de las harinas de frijol pertenecientes a la cosecha 2011 y en la segunda el análisis de las harinas del 2010. Se puede ver una banda muy intensa entre 55 y 59 kDa en ambos gels, que representa la fracción proteica mayoritaria en todos los casos. Los

resultados sugieren que se trata de faseolina, la proteína de reserva más importante por su abundancia en el frijol común. De acuerdo a la literatura, la faseolina tiene un peso molecular entre 40 y 60.4 kDa (Hall *et al.* 1999, Montoya *et al.*, 2006; Montoya *et al.*, 2008, Dorantes-Mendoza, 2014), lo que coincide con la banda encontrada. A lo largo del procesamiento, la intensidad de la banda correspondiente a la faseolina disminuye modestamente después de la cocción, aumentando nuevamente durante el horneado. Se ha reportado que la faseolina de frijol común tiene 3 subunidades, sin embargo es difícil apreciarlo en los geles realizados. En un estudio posterior realizado por Dorantes-Mendoza (2014) se observan claramente las 3 subunidades con pesos moleculares de 60.1, 56.7 y 43.5 kDa, respectivamente, sin presentar cambios por efecto del tratamiento térmico.

Una segunda banda aparece alrededor de los 30 kDa, que muy probablemente corresponde al grupo de las lectinas, cuyo peso molecular corresponde a 26-31 kDa para cada subunidad. Sin embargo, los reportes existentes frecuentemente reportan la presencia de lectinas en forma de tetrámeros con un peso de 126 kDa (Liener *et al.*, 1986). En esta ocasión no se observaron los tetrámeros, por lo que se hipotetiza que pueden encontrarse en forma de monómeros.

Finalmente, las últimas dos bandas de 21 kDa y 15 kDa corresponden a inhibidores de tripsina e inhibidor de α -amilasa, respectivamente. Estas son dos proteínas importantes por su actividad biológica, el primero inhibe la digestión de prote[ina]s, mientras que el segundo la acción de la α -amilasa para la absorción de carbohidratos.

7.2 Estudio clínico

7.2.1 Resultados de reclutamiento

El presente estudio clínico fue aprobado para su ejecución por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ, el día 4 de Octubre de 2013 (Anexo VI) y se llevó a cabo del 5 de Octubre al 5 de Diciembre del mismo año.

El flujo de trabajo de la investigación se muestra en la Figura 14. Una vez que se abrió la convocatoria de reclutamiento, 189 personas se interesaron en

participar en el estudio. De éstas, 149 programaron una cita para acudir a la Clínica de Nutrición (CN) de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ. Asistieron a realizar su evaluación 100 personas a lo largo de 7 semanas, de las cuales 40 cumplieron con los criterios de inclusión que representa el 40% de la muestra evaluada. El estudio se inició con 31 mujeres que fueron asignadas de manera aleatoria a los dos grupos de estudio (control y tratamiento).

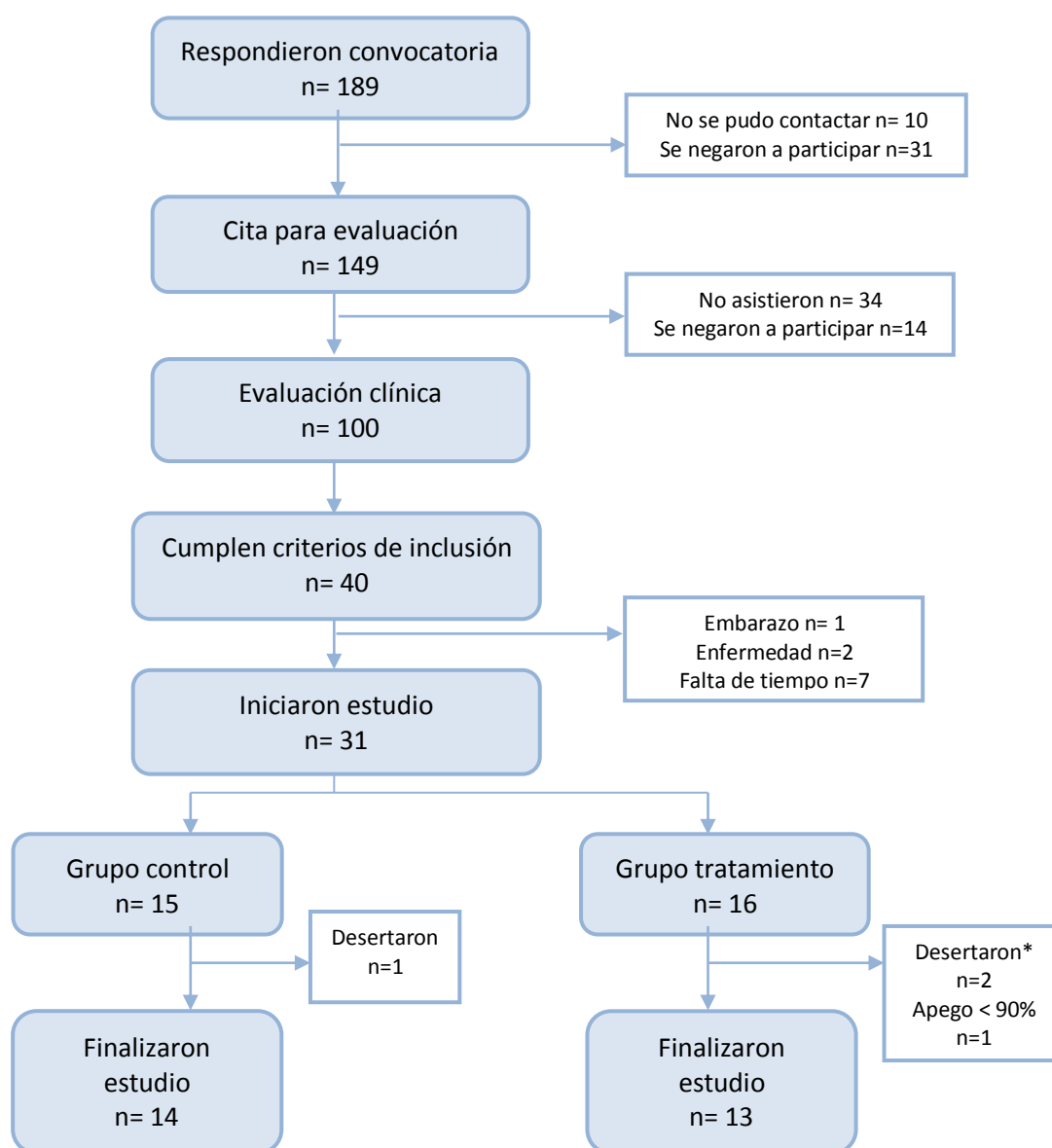


Figura 14. Diagrama de flujo de reclutamiento y selección de participantes para estudio clínico

* El principal motivo de deserción fue rechazo hacia el sabor de la barra o porque no se podían acabar la porción.

Entre las principales causas para no participar en el proyecto, se señaló la falta de tiempo (n=7). Además, dos personas presentaron enfermedad/accidente que impidieron continuar su participación y otra más informó estar embarazada. Se inició el estudio con 31 mujeres que fueron aleatorizadas en los dos grupos de estudio y se finalizó con un total de 27 participantes, siendo el porcentaje de deserción de 13%. Entre las principales causas de deserción se encontraron el sabor de la barra, el cual no fue tolerable para algunas mujeres; una adherencia menor al 90% al tratamiento;

falta de tiempo y la gran distancia que tenían que recorrer para asistir a realizar las evaluaciones al campus Juriquilla de la UAQ.

7.2.2 Análisis inicial de antropometría y marcadores clínicos

Las características iniciales de la muestra de estudio, incluyendo las medidas antropométricas y análisis clínicos se muestran en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Condiciones iniciales de participantes en el estudio clínico

	Tratamiento n= 15	Control n= 16
Edad	37.2 ± 7.66	32.8 ± 7.44
Peso	73.31 ± 10.54	76.26 ± 16.49
Talla	155.73 ± 5.34	157.75 ± 8.27
IMC¹	30.30 ± 4.79	30.58 ± 6.07
Cintura	89.76 ± 9.03	89.95 ± 11.83
Cadera	107.72 ± 8.40	107.62 ± 13.02
Grasa (%)	38.50 ± 4.23	38.60 ± 3.98
Energía (Kcal)	2675.46 ± 867.913	2517.37 ± 844.17
Glucosa (mg/dL)	93.22 ± 9.36	87.72 ± 9.22
Colesterol (mg/dL)	189.25 ± 32.63	191.14 ± 38.71
Triglicéridos (mg/dL)	208.18 ± 56.97	182.28 ± 51.39
HDL² (mg/dL)	53.71 ± 8.67	53.00 ± 8.06
LDL³ (mg/dL)	93.90 ± 29.57	101.68 ± 32.96
PCR hs (µg/ml)	6.17 ± 4.23	4.73 ± 3.63

¹Índice de masa corporal (25–29.9 sobrepeso, > 30 obesidad)

²Colesterol de alta densidad (>40 normal)

³Colesterol de baja densidad (<130 normal, 150-159 alto, >160 muy alto)

Los resultados representan la media de tres experimentos independientes ± el error estándar. Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas p<0.05 en la prueba de Tukey.

Tanto en las mediciones antropométricas como en los parámetros clínicos, no se observaron diferencias estadísticas entre las mujeres asignadas al grupo control y tratamiento. Lo anterior es un indicio de que la aleatorización asignar a las participantes en los dos grupos de estudio, fue adecuada.

De acuerdo al IMC (>30) de las 31 participantes, la población en estudio se puede clasificar en el límite del sobrepeso y obesidad, lo cual refleja el problema de salud nacional. La distribución del IMC para la totalidad de mujeres en estudio fue la siguiente: rango normal 16%, sobrepeso 52% y obesidad 52%.

La encuesta nacional de salud y nutrición (ENSANUT, 2012) informa que en México la prevalencia de obesidad ($\text{IMC} \geq 30$) es de 71.3% siendo más alta en el sexo femenino con un 37.5% ($\text{IC}_{95\%} = 36.5, 38.6$). Siguiendo la misma tendencia, el porcentaje de grasa corporal para ambos grupos, estuvo por arriba del 25% recomendado para tener una adecuada composición corporal (ATP III, 2001).

Para la circunferencia de cintura (CC) los valores encontrados fueron 89.76 cm y 89.95 cm para el grupo tratamiento y control, respectivamente. Dichos valores se encuentran por debajo de la media nacional de CC, la cual fue establecida en 90.96 cm para mujeres entre 20 y 49 años, según la ENSANUT 2012. Aun así, la CC rebasa el punto de corte para obesidad abdominal ($\text{CC} < 88$ cm).

Se ha propuesto que esta medida es un indicativo del riesgo de síndrome metabólico, porcentaje de grasa total y obesidad abdominal. Esta última se ha asociado fuertemente a niveles altos de triglicéridos en sangre (Grundy, *et al.*, 2013).

La ingesta habitual de energía promedio de los dos grupos fue similar, misma que se calculó a partir de la aplicación de un cuestionario de frecuencia de alimentos. En ambos casos, la ingesta calórica fue superior a las 2000 Kcal. Dicho patrón de consumo, coincide con la elevación en el nivel de triglicéridos que presentan las mujeres en estudio, puesto que el exceso de nutrientes se acumula en el tejido adiposo en forma de triglicéridos.

La distribución de los resultados obtenidos al cuantificar las variables bioquímicas, se presentan en la Figura 15.

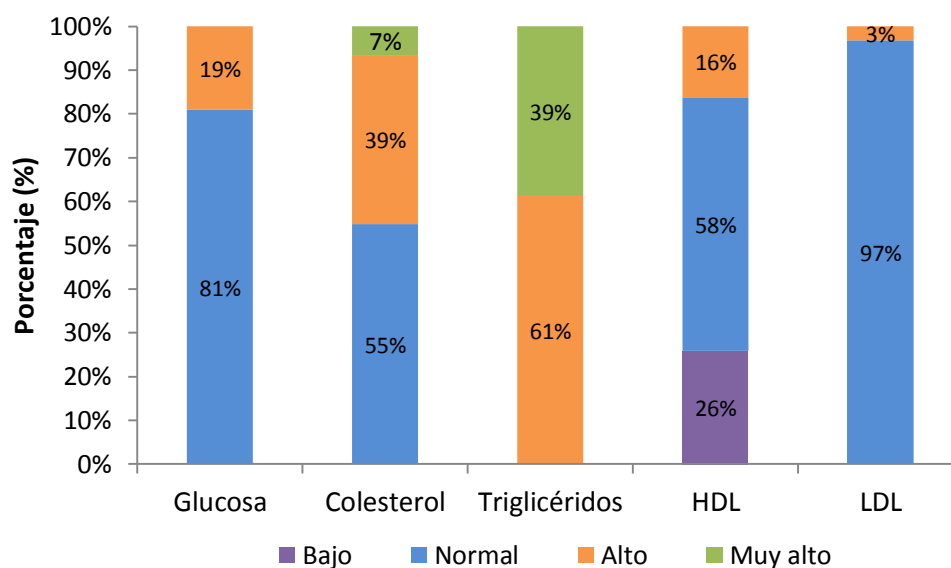


Figura 15. Prevalencias de marcadores clínicos de las participantes en estudio

La variable de mayor interés para este estudio fue el contenido de triglicéridos séricos, siendo el criterio de selección para reclutar a las voluntarias. Por esta razón, todos los valores se encuentran en el nivel alto (61%) y muy alto (39%).

En cuanto a la cuantificación de glucosa sérica, la prevalencia del nivel alto (100-110 mg/dL) y muy alto (> 110 mg/dL) de glucosa fue de 9% y 4%, respectivamente. Este último valor es considerado un marcador de riesgo de diabetes tipo II y por tanto se incluye en el diagnóstico previo de esta enfermedad. El término glucosa plasmática alterada (GAA), se refiere precisamente a los niveles >100 mg/dL pero < a 126 mg/dL, el cual comprende estadios metabólicos referidos como prediabetes. Existe poca información en cuanto a prevalencias de esta variable específica en México, sin embargo, hay algunos estudios realizados en México que nos dan un indicio del panorama general en nuestro país. En el primero, Palacio *et al.* (2004), reportan una prevalencia de 19% de GAA, en una evaluación a 220 pacientes en la Unidad de Medicina Familiar No. 32 del IMSS, Nuevo León. En una segunda publicación, se encontró una prevalencia de 26% en 161 mujeres del área rural del Estado de México (Moreno Altamirano *et al.*, 2006). De manera interesante, basados en esta información, se puede concluir que la prevalencia de GAA en

nuestra muestra de estudio fue baja en comparación con lo previamente reportado.

Para colesterol, el 55% de la muestra tuvo niveles normales, 39% altos y 7% muy altos. Estos valores son similares a lo informado por García *et al.* (2006) en mujeres de poblaciones rurales de Querétaro, en donde la presencia de altos niveles de colesterol fue del orden de 54.8%, muy por arriba de lo reportado por la ENSANUT (2012) con valores de 14.1% para mujeres a nivel nacional.

Finalmente, se pudo observar que la variable LDL presentó una prevalencia de 8% únicamente en el nivel alto (>130, <189 mg/dL). Este resultado es menor a lo observado en otros estudios. De acuerdo a Villalpando *et al.* (2010) el nivel alto de LDL tuvo una prevalencia entre 31.6-46% al analizar datos de la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC) de 1993 al 2006 (ENSANUT).

7.2.3 Cambios en los parámetros antropométricos evaluados

A lo largo del estudio, se realizaron cinco mediciones de los parámetros antropométricos de interés para este proyecto, incluyendo peso, IMC, circunferencia de cintura, cadera, porcentaje de grasa corporal, grasa visceral y masa magra. Los resultados de este monitoreo se muestran en la Figura 16.

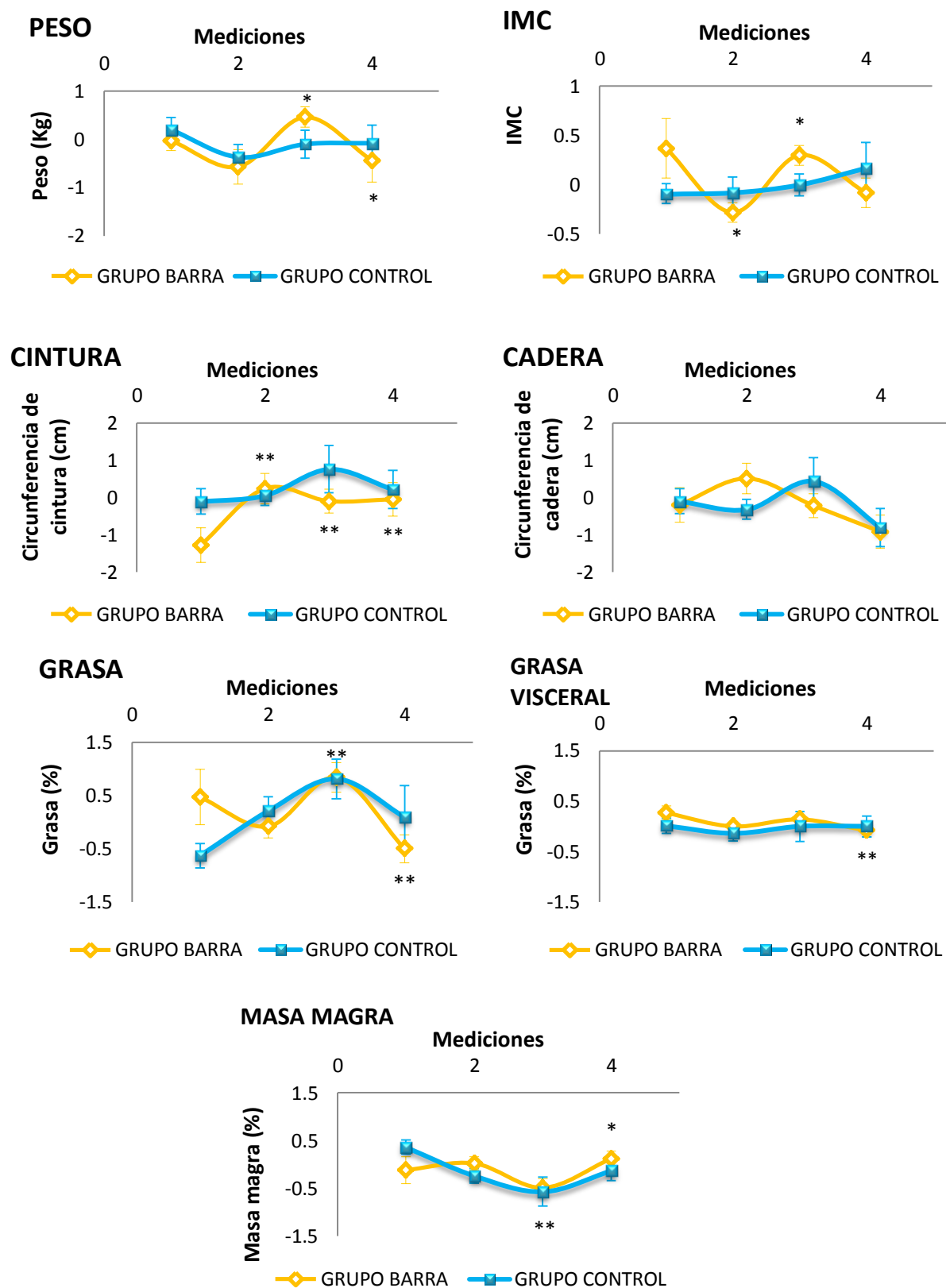


Figura 162. Cambios en mediciones antropométricas de participantes a lo largo de dos meses de estudio clínico

Los resultados corresponden a la media $\pm$ el error estándar. * Diferencia significativa con respecto a la medición anterior $p < 0.05$ en la prueba t de student. ** Diferencia significativa respecto a las condiciones iniciales

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para todas las variables, a excepción de circunferencia de cintura. La disminución de peso al finalizar el periodo de tiempo del estudio fue mayor para el grupo al cual se le suministró la barra, en comparación con la medición anterior. Esta disminución no fue significativa con respecto a la condición inicial. En términos generales, se puede sugerir que a las 8 semanas de iniciado el tratamiento con la barra de frijol-avena, se pueden empezar a notar cambios en el peso de las participantes. Para esta misma variable, el grupo control no presentó cambios a lo largo del tiempo de evaluación. En cuanto al IMC, durante la segunda evaluación se observó un decremento de mayor magnitud, el cual en la siguiente evaluación se convirtió en aumento del IMC. Esta variación se puede atribuir a que durante la segunda sesión de toma de medidas, no asistieron todas las participantes, siendo precisamente ellas las que presentaban un IMC más alto.

El efecto sobre el cambio en circunferencia de cintura fue contrario a lo que se esperaba, puesto que después de una disminución durante las primeras dos semanas de tratamiento (correspondientes al primer punto de la gráfica), hubo un aumento en medidas incluso ligeramente mayor a las condiciones iniciales. Posteriormente se volvió a observar una reducción en cintura, pero no fue significativa. Esta tendencia puede deberse a que durante las primeras semanas, las participantes tuvieron un mayor apego al tratamiento y aplicaron de manera más rigurosa las recomendaciones dadas durante la plática de orientación nutricional. Lo anterior puede comprobarse al analizar el formato de registro de dieta diaria (Anexo V), el cual fue llenado por las mujeres semanalmente y en donde se aprecia un mayor consumo energético.

La variable que fue mayormente afectada, corresponde al porcentaje de grasa corporal. A partir de la séptima semana de tratamiento, el cambio que se observa (última evaluación) fue significativo. Contrariamente, el grupo control a partir de la quinta semana, sufrió un aumento significativo de grasa corporal. Este resultado sugiere que el tratamiento de la barra en combinación con las recomendaciones nutrimentales, efectivamente tienen el potencial para disminuir el porcentaje de grasa corporal. De acuerdo a la encuesta nacional de Salud (2012), ocho de cada 10 mujeres en el estado de Querétaro

presentan un porcentaje elevado de grasa abdominal, por lo cual intervenir sobre los factores de riesgo que inducen esta patología es una prioridad.

La grasa visceral se refiere a los depósitos de tejido adiposo que rodean órganos internos y en conjunto con la grasa subcutánea forma parte de la denominada grasa abdominal, como se ilustra en la Figura 17.

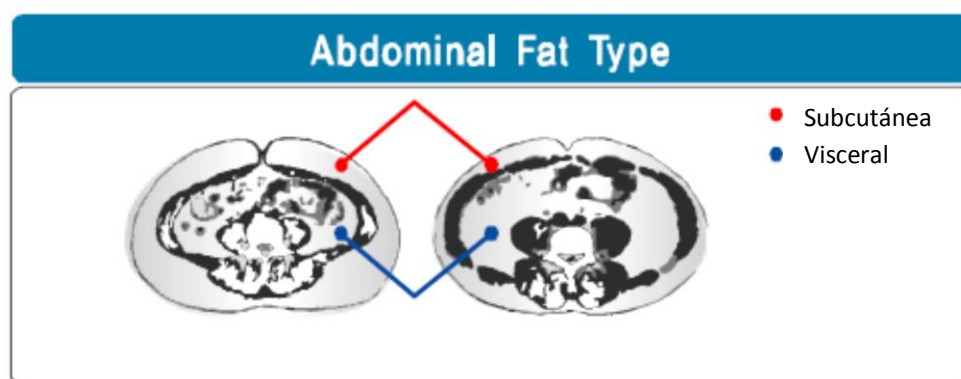


Figura 17. Tipos de grasa abdominal

Modificado de van der Berg Gómez (2011)

Específicamente, los depósitos de grasa visceral se han asociado con un mayor riesgo cardiovascular (Rosenquist *et al.*, 2013)

Además de que también se relacionan con dislipidemia y alteraciones en el metabolismo de glucosa. Se ha reconocido también, que es un factor independiente del IMC y perímetro abdominal (Brito-Zurita *et al.*, 2009; Rosenquist *et al.*, 2013), razón por la cual, este tipo de grasa se ha considerado patogénica.

En el presente estudio, el grupo de tratamiento se observó una reducción significativa de grasa visceral en comparación con la grasa inicial, mientras que en el grupo control no hubo cambio alguno. A pesar de que este cambio fue de pequeña magnitud, las repercusiones metabólicas pueden ser importantes al tratarse de un factor patogénico.

La evaluación del porcentaje de masa magra (músculo) mostró una ganancia significativa en la semana 7 del estudio, solamente para el grupo que consumió la barra. Mientras que para el grupo control, este cambio fue negativo, indicando que las participantes disminuyeron su masa magra en la tercera medición en comparación con el inicio del estudio. Regresando posteriormente al mismo nivel de cambio que se presentó durante las primeras semanas. Al

finalizar el periodo de evaluación, el cambio que se presentó no fue significativo en relación a las condiciones de partida.

De acuerdo a estos resultados y debido a que el frijol es un alimento con alto aporte proteico, se puede sugerir un posible efecto de la ingesta de la barra sobre la ganancia de músculo.

7.2.4 Análisis final de antropometría y marcadores clínicos

A las 7 semanas de iniciado el estudio, se observó una disminución drástica en la asistencia de las participantes para recibir su dotación de producto. Además de que algunas de ellas expresaron que les resultaba muy monótono el consumo diario de la barra. Razón por la cual, se decidió dar por concluido el estudio y se procedió a realizar la evaluación de antropometría y análisis clínicos. Los resultados obtenidos se describen en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Condiciones finales de participantes en el estudio clínico.

	Tratamiento n= 14	Control n= 13
Edad	37.53 ± 7.71	33.00 ± 7.40
Peso	72.11 ± 9.97	75.94 ± 17.66
Talla	155.73 ± 5.34	157.75 ± 8.27
IMC	29.83 ± 4.32	30.47 ± 6.47
Cintura	88.52 ± 9.11	88.37 ± 13.26
Cadera	106.05 ± 7.54	106.81 ± 12.63
Grasa (%)	38.14 ± 4.48	39.46 ± 6.66
Energía (Kcal)	2130.60 ± 800.91	2275.18 ± 870.36
Glucosa (mg/dL)	89.60 ± 8.74	89.59 ± 7.20
Colesterol (mg/dL)	182.26 ± 22.44	190.83 ± 22.98
Triglicéridos (mg/dL)	135.86 ± 54.96*	163.19 ± 54.04
HDL (mg/dL)	63.17 ± 8.16*	64.63 ± 9.06*
LDL (mg/dL)	91.91 ± 20.20	93.56 ± 16.76

Los resultados representan la media de tres experimentos independientes ± el error estándar. Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas $p < 0.05$ en la prueba de Tukey.

*Los valores difieren significativamente respecto a las condiciones iniciales para el grupo tratamiento (Triglicéridos $p = 0.0022$, HDL $p = 0.0065$) y para el grupo control (HDL $p = 0.0014$)

Los valores finales para el grupo control fueron menores que los iniciales en casi todas las variables, a excepción de porcentaje de grasa corporal el cual presentó un ligero aumento. Dichos cambios fueron más notables en

triglicéridos y HDL. Los niveles de triglicéridos fueron significativamente menores respecto al punto inicial, mientras que HDL fue mayor en comparación con el valor inicial.

El grupo control también mostró disminución en varios parámetros, excepto en grasa corporal y colesterol. El único cambio significativo fue en HDL, observándose mayores valores que los iniciales.

Para conocer el efecto del consumo de la barra sobre las mediciones antropométricas, se determinó el cambio que hubo entre las condiciones iniciales y finales para ambos grupos. Los datos obtenidos se muestran en el Cuadro 16.

Cuadro 16. Efecto del consumo de la barra de frijol-avena sobre antropometría y composición corporal de las participantes en el estudio clínico

	tratamiento n=14	Control n=13	Valor p
Peso (Kg)			
Inicial	76.31 (67.46,79.14)	76.26 (67.17, 85.05)	
Final	72.11 (66.58, 77.63)	75.94 (66.53, 85.35)	
Cambio	-1.19 (-2.43, -0.049)	-0.34 (-1.58, 0.90)	0.328
IMC			
Inicial	30.3 (27.64, 32.95)	30.58 (27.34, 33.82)	
Final	29.83 (27.43, 32.22)	30.47 (27.02, 33.92)	
Cambio	-0.46 (-0.91,-0.02)	-0.11 (-0.67, 0.45)	0.297
Cintura (cm)			
Inicial	89.76 (84.61, 94.91)	89.95 (83.64, 96.25)	
Final	88.52 (83.47, 93.56)	88.37 (81.02, 95.72)	
Cambio	-1.24 (-3.11, 0.63)	-1.56 (-3.22, 0.09)	0.784
Cadera (cm)			
Inicial	107.72 (103.07, 112.37)	108.25 (101.88, 114.62)	
Final	106.05 (101.57, 110.22)	106.80 (99.81, 113.80)	
Cambio	-2.65 (-4.34, -0.96)	-1.05 (-2.60, 0.50)	0.145
Grasa (%)			
Inicial	38.51 (36.16, 40.85)	38.32 (36.11, 40.53)	
Final	38.14 (35.66, 40.62)	39.46 (35.76, 43.15)	
Cambio	-0.36 (-1.26, 0.54)	1.23 (-0.82, 3.29)	0.121
Energía (Kcal)			
Inicial	2675.46 (2194.83,3156.01)	2569.78 (2078.81, 3060.75)	
Final	2130.60 (1687.07, 2574.12)	2275.18 (1772.65, 2777.71)	
Cambio	-432.79 (-1033.43, 167.83)	-200.26 (-690.52, 289.99)	0.346

Los resultados obtenidos por un análisis de varianza de una vía, se expresan como la media y su intervalo de confianza 95% [CI95%]. *Diferencias significativas entre grupos $p < 0.05$ en la prueba t de student.

En este cuadro se muestran los valores de las variables evaluadas al finalizar el estudio. Se puede observar que los niveles de triglicéridos fueron significativamente menores respecto al punto inicial y al grupo control, siendo esta variable la que tuvo el cambio más importante. La concentración de HDL también se redujo al finalizar el estudio, aun cuando este cambio no fue significativo al comparar entre grupos.

Para conocer el efecto del consumo de la barra sobre las mediciones antropométricas, se determinó el cambio que hubo entre las condiciones iniciales y finales para ambos grupos. Los datos obtenidos se muestran en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Efecto del consumo de la barra de frijol-avena sobre antropometría y composición corporal de las participantes en el estudio clínico

	tratamiento n=14	Control n=13	Valor p
Peso (Kg)			
Inicial	76.31 (67.46,79.14)	76.26 (67.17, 85.05)	0.328
Final	72.11 (66.58, 77.63)	75.94 (66.53, 85.35)	
Cambio	-1.19 (-2.43, -0.049)	-0.34 (-1.58, 0.90)	
IMC			
Inicial	30.3 (27.64, 32.95)	30.58 (27.34, 33.82)	0.297
Final	29.83 (27.43, 32.22)	30.47 (27.02, 33.92)	
Cambio	-0.46 (-0.91,-0.02)	-0.11 (-0.67, 0.45)	
Cintura (cm)			
Inicial	89.76 (84.61, 94.91)	89.95 (83.64, 96.25)	0.784
Final	88.52 (83.47, 93.56)	88.37 (81.02, 95.72)	
Cambio	-1.24 (-3.11, 0.63)	-1.56 (-3.22, 0.09)	
Cadera (cm)			
Inicial	107.72 (103.07, 112.37)	108.25 (101.88, 114.62)	0.145
Final	106.05 (101.57, 110.22)	106.80 (99.81, 113.80)	
Cambio	-2.65 (-4.34, -0.96)	-1.05 (-2.60, 0.50)	
Grasa (%)			
Inicial	38.51 (36.16, 40.85)	38.32 (36.11, 40.53)	0.121
Final	38.14 (35.66, 40.62)	39.46 (35.76, 43.15)	
Cambio	-0.36 (-1.26, 0.54)	1.23 (-0.82, 3.29)	
Energía (Kcal)			
Inicial	2675.46 (2194.83,3156.01)	2569.78 (2078.81, 3060.75)	0.346
Final	2130.60 (1687.07, 2574.12)	2275.18 (1772.65, 2777.71)	
Cambio	-432.79 (-1033.43, 167.83)	-200.26 (-690.52, 289.99)	

Los resultados obtenidos por un análisis de varianza de una vía, se expresan como la media y su intervalo de confianza 95% [CI95%]. *Diferencias significativas entre grupos $p < 0.05$ en la prueba t de student.

De acuerdo a los datos analizados, no se observaron diferencias estadísticas en cuanto a antropometría y composición corporal. Sin embargo, se encontró una tendencia a reducir peso y grasa corporal en el grupo que consumió la barra. Tales hallazgos, aunque no fueron estadísticamente significativos, podrían tener una posible relevancia a nivel fisiológico. En el caso del peso, el grupo tratamiento redujo aproximadamente un kilo de peso cuando la única intervención fue el consumo de este producto, sin dieta de restricción calórica ni actividad física, disminución que además fue 30% superior al grupo control. Esta observación es un indicio de que podemos centrar la atención en un análisis más detallado en el futuro.

Uno de los factores que podrían explicar la falta de cambios en antropometría durante el estudio es que posiblemente se necesitaba más tiempo para poder apreciar estas diferencias. Se ha visto en otros estudios clínicos, que la administración de suplementos ha tenido efectos a partir de la cuarta semana (Celleno *et al.*, 2007). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la mayoría de los trabajos publicados en esta área, utilizan extractos purificados, o concentrados del compuesto de interés. Por ejemplo, en el mismo tipo de estudio de Celleno *et al.* (2007), se le administró a sujetos obesos, 445 mg de un extracto encapsulado de *P. vulgaris*, además, la dieta fue controlada, de manera que los participantes consumían de 2000 a 2200 Kcal/día. Después de 30 días de suplementación se observaron cambios en peso, IMC, grasa y cintura/cadera. En este caso, se está proporcionando el refrigerio completo como una forma de sustituir alimentos altamente calóricos que comúnmente se consumen durante la colación o refrigerio. Además, la dieta no fue controlada, puesto que la forma en la que la barra se consumiría sería como un alimento de conveniencia y no como un fármaco o suplemento alimenticio. Otros estudios en donde la matriz alimentaria es menos compleja, tampoco se han encontrado disminuciones en composición corporal y antropometría. Clifton *et al.* (2009) realizaron un estudio con 215 individuos con sobrepeso y obesidad (20-65 años), sin poder ver cambios después de 12 semanas de seguir una dieta hipocalórica alta en proteína. Por otra parte, existen publicaciones con intervenciones de una mayor duración. Rosado *et al.* (2011) encontró un efecto sobre la disminución de peso sólo a partir de 4 meses de ingesta de leche reducida en grasa adicionada con micronutrientes, en comparación con leche normal. De igual manera, el IMC mostró un menor valor a partir de 1 mes de ingerir este alimento. Cabe mencionar que el estudio se realizó con 139 mujeres de la zona rural de Querétaro, a las que se les dio una dieta con reducción de 500 Kilocalorías en base a su ingesta habitual.

En cuanto al efecto del consumo de la barra sobre los marcadores clínicos, los resultados encontrados se detallan en el Cuadro 18.

Cuadro 18. Efecto del consumo de la barra de frijol-avena sobre marcadores clínicos de las participantes en el estudio clínico

	Tratamiento n=14	Control n=13	Valor p ¹
Glucosa (mg/dL)			
Inicial	93.22 (88.04, 98.41)	87.72 (82.81, 92.63)	
Final	89.6 (84.31, 94.88)	89.59 (85.01, 94.16)	
Cambio	-3.3 (-6.41, -0.18)	2.37 (-2.14, 6.88)	0.031*
Colesterol (mg/dL)			
Inicial	189.25 (171.18, 207.32)	191.14 (170.51, 211.77)	
Final	182.26 (168.70, 195.82)	190.83 (176.22, 205.43)	
Cambio	-0.48 (-14.13, 13.16)	10.92 (-1.43, 23.29)	0.19
Triglicéridos (mg/dL)			
Inicial	208.18 (176.62, 239.73)	182.28 (154.90, 209.66)	
Final	135.87 (102.65, 169.08)*	163.19 (128.85, 197.52)	
Cambio	-60.69 (-95.91, -25.47)	-11.52 (-45.42, 22.36)	0.038*
HDL (mg/dL)			
Inicial	53.71 (48.90, 58.51)	53.00 (48.70, 57.30)	
Final	63.17 (58.24, 68.11)*	64.63 (58.87, 70.38)*	
Cambio	9.66 (5.16, 14.16)	10.99 (3.50, 18.47)	0.737
LDL (mg/dL)			
Inicial	93.90 (77.52, 110.28)	101.68 (84.11, 119.24)	
Final	91.91 (79.70, 104.12)	93.56 (82.91, 104.21)	
Cambio	1.99 (-11.10, 15.08)	2.24 (-8.19, 12.68)	0.974

Los resultados obtenidos por un análisis de varianza de una vía, se expresan como la media y su intervalo de confianza 95% [CI95%].¹ Valor p de la comparación de cada par de medias entre control y grupo de barra en la prueba t de student. *Diferencias significativas entre grupos p<0.05 en la prueba t de student.

*Diferencias significativas respecto a las condiciones iniciales en la prueba t de student p< 0.05

Fueron dos las variables que tuvieron relevancia estadística para esta investigación. Tanto triglicéridos como glucosa disminuyeron significativamente en el grupo tratamiento. Pudo observarse también un incremento en los niveles de HDL en ambos grupos en contraste con las condiciones iniciales aunque no este cambio fue de la misma magnitud para ambos grupos de estudio, es decir no hubo diferencias entre el grupo control y tratamiento. La concentración de HDL fue de 63.17 mg/dL para el grupo de barras y de 64.63 mg/dL para el grupo control, por lo que independientemente de la intervención, probablemente la orientación alimentaria tuvo un efecto sobre los hábitos de consumo de grasas poliinsaturadas.

La concentración de glucosa tuvo una modesta reducción en el orden del 3.5% para el grupo tratamiento (de 93.22 mg/dL a 89.6 mg/dL) y un aumento de 2.5% para el control (de 87.72 mg/dL a 89.59 mg/dL). Lo anterior sugiere que efectivamente el consumo de este alimento podría mejorar los niveles de glucosa en suero, aunque debido a la modesta reducción observada en este estudio, no se podría llegar a una conclusión definitiva. En este sentido, existe evidencia de que el consumo de diferentes variedades de frijol induce una baja respuesta glicémica y mejora el control de glucosa en pacientes con diabetes mellitus tipo II. Sievenpiper *et al.* (2009) realizaron meta-análisis en donde examinaron 41 estudios que evalúan el efecto del consumo de leguminosas en la dieta normal, en una dieta rica en alimentos con bajo índice glicémico y en una rica en fibra. Los análisis realizados demostraron que de cualquier forma, el consumo de leguminosas mejora marcadores de control glicémico, incluyendo hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) y fructosamina. Incluso en pacientes con diabetes tipo II, la simple inclusión de *P. vulgaris* en la dieta puede mejorar los niveles de glicemia. Principalmente, el contenido de almidón resistente y carbohidratos de lenta digestión, se han asociado a esta disminución. Así también, el contenido de fibra dietética de frijol, tiene la capacidad de atrapar nutrientes, como glucosa o colesterol, disminuyendo su absorción en el tracto intestinal.

Además, la barra contiene un porcentaje significativo de avena (26%), cuya fracción soluble, específicamente los β -glucanos, han sido reconocidos con efecto cardioprotector por la FDA. La viscosidad de estos compuestos en solución, disminuye la rapidez de absorción. Se ha comprobado que las fibras viscosas reducen la respuesta postprandial con mayor eficacia que aquellas no viscosas (Jenkins *et al.*, 2008).

La segunda variable que mostró un cambio significativo y que además fue el hallazgo más importante en esta investigación, fue en el contenido de triglicéridos. La reducción observada para el grupo tratamiento fue del orden del 29% (de 208 mg/dL a 135.87 mg/dL), mientras que en el grupo control la concentración de triglicéridos aumentó 6% (de 182.28 mg/dL a 163.19 mg/dL) al finalizar el estudio.

Son limitadas las publicaciones encontradas respecto al efecto de frijol sobre triglicéridos séricos en estudios clínicos. Existe una serie de estudios clínicos que reportan disminución de triglicéridos después de la ingesta de extractos de *P. vulgaris* con alto contenido del inhibidor de α -amilasa (Erner & Meiss, 2003; Udani *et al.*, 2004; Koike *et al.*, 2005). La reducción más considerable se obtuvo después de 8 semanas de suplementación, siendo en promedio de -26.3mg/dL en comparación con -8.2 mg/dL en el grupo placebo (Udani *et al.*, 2004).

En otro estudio (Zhu *et al.*, 2012), diferentes proporciones de frijol rojo cocido se incorporaron a la dieta de ratas Sprague-Dawley y ratones C57B1/6 (con obesidad inducida por dieta). Después de 7 días, se encontraron reducciones de hasta 30% con la dosis más alta de frijol (46.5%). En concordancia con estos hallazgos, otro grupo de investigadores observaron una disminución en triglicéridos al administrar semilla de frijol blanco a ratas hiperlipemicas (Abdel-Rahim *et al.*, 2013).

Aun así, los datos encontrados en otras publicaciones no son consistentes. Se ha reportado que no se observaron efectos o incluso aumentaron los niveles de triglicéridos al suplementar la dieta con frijol común (Bourdon *et al.*, 2001; Winham & Hutchins, 2007; Winham *et al.*, 2007; Finley *et al.*, 2007).

En cuanto a la avena, el efecto sobre triglicéridos séricos, también ha sido poco estudiado. Guevara-Cruz *et al.* (2012) evaluaron el cambio en triglicéridos en una muestra de 45 individuos a los que se les redujo su consumo calórico en 500 Kcal y se les administró una bebida que contenía 22 g de avena. Esta bebida que además tenía una mezcla de plantas como nopal, chía y soya, fue consumida dos veces al día durante 2 meses, mostrando al finalizar el tiempo de estudio, que sólo el grupo que consumió la bebida redujo los triglicéridos de 2.1 mmol/L a 1.8 mmol/L.

Existen diferentes mecanismos mediante los cuales los niveles de triglicéridos pueden disminuir. Entre ellos se encuentran procesos fisiológicos que regulan la ingesta/saciedad, absorción y metabolismo de lípidos. Se sabe que algunos compuestos bioactivos del frijol pueden modular dichos procesos.

Por ejemplo, la fracción no digerible del frijol al ser fermentada en el colon, produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Campos-Vega *et al.*, 2009). Se ha reportado que los AGCC pueden aumentar la secreción de ciertos neuropéptidos que promueven saciedad, incluyendo al neuropéptido tirosina-tirosina (PYY por sus siglas en inglés) y al péptido similar a glucagon 1 (GLP-1 por sus siglas en inglés), además de disminuir la producción de hormonas orexigénicas o que promueven el apetito, principalmente ghrelina (GRLH), la llamada hormona del hambre (Fantini *et al.*, 2009; Tolhurst *et al.*, 2012; Nilsson *et al.*, 2013; Spadafranca *et al.*, 2013)

Per se, los SCFA han mostrado ser efectivos para disminuir enzimas y factores de transcripción lipogénicos (Lin *et al.*, 1995). Especialmente el ácido acético inhibe la síntesis hepática de ácidos grasos y disminuye ácidos grasos libres en suero (Wolever *et al.*, 1989, Frost *et al.*, 2014). Altas concentraciones de ácido butírico tienen un efecto indirecto sobre la disminución de lípidos al promover un menor tiempo de tránsito cecal y al actuar como laxante (Han *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2005).

Otro posible mecanismo de disminución de triglicéridos, es la mejora en la depuración o aclaramiento de lipoproteínas transportadoras de triglicéridos en torrente sanguíneo (Katan, 2006). Específicamente VLDL, una de las principales moléculas transportadoras de triglicéridos, es catabolizada en hígado mediante los receptores de LDL (LDLR) (Goldstein & Brown, 2009). Esta ruta se ha evaluado en modelos animales, en donde extractos de frijol y almidón se han administrado a ratas. Después de dos semanas, el consumo del extracto de *P. vulgaris* provocó un aumento en la actividad de LDLR sugiriendo un aumento en el catabolismo de VLDL (Marzolo *et al.*, 1993). Fukushima *et al.* (2001) observaron que el almidón resistente de la variedad tebu y kintoki, disminuyó lípidos séricos e incrementó la expresión de LDLR en comparación con el grupo control

Por otra parte, se ha observado que la administración del frijol común tiene efecto sobre ciertas enzimas y factores de transcripción lipogénicos. En un estudio realizado con un extracto de fitosteroles de frijol negro, se encontró que la abundancia de ARNm y la expresión del factor de transcripción SREBP-1

disminuyó al igual que la expresión de las enzimas FAS y ACC, involucradas en la síntesis de ácidos grasos (precursores de triglicéridos) en un cultivo de hepatocitos de rata (Chávez-Santoscoy *et al.*, 2014a). Además, la menor expresión de CPT-1 indica un mayor grado de β -oxidación, proceso mediante el cual los triglicéridos son degradados por la célula para producir energía.

Una de las desventajas al realizar estudios clínicos es que la cantidad y tipo de muestras biológicas es limitado, los fluidos fácilmente disponibles son sangre u orina, lo que limita el estudio de mecanismos y rutas metabólicas en humanos. Para profundizar en el estudio de los mecanismos de disminución de triglicéridos, sería necesario en algunos casos contar con muestras de tejido como hígado o intestino. La obtención de las mismas, mediante biopsias u otro medio está fuera del enfoque de este estudio.

Una buena alternativa, es utilizar plasma o suero para medir los cambios en ciertos biomarcadores relacionados con el metabolismo de lípidos. En este estudio se realizó un análisis de las proteínas que pudieran estar involucradas tanto con el metabolismo lipídico así como con la respuesta inflamatoria.

7.4 Microarreglos de proteínas

El tipo de microarreglo utilizado en este estudio, fue un arreglo de anticuerpos de adipocinas para la medición de 182 proteínas. En el Cuadro 19 se enlistan las proteínas incluidas en el microarreglo y se clasifican por función de acuerdo a la ontología de genes.

Cuadro 19. Clasificación de las proteínas incluidas en el microarreglo de acuerdo a la ontología de genes

Categoría	Función	Valor p	Proteínas
Grupo 1			
GO:0009611	Respuesta a daño por herida	1.87E-36	NRP1, S100A8, PDGFB, PDGFA, CRP, TLR2, FGF10, TLR4, IL10, TGFB1, IL11, GPX1, SAA1, IL1B, LOX, CFD, FGF2, IL1A, IL25, IL6R, TNFAIP6, CD36, EREG, F3, ADAM17, NGF, CXCL1, CCL3, CCL2, TNF, C3, CLU, MST1, CCL5, TIMP3, CCL4, CCL7, MIF, TNFRSF1A, CCL25, TNFRSF1B, INS, PTX3, THBS1, IL6, BMP2, IL1RN, IGF1, CCL19, MSTN, IGF2, CCL16, CCL18, IGFBP1, BMPR1B, SELE, BMP6
GO:0006954	Respuesta inflamatoria	6.54E-28	CXCL1, CCL3, TNF, CCL2, S100A8, C3, CLU, CRP, TLR2, TLR4, CCL5, CCL4, CCL7, TGFB1, IL10, MIF, TNFRSF1A, CCL25, TNFRSF1B, INS, SAA1, IL1B, PTX3, CFD, THBS1, IL1A, BMP2, IL6, IL1RN, IL25, CCL19, IGF2, IL6R, CCL16, CCL18, TNFAIP6, F3, BMPR1B, SELE, BMP6, NGF
GO:0006952	Respuesta de defensa	3.96E-23	CXCL1, IL1R1, CCL3, CCL2, TNF, S100A8, C3, CLU, CRP, PPARG, TLR2, TLR4, CCL5, CCL4, CCL7, TGFB1, IL10, MIF, TNFRSF1A, CCL25, TNFRSF1B, INS, SAA1, IFNG, IL1B, PTX3, CFD, THBS1, IL1A, BMP2, IL6, IL1RL1, IL1RN, IL25, CST3, CCL19, IGF2, IL6R, CCL16, CCL18, TNFAIP6, F3, IL12A, BMPR1B, SELE, BMP6, NGF
GO:0006955	Respuesta inmune	5.54E-22	CXCL1, IL1R1, CCL3, TNF, CCL2, CXCL5, C3, CLU, CRP, PPARG, TLR2, TLR4, CCL5, TNFSF18, CCL4, CXCL12, CCL7, TGFB1, IL10, MIF, LIF, IGF1R, TNFRSF1A, CCL25, TNFRSF1B, IFNG, IL1B, FAS, PTX3, CFD, THBS1, IL1A, ICAM1, IL6, IL1RL1, IL1RN, CCL19, IL6R, CCL16, CCL18, OSM, VEGFA, IL12A, ADAM17, XCL1, BMP6, BMPR1A
Grupo 2			
GO:0032101	Regulación de la respuesta a estímulos externos	1.20E-31	PDGFB, C3, PDGFA, PPARG, FGF10, TLR4, CCL5, CXCL12, TGFB1, IL10, GPX1, TNFRSF1A, TNFRSF1B, INS, APOE, SAA1, AGT, THBS1, IL6, IGF2, IL6R, ADIPOQ, LEP, OSM, CNTF, SERPINF1, NPY, F3, VEGFA, ACE2, FABP4, GHRL, ADAM17, CARTPT, SELE
GO:0032103	Regulación positiva de la respuesta a estímulos externos	9.03E-22	IL6, PDGFB, C3, FGF10, TLR4, IL6R, CCL5, CXCL12, TGFB1, OSM, TNFRSF1A, CNTF, NPY, F3, AGT, VEGFA, FABP4, ADAM17, GHRL, THBS1
GO:0048584	Regulación positiva de la respuesta a estímulos	4.23E-21	TNF, PDGFB, C3, CLU, CRP, TLR2, FGF10, TLR4, CCL5, CXCL12, TGFB1, TNFRSF1A, INS, AGT, IL1B, THBS1, CFD, IL6, EDA2R, IGF2, IL6R, OSM, CNTF, EREG, NPY, F3, VEGFA, IL12A, FABP4, ADAM17, GHRL
Grupo 3			
GO:0010033	Respuesta a sustancias orgánicas	1.14E-25	PDGFB, PDGFA, LEPR, PPARG, TLR2, TLR4, IL10, TGFB1, TNFRSF11B, APOB, HTR1B, APOE, IFNG, IL1B, FAS, LOX, INSR, EGFR, IL6R, RETN, IL12A, ADAM17, GHRL, NGF, RBP4, IL1R1, TNF, CCL2, TSHB, TIMP4, CCL5, TIMP3, IGF1R, TNFRSF1A, PLIN2, INS, THBS1, AGRP, BMP4, IL6, IL1RN, MSTN, IGF2, ADIPOQ, LEP, GCG, GH1, FABP4, NEUROD1, IGFBP1, BMP7, IGFBP2, SELE
GO:0009725	Respuesta a estímulo hormonal	7.98E-25	RBP4, CCL2, TNF, PDGFB, PDGFA, LEPR, PPARG, TSHB, TIMP4, CCL5, TIMP3, TGFB1, IL10, IGF1R, HTR1B, TNFRSF11B, INS, IL1B, LOX, FAS, THBS1, AGRP, INSR, BMP4, IL6, IL1RN, MSTN, IGF2, IL6R, ADIPOQ, LEP, GCG, GH1, RETN, FABP4, GHRL, IGFBP1, IGFBP2, BMP7, NGF
GO:0009719	Respuesta a estímulo endógeno	2.61E-24	RBP4, CCL2, TNF, PDGFB, PDGFA, LEPR, PPARG, TSHB, TIMP4, CCL5, TIMP3, TGFB1, IL10, IGF1R, HTR1B, TNFRSF11B, INS, IL1B, LOX, FAS, THBS1, AGRP, INSR, BMP4, IL6, IL1RN, MSTN, IGF2, IL6R, ADIPOQ, LEP, GCG, GH1, RETN, FABP4, GHRL, ADAM17, IGFBP1, IGFBP2, BMP7, NGF
GO:0048545	Respuesta al estímulo de hormona esteroidea	1.09E-23	TNF, CCL2, PDGFB, PDGFA, LEPR, PPARG, TSHB, CCL5, TIMP3, TGFB1, IL10, HTR1B, TNFRSF11B, IL1B, LOX, FAS, THBS1, INSR, BMP4, IL6, IL1RN, MSTN, IL6R, ADIPOQ, GH1, FABP4, GHRL, IGFBP2, BMP7, NGF

GO:0031960	Respuesta al estímulo corticosteroide	4.82E-15	BMP4, IL6, TNF, CCL2, IL1RN, MSTN, IL6R, CCL5, ADIPOQ, IL10, HTR1B, IL1B, FABP4, FAS, IGFBP2, INSR, NGF
GO:0051384	Respuesta al estímulo glucocorticoide	2.54E-14	BMP4, IL6, TNF, CCL2, IL1RN, MSTN, IL6R, CCL5, ADIPOQ, IL10, IL1B, FABP4, FAS, IGFBP2, INSR, NGF
GO:0043627	Respuesta al estímulo de estrógeno	2.44E-12	BMP4, PDGFB, PDGFA, LEPR, PPARG, MSTN, TSHB, TIMP3, TGFB1, GH1, TNFRSF11B, IL1B, GHRL, BMP7, IGFBP2, INSR
Grupo 4*			
GO:0010647	Regulación positiva de la comunicación celular	2.07E-32	HCRT, CCL2, TNF, CSF1, LEPR, FGF10, TLR4, TGFB1, IL11, LIF, TNFRSF1A, GPX1, ECE1, INS, AGT, IFNG, TGFA, IL1B, EGF, THBS1, PRL, INSR, BMP4, EGFR, BMP2, IL6, LGALS1, IGF1, EDA2R, IGF2, IL6R, ADIPOQ, LEP, OSM, GH1, CNTF, EREG, F3, VEGFA, IL12A, GHRL, ADAM17, CARTPT, BMP7, BMPR1A
GO:0042327	Regulación positiva de fosforilación	2.56E-31	TNF, BMPR2, TLR4, TGFB1, IL11, LIF, INS, AGT, IFNG, IL1B, THBS1, EGF, FGF2, INSR, BMP4, EGFR, IL6, BMP2, IGF1, IGF2, IL6R, ADIPOQ, OSM, GH1, CNTF, EREG, IL12A, ADAM17, BMP7, BMPR1A
GO:0045937	Regulación positiva del proceso metabólico del fosfato	6.74E-31	TNF, BMPR2, TLR4, TGFB1, IL11, LIF, INS, AGT, IFNG, IL1B, THBS1, EGF, FGF2, INSR, BMP4, EGFR, IL6, BMP2, IGF1, IGF2, IL6R, ADIPOQ, OSM, GH1, CNTF, EREG, IL12A, ADAM17, BMP7, BMPR1A
GO:0010562	Regulación positiva del proceso metabólico del fósforo	6.74E-31	TNF, BMPR2, TLR4, TGFB1, IL11, LIF, INS, AGT, IFNG, IL1B, THBS1, EGF, FGF2, INSR, BMP4, EGFR, IL6, BMP2, IGF1, IGF2, IL6R, ADIPOQ, OSM, GH1, CNTF, EREG, IL12A, ADAM17, BMP7, BMPR1A
GO:0009967	Regulación positiva de la transducción de señales	1.55E-29	TNF, CSF1, LEPR, FGF10, TLR4, TGFB1, IL11, LIF, TNFRSF1A, GPX1, ECE1, INS, AGT, IFNG, TGFA, IL1B, EGF, THBS1, PRL, INSR, BMP4, BMP2, IL6, LGALS1, IGF1, EDA2R, IGF2, IL6R, ADIPOQ, LEP, OSM, GH1, CNTF, EREG, F3, VEGFA, IL12A, GHRL, ADAM17, BMP7, BMPR1A
GO:0001932	Regulación de la fosforilación de aminoácidos	1.17E-27	TNF, PDGFB, PDGFA, BMPR2, TLR4, TGFB1, IL11, LIF, INS, AGT, IFNG, IL1B, PDGFC, PDGFD, EGF, FGF2, INSR, BMP4, EGFR, BMP2, IL6, IGF1, IGF2, IL6R, ADIPOQ, OSM, GH1, CNTF, IL12A, ADAM17, BMP7, IGFBP3, BMPR1A
Grupo 5			
GO:0007610	Comportamiento	5.10E-21	CXCL1, HCRT, CCL3, CCL2, CXCL5, PDGFB, PDGFA, LEPR, FGF10, CCL5, CCL4, CXCL12, CCL7, IL10, CCL25, BDNF, HTR1B, SAA1, AGT, IFNG, IL1B, SEMA3A, AGRP, FGF2, IL6, CCL19, IL6R, CCL16, CCL18, LEP, OSM, GCG, NPY, ACE2, GHRL, CARTPT, PYY, XCL1, NGF
GO:0042330	Taxis	1.92E-18	CXCL1, IL6, CCL3, CCL2, CXCL5, PDGFB, PDGFA, FGF10, CCL19, IL6R, CCL5, CCL16, CXCL12, CCL4, CCL7, IL10, CCL18, CCL25, SAA1, IFNG, IL1B, SEMA3A, XCL1, FGF2
GO:0006935	Quimiotaxis	1.92E-18	CXCL1, IL6, CCL3, CCL2, CXCL5, PDGFB, PDGFA, FGF10, CCL19, IL6R, CCL5, CCL16, CXCL12, CCL4, CCL7, IL10, CCL18, CCL25, SAA1, IFNG, IL1B, SEMA3A, XCL1, FGF2
GO:0007626	Comportamiento locomotor	3.44E-14	CXCL1, CCL3, CCL2, PDGFB, CXCL5, PDGFA, FGF10, CCL5, CCL4, CXCL12, CCL7, IL10, CCL25, SAA1, IFNG, IL1B, SEMA3A, FGF2, IL6, CCL19, IL6R, CCL16, CCL18, XCL1, NGF

La clasificación se realizó con el programa DAVID “Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery” (<https://david.ncicrf.gov/>). * Se muestran los primeros 6 procesos con el mayor valor p, de un total de 38 procesos.

El análisis arrojó cinco grandes grupos funcionales, cuyos procesos principales están relacionados con la respuesta inflamatoria, respuesta inmune, respuesta a estímulos externos y hormonales, regulación del metabolismo de fósforo, movimiento celular y comportamiento.

Los resultados obtenidos del análisis de microarreglos se describen en esta sección. En la Figura 18 se puede ver la imagen adquirida después de la lectura del microarreglo por el escáner láser GenePix™.

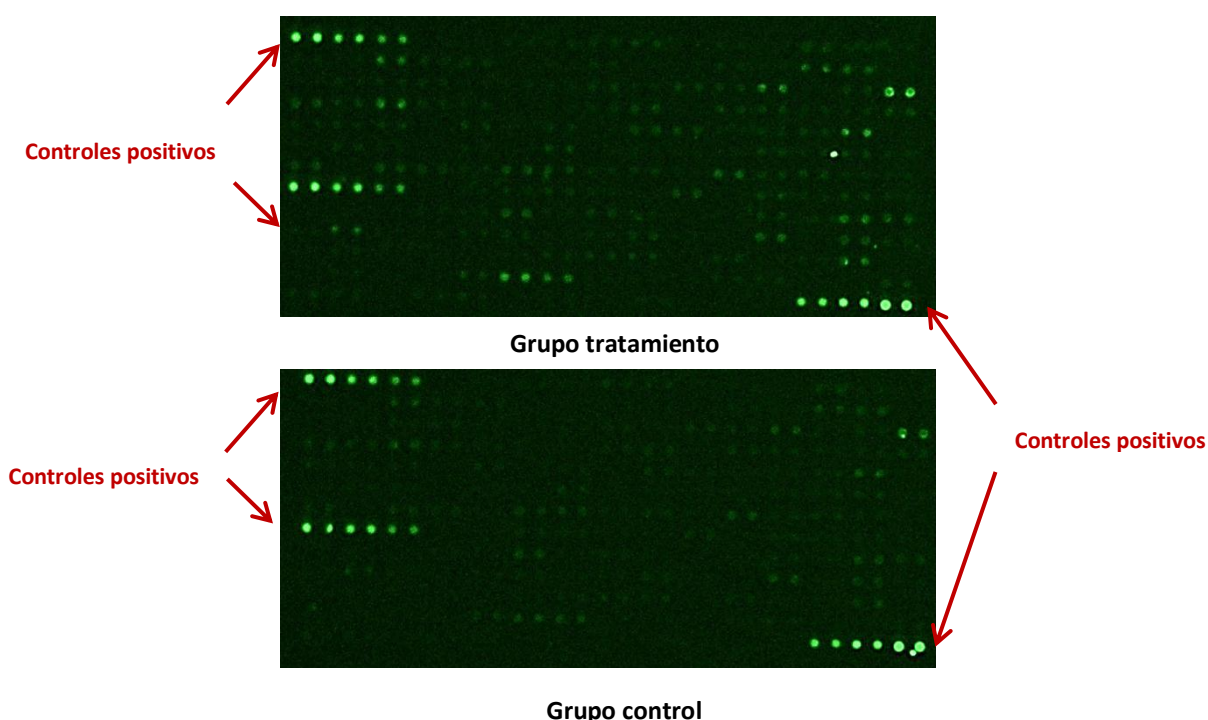


Figura 18. Imagen de la señal fluorescente de los microarreglos de proteínas

Cada punto corresponde a una proteína diferente, siendo aquellos con mayor intensidad los controles positivos que se utilizaron para la normalización de las señales.

La normalización se realizó intra e intermicroarreglos para homogenizar la media de la intensidad de los controles positivos. Se tomó como referencia el primer chip analizado para hacer el ajuste. En la Figura 19 se observa la dispersión de los datos, expresados en logaritmo base 2 del radio de abundancia (calculado como el cociente de la intensidad de los controles entre

la intensidad del control de referencia) de los controles positivos para los cuatro microarreglos.

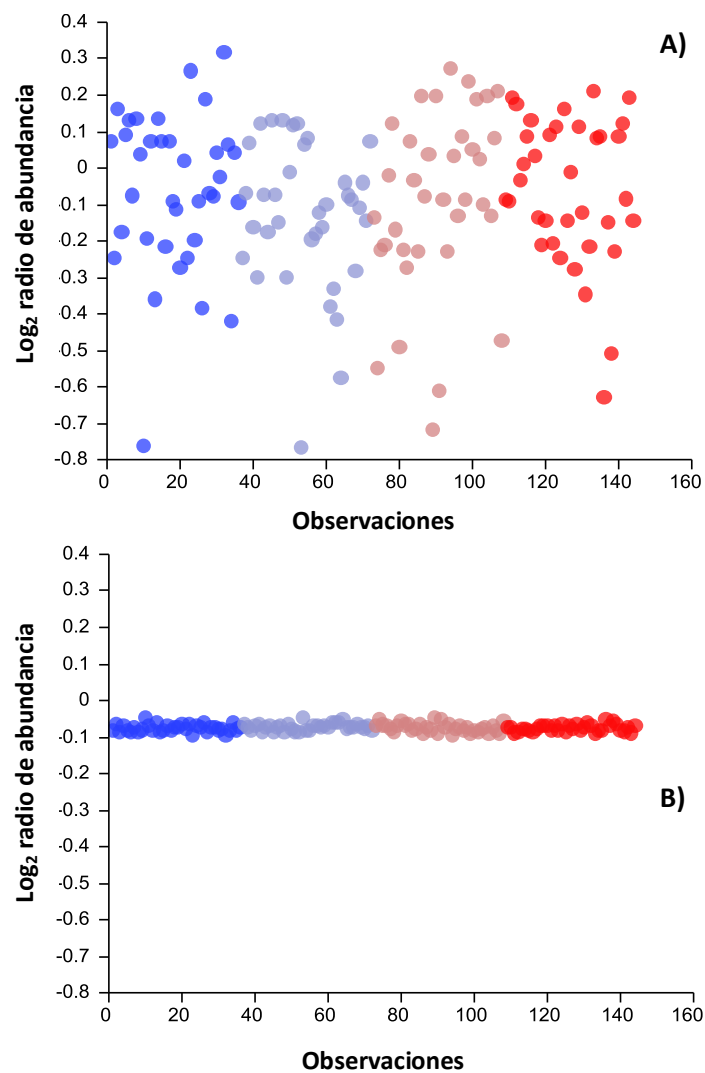


Figura 19. Normalización de controles positivos de los diferentes microarreglos
 A) Antes de normalizar, B) Después de normalizar

7.4.1 Análisis bioinformático: IPA Qiagen

Una vez que se filtraron los resultados y que se realizaron los ajustes estadísticos básicos, se tuvo un total de 40 proteínas diferencialmente expresadas. En el Cuadro 20 se detallan las características y radio de

expresión diferencial de las 40 proteínas. Se indican aquellas que tuvieron un aumento en su expresión con una flecha roja y las que disminuyeron con una flecha verde.

Cuadro 20. Proteínas diferencialmente expresadas por efecto del consumo de la barra

Proteína	Abreviatura (microarreglo)	Símbolo oficial ¹	Radio de expresión diferencial (log2)	valor p*
Enzima convertidora de angiotensina I	ACE / CD43	ACE	↑ 2.53	0.0097
Enzima convertidora de angiotensina II	ACE-2	ACE2	↓ -1.41	0.2635
Factor similar a angiopoyetina	Ang-like Factor	ANGPTL	↓ -2.00	0.8161
Proteína morfogenética ósea 3	BMP-3	BMP3	↓ -1.49	0.6484
Factor de diferenciación de crecimiento	BMP-3b / GDF-10	GDF10	↓ -2.18	0.0524
Proteína morfogenética ósea 7	BMP-7	BMP7	↓ -2.67	0.2517
Receptor de la proteína morfogenética ósea tipo 2	BMPr-II	BMPr2	↓ -1.40	0.6205
Factor de crecimiento nervioso beta	b-NGF	NGF	↓ -2.38	0.3229
Receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (miembro 9)	CD137 (4-1BB)	TNFRSF9	↑ 1.73	0.0802
TYRO3 Proteína tirosina quinasa	Dtk	TYRO3	↓ -1.86	0.0537
Receptor del factor de crecimiento epidermal	EGF-R	EGFR	↓ -1.63	0.2984
Factor de crecimiento de fibroblastos 10	FGF-10	FGF10	↓ -2.73	0.8069
Hormona del crecimiento 1	GH (Growth Hormone)	GH1	↓ -1.29	0.0850
Ghrelina/Obestatina	Ghrelin	GHRL	↑ 2.06	0.2350
Transportador de glucosa miembro 2	Glut2	SLC2A2	↓ -1.32	0.4699
Interleucina 11	IL-11	IL11	↑ 1.69	0.1640
Interleucina 25	IL-25 / IL-17E	IL25	↑ 1.12	0.7129
Factor inhibidor de leucemia	LIF	LIF	↑ 1.27	0.5624
Factor estimulante de colonias de macrófagos 1	M-CSF	CSF1	↓ -1.75	0.1976
Ligando de quimiocina 3 (motivo C-C)	MIP-1a	CCL3	↓ -2.43	0.1448
Neuropilina 1	Neurophilin-2	NRP1	↑ 1.59	0.7632
Hipocretina (Orexina)	Orexin A	HCRT	↑ 1.40	0.5533
Oncostatina M	OSM	OSM	↓ -1.79	0.5099
Osteonectina	Osteonectin	SPARC	↓ -3.30	0.0409
Factor de crecimiento derivado de plaquetas C	PDGF-C	PDGFC	↓ -1.64	0.5118
Proteína homóloga similar a delta 1 (Drosophila)/factor de preadipocitos	Pref-1	DLK1	↑ 2.18	0.0739
Prohibitina	Prohibitin	PHB	↑ 1.21	0.2088
Proteína de unión a retinol	RBP4	RBP4	↓ -1.46	0.1189
Proteína similar a resistina beta	RELMb	RETNLB	↓ -1.40	0.2802
Regulador de la 5-hidroxitriptamina (serotonina) oxigenasa	Serotonin	HTOR	↓ -1.90	0.0146

Factor de crecimiento transformante beta 1	TGF-b	TGFB1	↓ -1.48	0.4970
Trombospondina 1	Thrombospondin 1	THBS1	↓ -1.92	0.2536
TIMP inhibidor de metalopeptidasa 1	TIMP-1	TIMP1	↓ -1.74	0.0081
TIMP inhibidor de metalopeptidasa 2	TIMP-2	TIMP2	↓ -2.08	0.2193
Factor de coagulación 3 (tromboplastina, factor tisular)	Tissue factor (CD142)	F3	↑ 2.75	0.1021
Receptor tipo Toll 2	TLR2	TLR2	↑ 1.43	0.3607
Receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (miembro 1B)	TNF sRII	TNFRSF1B	↑ 1.73	0.3235
Hormona estimulante de la tiroides beta	TSH	TSHB	↓ -3.47	0.0744
Molécula de adhesión vascular 1	VCAM1	VCAM1	↓ -1.67	0.0660

¹ De acuerdo a HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org/>) *Valor p obtenido en la prueba t de student, se consideraron diferencias significativas cuando p<0.05 ↑ Indica aumento en la expresión, ↓ Indica disminución en la expresión.

El parámetro estadístico que se tomó como base para la interpretación de los resultados fue el radio de expresión diferencial. Este conjunto de datos se analizó mediante el software IPA® de Qiagen para su interpretación. Las proteínas se agruparon de acuerdo a su función fisiológica, ruta metabólica y se agruparon de acuerdo a su participación en el desarrollo de enfermedades o desórdenes. El Cuadro 21 muestra una recopilación de esta clasificación.

Cuadro 21. Clasificación de proteínas diferencialmente expresadas de acuerdo a su función biológica o desorden metabólico

Clasificación	Proteínas involucradas	Valor p
Rutas canónicas		
Ruta de señalización de HMGB1	IL11, IL25, LIF, OSM, TGFB1, TNFRSF1B, VCAM	3.43 E-09
Activación de receptores para reconocimiento de patógenos	IL11, IL25, LIF, OSM, TGRB1, TLR2	1.32 E-07
Ruta de señalización de aterosclerosis	CSF1, F3, PDGFC, RBP4, TGFB1, VCAM1	1.39 E-07
Ruta de señalización de NF-kB	BMPR2, EGFR, GH1, NGF, TLR2, TNFRSF1B	1.05 E-06
Ruta de adipogénesis	BMP7, BMPR2, DLK1, TGFB1	1.19 E-04
Función fisiológica		
Morfología del tejido	BMP7, BMPR2, CCL3, CSF1, DLK1, EGFR, F3, FGF10, GH1, GHRL, IL11, IL25, LIF, NGF, NRP1, OSM, PDGFC, SPARC, TGFB1, THBS1, TIMP1, TIMP2, TLR2, TNFRSF1B, TNFRSF9, TYRO3, VCAM1	8.14 E-18 a 3.99 E-06
Sistema cardiovascular, desarrollo y función	BMP7, BMPR2, CSF1, EGFR, F3, FGF10, GHRL, NGR, NRP1, OSM, PDGFC, RBP4, SPARC, TGFB1, THBS1, TIMP2, VCAM1	2.12 E-17 a 2.36 E-06
Respuesta inflamatoria	ACE, CCL3, CSF1, EGF4, GHRL, IL11, IL25, LIF, NGF, OSM, RETNLB, TGFB1, THBS1, TLR2, TNFRSF1B, TNFRSF9, TYRO3, VCAM1	3.21 E-16 a 3.59E-06
Tráfico de células inmunes (infiltración, migración de leucocitos, adhesión)	BMPR2, CCL3, CSF1, EGFR, F3, IL25, OSM, SPARC, TGFB1, THBS1, TIMP1, TLR2, TNFRSF1B, TNFRSF9, VCAM1	5.11 E-15 a 3.59 E-06
HMGB1- grupo de alta movilidad de proteína B1		

De acuerdo al análisis realizado, las funciones de mayor relevancia en las que intervienen las proteínas diferencialmente expresadas están relacionadas con la respuesta inflamatoria, el sistema cardiovascular y en menor medida con adipogénesis. La ruta más significativa fue la del grupo de alta movilidad de proteína B1 (HMGB1), proteína que está implicada en la respuesta inmune y en cascadas de señalización de citocinas (Uniprot, 2014). Se localiza en monocitos y macrófagos, en

donde una vez liberada de los lisosomas HMGB1 se regula de manera autócrina activando diferentes tipos de receptores, entre los más importantes para este estudio se encuentran el receptor de productos de glicación avanzada (RAGES) y el receptor tipo Toll 2 (TLR2), desencadenando eventos de migración celular, aumento de moléculas de adhesión, además de provocar la liberación de citocinas y quimiocinas, especialmente TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, IL-8 y MCP1 (Harris *et al.*, 2012). En esta ruta ciertas proteínas inflamatorias se vieron incrementadas como IL11 e IL25, aunque otras moléculas se vieron disminuidas como OSM y VCAM-1. En este sentido, los resultados no fueron concluyentes debido a que fueron pocas las proteínas que coinciden con esta ruta canónica, además de tener valores de expresión contradictorios

El análisis indicó que la ruta canónica de activación de receptores para reconocimiento de patógenos también fue significativa de acuerdo a las proteínas reguladas. Esta ruta está implicada en la respuesta inmune innata y se activa de manera importante vía TLR2. Este receptor transmembranal puede iniciar una cascada inflamatoria mediada por el factor de transcripción nuclear NF- κ B que induce la producción de citocinas proinflamatorias. En la Figura 20 se detalla la vía de NF- κ B resaltando en rojo y verde las proteínas reguladas en el análisis de microarreglos.

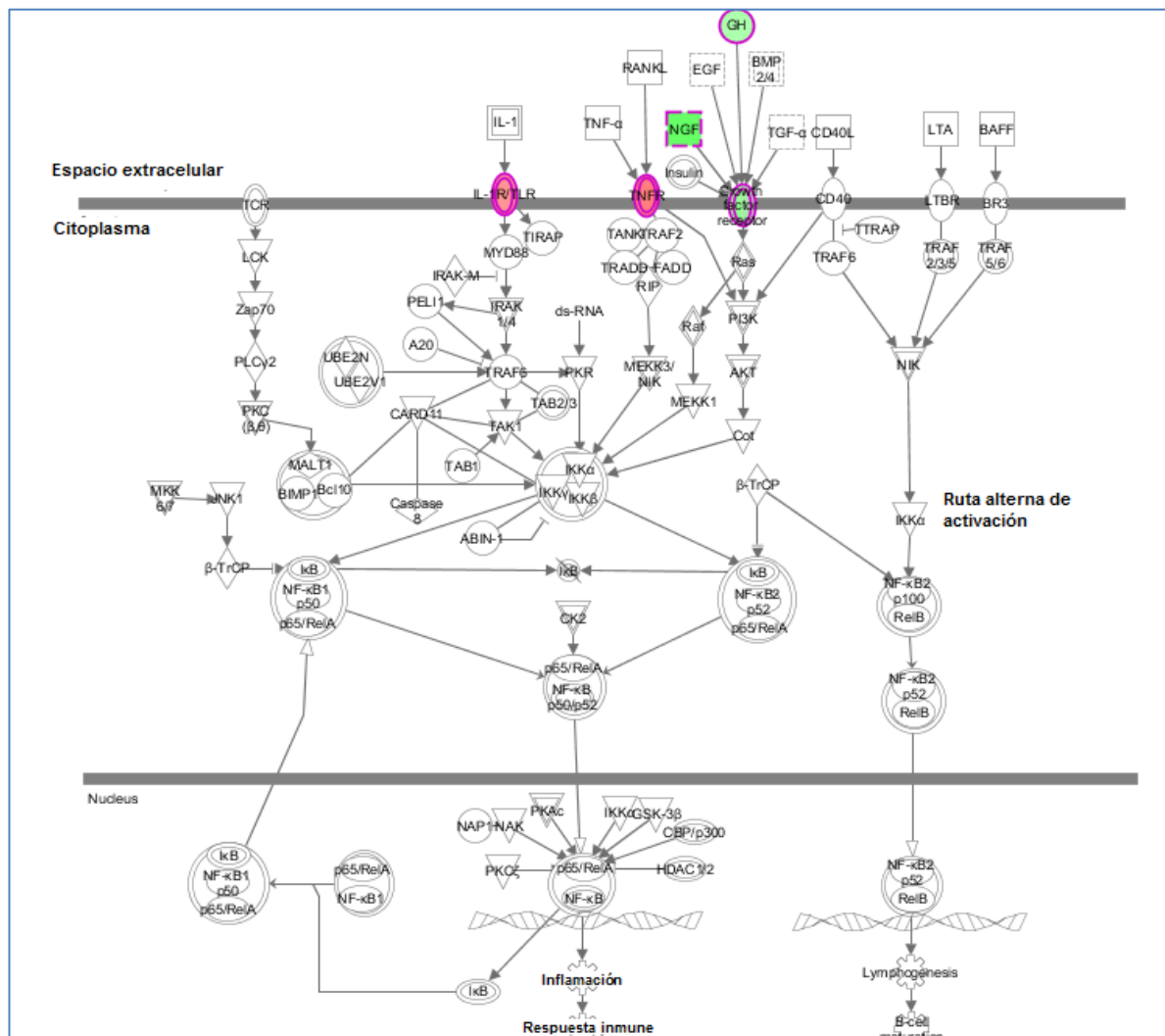


Figura 20. Ruta NF-κB que indica la regulación de las proteínas expresadas diferencialmente

En verde las proteínas que disminuyeron expresión y en rojo proteínas que aumentaron

Espacio extracelular

Citoplasma

Núcleo

Ruta alterna de activación

PREDICCIÓN:

- Alto (rojo)
- Bajo (verde)
- Aumento (naranja)
- Disminución (azul)
- Activación (naranja)
- Inhibición (azul)
- Hallazgos inconsistentes con el estado de moléculas río abajo (amarillo)
- Efecto no predicho (gris)

PREDICCIÓN: relaciones

- Conduce a activación (línea naranja)
- Conduce a inhibición (línea azul)
- Hallazgos inconsistentes con el estado de moléculas río abajo (línea amarilla)
- Efecto no predicho (línea gris)

*El color morado indica expresión diferencial de proteínas en el experimento

107

la vía inflamatoria, aunque este resultado debe tomarse con precaución debido a que sólo se tiene el cambio en expresión de una proteína.

La siguiente ruta canónica de interés, es el sistema cardiovascular. De las proteínas involucradas con este proceso fisiológico, se puede predecir una red metabólica que incluye dichas proteínas y otras moléculas que podrían ser afectadas en esta vía. En la Figura 22 se muestra la red metabólica cardiovascular para este experimento.

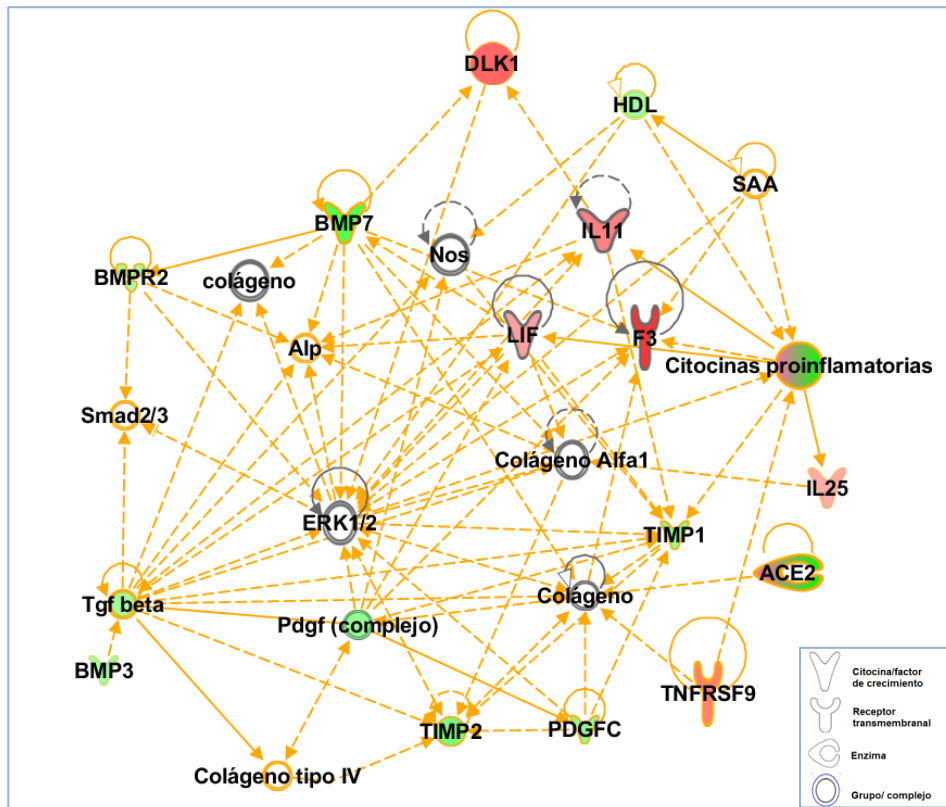


Figura 22. Red metabólica relacionada con desórdenes cardiovasculares

En esta red metabólica convergen también algunas proteínas relacionadas con el proceso inflamatorio, como el grupo de proteínas quinasas ERK involucrado en la cascada de señalización para la liberación de citocinas. Se observó la disminución en expresión de TGF β , una superfamilia de proteínas que incluye al grupo de BMP's. TGF β y sus receptores se expresan en células endoteliales, células musculares lisas, macrófagos y células T en lesiones ateroscleróticas (Gordon *et al.*, 2008). Se ha informado un papel controversial del efecto de la familia TGF β en aterosclerosis, con algunos estudios que sugieren un papel proaterosclerótico (Bobik *et al.*, 1999; Cipollone *et al.*, 2004), mientras que la mayoría indican que intervienen

en la prevención de este desorden, aun cuando se trata de un factor proinflamatorio. Por otra parte, las enzimas ACE1 y 2 presentaron un comportamiento dicotómico puesto que la primera aumentó y la segunda disminuyó su expresión. Se ha sugerido que ACE2 es la que tiene mayor importancia biológica puesto que cataliza la conversión de angiotensina 1 a angiotensina 2, un potente vasoconstrictor asociado estrechamente a desórdenes como hipertensión arterial (NCBI, 2014). La disminución en la expresión de ACE2 es un indicio de un posible potencial antihipertensivo, hecho que se complementa con la disminución de VCAM1 y el aumento de IL11 sugiriendo un posible mecanismo a explorar como consecuencia del consumo de la barra. La mayor expresión de ésta última proteína, IL11, es de interés debido a que es un factor inhibitorio de adipogénesis (Ohsumi *et al.*, 1991). Se ha demostrado que la activación de la vía del receptor de proteínas gp130 (un miembro de los receptores de citocinas) por IL11 inhibe la diferenciación de preadipocitos mediada por protaglandina F2 α (Annamalai y Clipstone, 2014). En este sentido, DLK1 es otra proteína involucrada en la diferenciación de preadipocitos, considerada inhibidor de adipogénesis, evitando la proliferación de éstas células mediante arresto al ciclo celular, por tanto afectando la expansión del tejido adiposo (Mortensen *et al.*, 2012; Traustadottir *et al.*, 2013). Recientemente se ha propuesto que la manipulación de DLK1 podría ayudar a desarrollar estrategias terapéuticas para el tratamiento de la obesidad (Traustadottir *et al.*, 2013).

De la misma manera que en la vía de NF- κ B, se puede predecir el efecto que tendrá la regulación de las proteínas relacionadas con el sistema cardiovascular en la ruta metabólica (Figura 22).

De acuerdo a la predicción ciertos procesos ateroscleróticos se verían inhibidos, como la adhesión endotelial, migración y diferenciación de monocitos. Por ejemplo se predice la inhibición de la activación de CCR2, el receptor de la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) que participa en el reclutamiento y migración de monocitos a la íntima, por tanto disminuyendo la extravasación endotelial y paralelamente reduciendo la expresión de moléculas de adhesión (Giunti *et al.*, 2006). Además, el factor estimulante de colonias de macrófagos 1 (M-CSF1) es un factor de crecimiento producido por células endoteliales y células musculares lisas, que induce la diferenciación de monocitos a macrófagos y provoca la proliferación de los mismos (Ait-Oufella *et al.*, 2011). Se ha demostrado que la liberación de M-CSF

es regulada por proteína C-reactiva mediante la vía de NF- κ B, incrementando la expresión de VCAM1, IL 8 y MCP-1 río abajo (Devaraj *et al.*, 2009).

En el diagrama de la Figura 23 se puede apreciar nuevamente la inhibición del receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFRs14) en una célula espumosa, inhibiendo a su vez al grupo de metaloproteinasas (MMP1, MMP9, MMP13), proteínas implicadas en la ruptura de la placa aterogénica y en procesos de trombosis (Fadok *et al.*, 1998). Dicho efecto, también es promovido por la inhibición de la vía de NF- κ B como se describió anteriormente.

evitaría la degradación del colágeno que recubre a la capa aterosclerótica, atenuando el adelgazamiento y posterior ruptura del trombo. Las última ruta sí podría inducir este efecto de degradación del colágeno puesto que PDGF inducen la expresión de metaloproteinasas (Wågsäter *et al.*, 2009).

Finalmente, aunque fue una función biológica modestamente modificada, es de interés para este estudio la disminución observada en ciertos procesos del metabolismo de lípidos. En la Figura 24 se puede ver un mapa de calor del efecto sobre el metabolismo de lípidos.

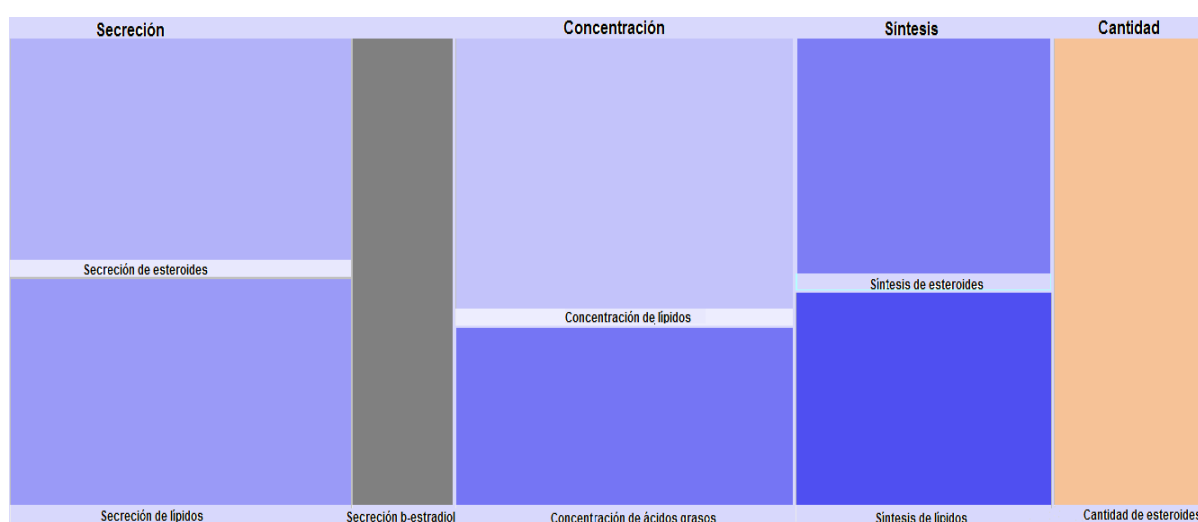


Figura 3. Mapa de calor de los procesos regulados relevantes en metabolismo de lípidos

El tamaño de los mosaicos incrementa de acuerdo al valor p, el color azul indica un valor z negativo y el rojo un valor z positivo. El color es más intenso de acuerdo a la magnitud del valor z.

En este mapa, el tamaño de los mosaicos incrementa con el valor p, es decir, las proteínas diferencialmente expresadas, tuvieron un efecto con mayor significancia estadística en las funciones biológicas que tienen mayor tamaño. En cuanto a valor z, es una medida de la probabilidad con que se predice la activación o inhibición de una vía. Mientras mayor sea la intensidad (valor del valor z) existe mayor concordancia de la predicción con lo que se reporta en la literatura, de manera que la probabilidad de que dicha predicción sea debido al azar se reduce. Por último, el color azul o rojo depende de la inhibición o activación predicha, respectivamente.

De manera importante se ve la disminución en la secreción, concentración y síntesis de lípidos. Haciendo un análisis más detallado, se pueden ver las proteínas relacionadas en cada una de estas funciones. Para este estudio, en donde se observó una disminución en la concentración de triglicéridos, es de interés particular la disminución en la concentración de ácidos grasos y en la síntesis de lípidos. En la Figura 25 se aprecia un diagrama que muestra aquellas proteínas que participaron en la inhibición de dichos procesos.

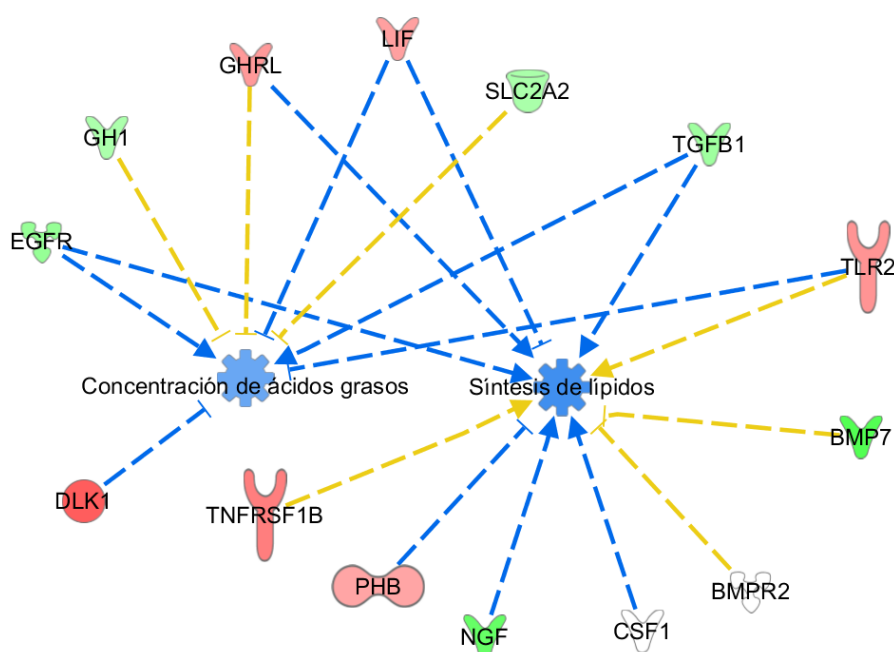


Figura 25. Proteínas involucradas en la inhibición de procesos relacionados con el metabolismo de lípidos

Se observa que dos proteínas que incluyen a los receptores TNFRSF1B y TLR2 activan la síntesis de lípidos aumentando la concentración de ácidos grasos, sin embargo predominan las interacciones de tipo inhibitorio. En este sentido se puede destacar la mayor expresión de la hormona ghrelina (involucrada en la activación del apetito), que conduce a una menor cantidad de ácidos grasos. Aunque podría pensarse que este aumento conduciría al aumento en apetito, se ha visto que esto sólo sucede en un estado de ayuno, además se ha demostrado que en una condición de obesidad, la ghrelina se encuentra disminuida dando lugar a una

ciertas alteración como deficiencia en la hormona del crecimiento que exacerba esta condición (Álvarez-Castro *et al.*, 2013). Existen reportes que relacionan a esta hormona, independientemente de su efecto orexigénico, con un efecto antiobesogénico, debido a que inhibe la síntesis de ácidos grasos mediante un mecanismo de inactivación de acetil-CoA carboxilasa y FAS (ambas enzimas lipogénicas) (Lage *et al.*, 2010).

En esta vía metabólica se encuentra un interés particular para poder explicar el mecanismo mediante el cual se dio la disminución en la concentración de triglicéridos séricos. Para profundizar en ésta ruta, se sugiere la validación de los microarreglos mediante la cuantificación plasmática de ciertos marcadores específicos, como VCAM1, GHRL, DLK1, ACE2, IL11 y TGF β que incluyen proteínas de interés para los procesos metabólicos estudiados y proteínas cuyo resultado de expresión no concuerda con lo esperado.

7.4.2 Análisis de enriquecimiento de ontología de genes

Con la finalidad de tener un análisis estadístico más robusto, en esta sección se tomaron en cuenta para el análisis bioinformático solamente aquellas proteínas que tuvieron un cambio en su radio de expresión mayor a 2 veces en comparación con el grupo control.

7.4.2.1 CYTOSCAPE - BINGO

CYTOSCAPE es una plataforma de uso libre que permite establecer redes de interacciones proteína-proteína, realizando búsquedas en diversas bibliotecas y bases de datos de proteínas y genes (Shannon *et al.*, 2003). Mediante esta herramienta, se obtienen redes complejas que deben “curarse” o depurarse hasta encontrar aquellas proteínas de interés que tengan 4 o más nodulos de interacción. Se utilizó el módulo “BINGO” que permite realizar la anotación funcional y el análisis de enriquecimiento de genes, para determinar aquellos procesos biológicos que son regulados de manera significativa (Maere, Heymans y Kuiper 2005).

En la Figura 26, se muestra un esquema de la red biológica obtenida para las 12 proteínas reguladas. Cada nodo en la red representa un proceso biológico diferente; en color amarillo se muestran los procesos que fueron modulados significativamente.

Mientras más oscuro es el color del nodo, se considera que tiene mayor significancia estadística. En el cuadro 22 se muestran los principales procesos biológicos regulados de acuerdo a lo obtenido mediante el uso de BINGO, estos datos se presentan ordenados de acuerdo al radio x/n y valor p , una medida de la proporción de proteínas involucradas y el número total de proteínas en el conjunto.

De los procesos encontrados, cinco se consideraron de interés para este proyecto, los cuales fueron seleccionados de acuerdo al radio x/n y al número de proteínas involucradas. Se tomaron en cuenta aquellos términos que tuvieran un radio x/n con la puntuación más alta y que tuvieran al menos 4 proteínas involucradas en el proceso biológico. Los procesos regulados fueron: respuesta al estímulo de estrógeno, respuesta al estímulo de la hormona esteroidea, regulación de la locomoción, regulación de la migración celular y regulación del desarrollo del sistema nervioso.

Cuadro 22. Principales procesos y proteínas reguladas obtenidas por el programa BINGO

Proceso regulado	GO-ID	Valor p	FDA	x	X	n	Radio (x/n)	Proteínas involucradas en el proceso biológico
Formación de la glándula mamaria	60592	6.44E-06	6.42E-03	2	5	12	0.400	BMP4 FGF10
Regulación de la formación embrionaria de la próstata	60685	9.66E-06	9.62E-03	2	6	12	0.333	BMP4 FGF10
Desarrollo de mesonefros	1823	1.80E-05	1.79E-02	2	8	12	0.250	BMP4 FGF10
Elongación ramificada del epitelio	60602	2.89E-05	2.88E-02	2	10	12	0.200	BMP4 FGF10
Elongación axial	3401	2.89E-05	2.88E-02	2	10	12	0.200	BMP4 FGF10
Desarrollo del epitelio pulmonar	60428	3.53E-05	3.52E-02	2	11	12	0.182	BMP4 FGF10
Regulación positiva del comportamiento	48520	7.16E-06	7.13E-03	3	47	12	0.064	GHRL F3 FGF10
Regulación de la proliferación de células endoteliales	1936	7.16E-06	7.13E-03	3	47	12	0.064	BMP4 GHRL F3
Respuesta a estímulo mecánico	9612	1.50E-05	1.50E-02	3	60	12	0.050	BMP4 NGF F3
Respuesta a estímulo de estradiol	32355	1.74E-05	1.73E-02	3	63	12	0.048	BMP4 F3 FGF10
Respuesta al estímulo de estrógeno	43627	2.23E-08	2.22E-05	5	114	12	0.044	BMP4 GHRL F3 TSHB FGF10
Regulación del comportamiento	50795	2.29E-05	2.28E-02	3	69	12	0.043	GHRL F3 FGF10
Regulación positiva de la repuesta a estímulos externos	32103	4.59E-05	4.58E-02	3	87	12	0.034	GHRL F3 FGF10
Respuesta al estímulo de hormona esteroidea	48545	1.21E-08	1.20E-05	6	225	12	0.027	BMP4 GHRL NGF F3 TSHB FGF10
Regulación de la locomoción	40012	9.36E-07	9.33E-04	5	241	12	0.021	BMP4 ACE GHRL F3 FGF10
Regulación de la migración celular	30334	2.28E-05	2.27E-02	4	216	12	0.019	BMP4 ACE F3 FGF10
Regulación del desarrollo del sistema nervioso	51960	2.77E-05	2.76E-02	4	227	12	0.018	BMP4 TIMP2 GHRL NGF
Regulación del movimiento de componentes celulares	51270	3.39E-05	3.37E-02	4	239	12	0.017	BMP4 ACE F3 FGF10
Regulación de la g de la estructura anatómica	22603	2.80E-06	2.79E-03	5	301	12	0.017	BMP4 GHRL NGF F3 FGF10
Desarrollo del sistema esquelético	1501	4.53E-06	4.51E-03	5	332	12	0.015	BMP4 SPARC BMP8B GHRL DLK1
Regulación positiva del proceso del desarrollo	51094	5.62E-06	5.60E-03	5	347	12	0.014	BMP4 GHRL NGF F3 FGF10
Respuesta a estímulo hormonal	9725	6.55E-07	6.52E-04	6	441	12	0.014	BMP4 GHRL NGF F3 TSHB FGF10
Respuesta a estímulos externos	9605	8.11E-08	8.08E-05	7	551	12	0.013	BMP4 CCL3 GHRL NGF F3 TSHB FGF10
Respuesta a estímulos endógenos	9719	1.26E-06	1.25E-03	6	493	12	0.012	BMP4 GHRL NGF F3 TSHB FGF10
Regulación de la proliferación celular	42127	1.53E-06	1.52E-03	7	848	12	0.008	BMP4 SPARC TIMP2 GHRL NGF F3 FGF10
Regulación de localización	32879	1.20E-05	1.19E-02	6	727	12	0.008	BMP4 ACE GHRL NGF F3 FGF10
Regulación del proceso del desarrollo	50793	1.94E-05	1.94E-02	6	791	12	0.008	BMP4 TIMP2 GHRL NGF F3 FGF10
Respuesta a sustratos orgánicos	10033	3.32E-05	3.31E-02	6	869	12	0.007	BMP4 GHRL NGF F3 TSHB FGF10
Regulación de los procesos de organismos multicelulares	51239	7.15E-06	7.12E-03	7	1067	12	0.007	BMP4 ACE TIMP2 GHRL NGF F3 FGF10
Vía de señalización ligada al receptor de superficie celular	7166	2.39E-05	2.38E-02	7	1280	12	0.005	BMP4 CCL3 GHRL NGF F3 TSHB FGF10
Respuesta a estímulo químico	42221	4.03E-06	4.01E-03	8	1465	12	0.005	BMP4 ACE CCL3 GHRL NGF F3 TSHB FGF10
Diferenciación celular	30154	1.08E-05	1.07E-02	8	1668	12	0.005	BMP4 ACE TIMP2 BMP8B GHRL NGF DLK1 FGF10
Proceso del desarrollo celular	48869	1.32E-05	1.32E-02	8	1714	12	0.005	BMP4 ACE TIMP2 BMP8B GHRL NGF DLK1 FGF10
Desarrollo de la estructura anatómica	48856	2.19E-06	2.18E-03	10	2656	12	0.004	BMP4 SPARC ACE TIMP2 BMP8B GHRL NGF TSHB DLK1 FGF10
Desarrollo del sistema	48731	1.52E-05	1.51E-02	9	2422	12	0.004	BMP4 SPARC ACE TIMP2 BMP8B GHRL NGF DLK1 FGF10
Proceso del desarrollo	32502	7.43E-07	7.40E-04	11	3235	12	0.003	BMP4 SPARC ACE TIMP2 BMP8B GHRL NGF F3 TSHB DLK1 FGF10

(x) - Número de proteínas involucradas del conjunto estudiado

(X) - Total de proteínas involucradas en el proceso biológico

(n) - Total de proteínas reguladas del conjunto estudiado

Las proteínas involucradas en cada proceso se sometieron a un análisis en la base de datos KEGG Mapper (http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html) para encontrar rutas metabólicas específicas reguladas por estas proteínas.

La respuesta al estímulo de estrógeno (GO:0043627) incluye cualquier proceso que resulte en un cambio de estado o actividad de una célula u organismo por efecto de estrógenos y hormonas esteroideas C18 que derivan en el desarrollo de características sexuales femeninas (The Gene Ontology Consortium, 2015). Aunque este proceso no es específico para las rutas metabólicas relacionadas con el metabolismo de lípidos (de interés para este proyecto), el análisis mediante KEGG Mapper, indica que de las cinco proteínas involucradas (BMP4, GHRL, F3, TSHB y FGF10) TSHB está involucrada en la regulación de lipólisis en adipocitos (Ruta metabólica con código KO04923), interacciones neuroactivas ligando-receptor (KO04080) y síntesis de la hormona tiroidea (KO04918). Se ha reportado que en mujeres postmenopáusicas el estrógeno reduce la adiposidad, promoviendo el catabolismo lipídico mediante la activación de β -oxidación, inhibición de lipogénesis y aumento de lipólisis (Dost et al., 2014).

Específicamente TSHB se ha correlacionado con una mayor concentración de triglicéridos y resistencia a insulina en humanos (Nader et al., 2010), así como una mayor expresión de leptina (una adipocina que regula la ingesta energética) en ratones obesos (Nillni et al. 2000; Perello et al., 2010). Se sabe que en un estado de obesidad la concentración de leptina plasmática se correlaciona directamente con la cantidad de tejido adiposo (Considine et al., 1996; Koudhi et al., 2010) y la concentración de triglicéridos en sangre (Herbst, 2006). En el presente estudio, la abundancia de TSHB en el plasma de las participantes disminuyó en un radio de expresión de -3.47 después de los dos meses de consumo del refrigerio, lo cual podría ser un indicio para explorar un mecanismo de acción por el cual el producto disminuyó los niveles de triglicéridos en el estudio clínico.

El siguiente proceso sobre-representado en el análisis mediante BINGO, fue la respuesta al estímulo de hormona esteroidea (GO:0048545), que incluye cualquier cambio en términos de movimiento, secreción, producción de enzimas o expresión de genes como consecuencia de esta estimulación (The Gene Ontology Consortium, 2015). Se encontraron seis proteínas reguladas pertenecientes a este proceso:

BMP4, GHRL, NGF, F3, TSHB y FGF10. Al realizar el análisis en KEGG Mapper, se obtuvieron prácticamente las mismas rutas metabólicas, en donde TSHB fue la proteína que apareció con mayor frecuencia. Se observó también la regulación de la cascada de señalización de AMP cíclico, en donde ghrelina fue la única proteína involucrada. La ghrelina es una hormona que ha sido considerada orexigénica, es decir, es capaz de promover el apetito, cuya función principal es la secreción de la hormona del crecimiento (GH por sus siglas en inglés). Se sabe que es la única hormona que puede ser modificada por ácidos grasos; la ingesta de triglicéridos puede modificar su concentración dependiendo del largo de la cadena (Delporte, 2013). A pesar de sus efectos orexigénicos, recientemente se realizó un metaanálisis de 21 estudios que incluyó a un total de 1187 participantes, en donde se vio que los niveles de ghrelina se encontraron más elevados en personas no obesas en comparación con aquellas el grupo obeso (Zhang et al., 2011). Lo anterior es consistente con los hallazgos del presente estudio, un aumento en el orden de 2.05 en la abundancia de ghrelina al finalizar el estudio clínico.

Para el proceso de regulación de la migración celular (GO:30334), la proteína más relevante de acuerdo al análisis por KEGG Mapper, fue ACE puesto que se encuentra involucrada en la cascada de señalización del sistema renina angiotensina (KO04614), cardiomiopatía hipertrófica (KO05410) y secreción de renina (K004924). Una vez concluidos los dos meses de consumo del refrigerio, el nivel de ACE plasmático se elevó en 2.53 veces respecto al grupo control, lo cual fue un hallazgo no esperado puesto que ACE ha sido correlacionado con mayor desarrollo de tejido adiposo en humanos (Kershaw y Flier, 2004).

Los otros dos procesos, regulación de la locomoción y desarrollo del sistema nervioso no condujeron a rutas metabólicas de interés para el estudio de la hipertrigliceridemia.

7.4.2.2 ONTOLOGIZER

Ontologizer es una herramienta estadística para el análisis de datos biológicos usando ontología de genes, lo que permite crear una lista de proteínas o genes regulados y agruparlos por función. Las 12 proteínas reguladas se sometieron a un análisis padre-hijo, el cual arroja una red que muestra los procesos biológicos o funciones reguladas en el contexto de procesos que están río arriba (padres) o río

abajo (hijos) (Bauer et al., 2008). Se utilizaron dos enfoques diferentes: la unión de padre-hijos y la intersección padre-hijo. El primero toma en cuenta genes/proteínas que estén relacionados con cualquiera de los padres, mientras que el enfoque de intersección toma en cuenta genes anotados para todos los padres por lo que da resultados más restringidos.

En la Figura 27 y 28 se muestran las redes biológicas correspondientes para el análisis de intersección padre-hijo y unión padre-hijo, respectivamente. En ambos casos el parámetro estadístico utilizado fue la prueba de Bonferroni ($p < 0.01$). El color indica las diferentes categorías del enriquecimiento de genes. El color morado hace referencia al tipo o localización del componente celular, el verde a los procesos biológicos y el amarillo a la función específica de la molécula. La intensidad del color indica la significancia del proceso o función.

De esta manera, en la Figura 27 se puede observar que los procesos biológicos sobre-representados fueron: procesos de desarrollo (GO:0032502), proliferación (GO:0008283), comportamiento (GO:0007610) y locomoción (GO:0040011), siendo el primero el que tuvo la mayor significancia estadística. De acuerdo al análisis de enriquecimiento por componente celular, la localización más significativa fue la región extracelular, sugiriendo que la mayoría de los procesos regulados se lleva a cabo en este espacio. En cuanto a las funciones moleculares, la que tuvo la mayor sobre-representación fue la actividad quimioatrayente (GO: 0042056) y unión a receptores (GO:0005102), lo cual era de esperarse puesto que una gran parte de las proteínas incluídas en el microarreglo fueron citocinas y quimiocinas.

Para el análisis unión padre-hijo, los principales procesos regulados coinciden con el primer enfoque, siendo los más significativos: procesos del desarrollo, regulación de la locomoción, proliferación celular, traducción de señales por fosforilación de proteínas, regulación positiva de procesos metabólicos de proteínas, quimiotaxis y comportamiento.

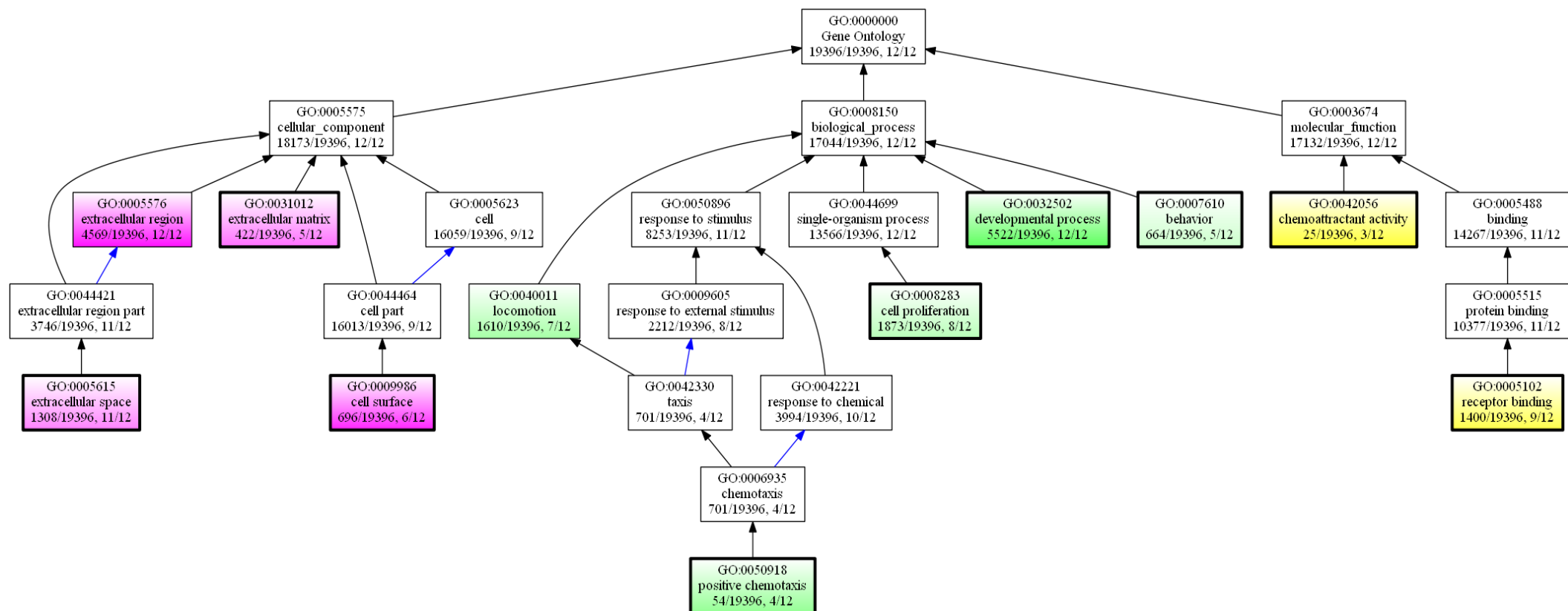


Figura 27. Red funcional de proteínas sobre-expresadas obtenido mediante el análisis intersección padre-hijo en el programa ONTOLOGIZER

El color morado hace referencia al tipo o localización del componente celular, el verde a los procesos biológicos y el amarillo a la función específica de la molécula. La intensidad del color indica la significancia del proceso o función.

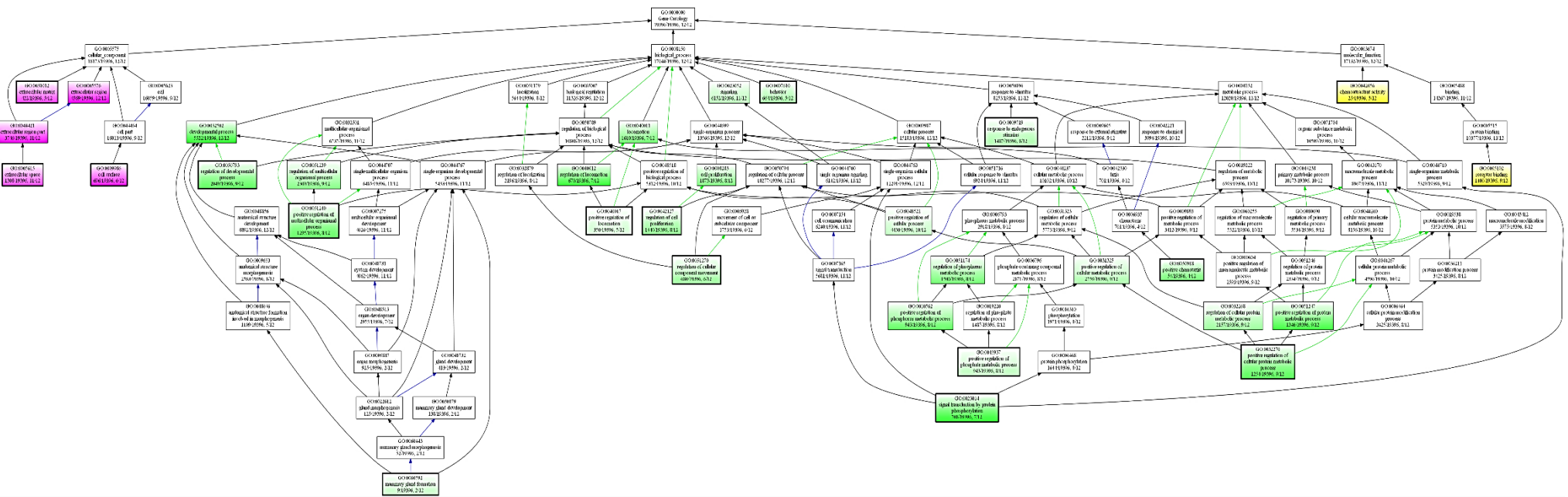


Figura 28. Red funcional de proteínas sobre-expresadas obtenido mediante el análisis unión padre-hijo en el programa ONTOLOGIZER

El color morado hace referencia al tipo o localización del componente celular, el verde a los procesos biológicos y el amarillo a la función específica de la molécula. La intensidad del color indica la significancia del proceso o función.

En el Cuadro 23 se muestran las categorías sobre-representadas por medio del enfoque unión padre-hijo. Se observan las diferentes proteínas que participan tanto en los procesos biológicos, como en las funciones y compartimentalización celular.

Cuadro 23. Principales categorías y proteínas sobre-representadas después del análisis de unión padre-hijo en el programa ONTOLOGIZER

Identificador	Categoría regulada	Proteínas involucradas	valor p	valor p ajustado *
GO:0032502	Procesos de desarrollo	ACE, BMP4, BMP8B, CCL3, DLK1, F3, FGF10, GHRL, NGF, SPARC, TIMP2, TSHB	1.33E-06	0.0023
GO:0050918	Quimiotaxis positiva	BMP4, CCL3, F3, FGF10	3.17E-05	0.0542
GO:0040011	Locomoción	ACE, BMP4, CCL3, F3, FGF10, GHRL, SPARC	3.42E-05	0.0586
GO:0008283	Proliferación celular	ACE, BMP4, F3, FGF10, GHRL, NGF, SPARC, TIMP2	3.83E-05	0.0656
GO:0007610	Comportamiento	CCL3, F3, FGF10, GHRL, NGF	5.57E-05	0.0954
GO:0042056	Actividad quimioatrayente	BMP4, CCL3, FGF10	5.99E-07	0.0010
GO:0005102	Unión a receptores	ACE, BMP4, BMP8B, CCL3, FGF10, GHRL, NGF, TIMP2, TSHB	6.16E-07	0.0011
GO:0005576	Región extracelular	ACE, DLK1, F3, FGF10, SPARC, TIMP2	6.31E-08	0.0001
GO:0009986	Superficie celular	ACE, DLK1, F3, FGF10, SPARC, TIMP2	4.96E-07	0.0008
GO:0031012	Matriz extracelular	BMP4, F3, FGF10, SPARC, TIMP2	4.57E-06	0.0078
GO:0005615	Espacio extracelular	ACE, BMP4, BMP8B, CCL3, DLK1, F3, FGF10, GHRL, NGF, SPARC, TIMP2	9.15E-06	0.0157

* ajustado de acuerdo al método de la razón de falsos descubrimientos mejor conocida como false discovery rate (FDR), que permite reducir el error tipo I en un análisis estadístico.

Se observa que los procesos obtenidos son muy generales, lo que nos impide establecer una respuesta clara del efecto del consumo del refrigerio sobre alguna ruta biológica, sugiriendo que para nuestro caso específico, el uso de programas como IPA y BINGO-CYTOSCAPE permite un análisis más adecuado para conjuntos de datos de menor tamaño.

7.5 integración de las vías reguladas

En la Figura 29 se muestra la integración metabólica de las rutas que pudieran ser moduladas por efecto del consumo de la barra, así como las proteínas involucradas en cada vía.

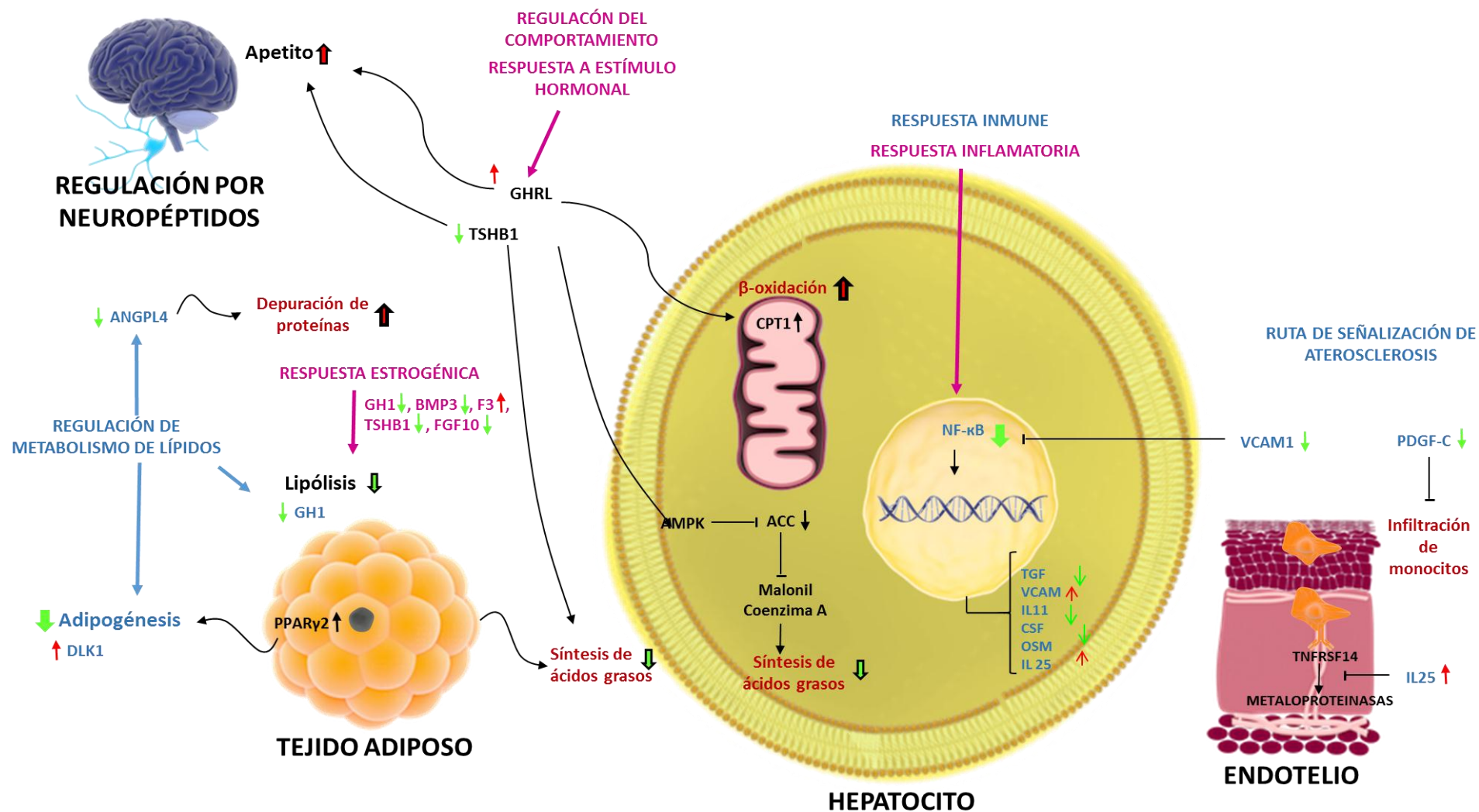


Figura 29. Integración metabólica de las posibles rutas reguladas por efecto del consumo del refrigerio

En color azul se muestra las rutas y proteínas moduladas de acuerdo a la predicción de IPA de QIAGEN, en morado se muestran los resultados obtenidos por el análisis en CYTOSCAPE-BINGO.

VIII. CONCLUSIÓN

Actualmente se reconoce el consumo de fitoquímicos como una alternativa para reducir el riesgo de desarrollar enfermedades no transmisibles, especialmente aquellas relacionadas con obesidad, como es el caso de la hipertrigliceridemia. Diversos alimentos que tradicionalmente se han consumido en México son una fuente importante de compuestos bioactivos en estado natural, desafortunadamente el procesamiento al que son sometidos para poder ser consumidos puede disminuir el valor funcional de dichos alimentos.

El refrigerio desarrollado en este proyecto de investigación aborda esta problemática al formular un producto que conserve sus propiedades nutraceuticas hasta el momento de consumo y que al mismo tiempo está diseñado como un alimento saludable y conveniente. En una porción de 50 g, la cantidad de proteína, fibra dietética y antioxidantes es similar a la composición encontrada en el frijol crudo, e incluso superior a un refrigerio de avena elaborado sin la adición de frijol y a una barra de avena comercial.

El estudio clínico realizado con la participación de mujeres que presentaron hipertrigliceridemia mostró que el consumo diario de una porción del refrigerio de frijol-avena disminuye los niveles de triglicéridos séricos en un 29% y de 3.5% de glucosa. Esta reducción es significativa sobre todo si se toma en cuenta el contexto de un estudio en donde no hubo cambio en los hábitos alimentarios, en el ingreso energético o en el patrón de actividad física.

Son limitadas las publicaciones encontradas respecto al efecto de frijol sobre triglicéridos séricos en estudios *in vivo*, por lo que este proyecto aporta información novedosa en este campo de investigación.

Se observó también el aumento de lipoproteínas de alta densidad en ambos grupos, un fenómeno que frecuentemente acompaña la reducción de triglicéridos, pero que no ha sido estudiado a profundidad. Aunque el estudio de los mecanismos de acción que conducen a esta respuesta fisiológica estuvo fuera de los objetivos planteados en este proyecto, se sienta un precedente para futuras investigaciones en ésta área.

Existen estudios que demuestran que el frijol común tiene efectos antiinflamatorios, antioxidantes e hipoinsulinémicos debido a que es una buena fuente de compuestos fenólicos antioxidantes y fibra dietética. En base a lo anterior, se esperaba la disminución de marcadores de inflamación, específicamente de proteína-C reactiva, así como del índice HOMA, un indicador de resistencia a insulina. No obstante, el consumo del refrigerio no moduló procesos de inflamación ni disminuyó de manera significativa el HOMA. Se sugiere que el tiempo de estudio pudo no haber sido suficiente para observar cambios en estos parámetros o que el tamaño de muestra no proporcionó el poder estadístico suficiente para detectar variación en los marcadores.

El estudio del perfil de proteínas plasmáticas permitió sugerir algunas vías metabólicas que podrían explicar la reducción de triglicéridos séricos. Los resultados obtenidos se analizaron desde tres enfoques bioinformáticos, uno predictivo mediante el programa IPA de Qiagen y los otros dos mediante el método de enriquecimiento de genes para encontrar los procesos biológicos y/o las funciones celulares reguladas. Los hallazgos más relevantes indican una regulación del metabolismo lipídico, específicamente la mejora en la depuración de lipoproteínas transportadoras de triglicéridos lo que permite disminuir los niveles que circulan en torrente sanguíneo. Se observó también el aumento de hormonas como DLK1 y ANGPTL4 que evitan el exceso de la síntesis de ácidos grasos.

En cuanto a los procesos biológicos regulados, los resultados obtenidos apuntan a una regulación hormonal, principalmente mediada por TSHB y ghrelina. Estas dos proteínas han emergido recientemente como blancos terapéuticos para combatir la obesidad.

Finalmente, el análisis de datos realizado con el programa ONTOLOGIZER no arrojó resultados contundentes, puesto que los procesos y funciones reguladas fueron muy generales y no se pudo establecer una conexión el metabolismo de lípidos o procesos inflamatorios.

Dentro de las perspectivas del estudio, se propone continuar sobre la línea de investigación de alimentos funcionales, para encontrar los compuestos

específicos que confieren la propiedad antilipidémica al frijol, en este sentido, existe un amplio rango de compuestos candidatos como saponinas, fitoesteroles y almidón resistente. En este sentido, aún falta realizar estudios a profundidad para elucidar los mecanismos de acción de estos compuestos aislados, utilizando técnicas *in vitro* de cultivo celular y así poder evaluar la inhibición de enzimas lipogénicas clave. De igual manera, estudios en modelos animales nos permitirían seguir la biotransformación de los compuestos bioactivos y su efecto sobre órganos o tejidos específicos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- A fifth amendment for the Declaration of Helsinki. *The Lancet* 2000; 356: 1123.
- AACC, American Association of Clinical Chemistry. (2001). The definition of dietary fiber (Report of the dietary fiber definition committee to the board of director of the AACC). *Cereal Foods World*, 46(3), 112-126.
- Abdel-Rahim, E. A., El-Beltagi, H. S., & Romela, R. M. (2013). White bean seeds and pomegranate peel and fruit seeds as hypercholesterolemic and hypolipidemic agents in albino rats. *Grasas y aceites*, 64 (1), 50-58.
- Aguilera, Y., Estrella, I., Benitez, V., Esteban, R. M., & Martín-Cabrejas, M. A. (2011). Bioactive phenolic compounds and functional properties of dehydrated bean flours. *Food Res Int*, 44, 774-780.
- Aguilera, Y., Estrella, I., Benitez, V., Esteban, R. M., & Martín-Cabrejas, M. A. (2011). Bioactive phenolic compounds and functional properties of dehydrated bean flours. *Food Res Int*, 44, 774-780.
- Aguayo-Rojas, J., Mora-Rochín, S., Cuevas-Rodríguez, E., Serna-Saldívar, S., Gutierrez-Urbe, J.A., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J. 2012. Phytochemicals and Antioxidant Capacity of Tortillas Obtained after Lime-Cooking Extrusion Process of Whole Pigmented Mexican Maize. *Plant Foods Hum Nutr*, 67:178–185
- Ait-Oufella, H., Taleb, S., Mallat, Z., Tedgui, A. 2011. Recent Advances on the Role of Cytokines in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31: 969-979.
- Ajuwon, K.M., Spurlock, M.E. 2005. Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288:R1220–5.
- Alminger, M., Eklund-Jonsson, C. (2008). Whole-grain cereal products based on a high-fibre barley or oat genotype lower post-prandial glucose and insulin responses in healthy humans. *Eur J Nutr*. 47: 294-300.
- Álvarez-Castro, P., Pena, L., Cordido, F. (2013). Ghrelin in obesity, physiological and pharmacological considerations. *Mini Rev Med Chem*, 13(4):541-52.
- Akillioglu, H.G., Karakaya, S. (2010). Changes in total phenols, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and Pinto beans after

- soaking, cooking, and in vitro digestion process. *Food Sci. Biotechnol.* 19(3): 633-639.
- Ambrosini, G., Nath, A.K., Sierra-Honigmann, M.R., Flores-Rivero, J. (2002). Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 277: 34601–34609.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., y otros. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev*, 67(4), 188-205.
- Anderson, R.A., Conway, H.F., Pfeifer, V.F., Griffin, E.L. Jr. (1969). Roll and extrusion-cooking of grain Sorghum grits. *Cereal Sci Today* 14: 372–375, 381
- Annamalai, D., Clipstone, N.A. (2014). Prostaglandin F2 α inhibits adipogenesis via an autocrine-mediated interleukin-11/glycoprotein 130/STAT1-dependent signaling cascade. *J. Cell Biochem*, 115 (7): 1308-21
- Anton, A., Fulcher, R.G., Arntfield, S.D. (2009). Physical and nutritional impact of fortification of corn starch-based extruded snacks with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour: Effects of bean addition and extrusion cooking. *Food Chem.*, 113: 989–996.
- AOAC: Association of Official Analytical Chemists. 2002. Official Methods of Analysis. 17th ed.; Arlington, VA; Métodos: 920.105, 920.39, 925.23, 945.46, 920.85, 991.43
- Aparicio-Fernández, X., Reynoso-Camacho, R., Castaño-Tostado, E., García-González, T., González de Mejía, E., Guzmán-Maldonado, H., y otros. (2008). Antiradical capacity and induction of apoptosis on HeLa cells by a *Phaseolus vulgaris* extract. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63, 35-40.
- Arija, I., Centeno, C., Viveros, A., Brenes, A., Marzo, F., Illera, J. C., y otros. (2006). Nutritional evaluation of raw and extruded kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. var Pinto) in chicken diets. *Poultry Science*, 85, 635-644.
- Association, A. H. (2014). Recuperado el 1 de July de 2014, de http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/Cholesterol/AboutCholesterol/Hyperlipidemia_UCM_434965_Article.jsp
- Baccini, M., Bachmaier, E.M., Biggeri, A. Boekschoten, M.V., Bouwman, F.G., Brennan, L., Caesar, R., Cinti, S., Coort, S.L., Crosley, K., Daniel, H., Crevon, C.A., Duthie, S., Eijssen, L., Elliott, R.M., van Erk, M., Evelo, C., Gibney, M., Heim, C., Horgan, G.W. Johnson, IT., Kelder, T., Kleemann, R., Kooistra, T., van Iersel, M.P., Mariman, E.C., Mayer, C., McLoughlin, G., Muller, M., Mulholland, F., van Ommen B., Polley, A.C., Pujos-Guillot, E., Rubio-Aliaga, I., Roche, H.M., de Rood, B., Sailer, M., Tonini, G., Williams, L.M. Wit, J. (2008). The NuGO proof of principle study package: a collaborative research effort of the European Nutrigenomics Organisation, *Genes Nutr*, 3: 147-151.
- Baintner, K., Kiss, P., Pfuller, U., Bardocz, S., & Pusztai, A. (2003). Effect of orally and intraperitoneally administered plant lectins on food consumption of rats. *Acta Physiol Hung*, 90, 97-107.
- Barrett, M. L., & Udani, J. K. (2011). A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): A review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutrition Journal*, 10, 24.

- Bauer, S. Grossmann, S., Vingron, M., Robinson, P. (2008). Ontologizer 2.0—a multifunctional tool for GO term enrichment analysis and data exploration. *Bioinformatics*, 24 (14):1650-1651.
- Behall, K., Scholfield, D., Hallfrisch, J. (2006). Barley [beta]-glucan reduces plasma glucose and insulin responses compared with resistant starch in men. *Nutr Res.* 26: 644-650.
- Beninger, C. W., Hosfield, G. L. (2003). Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *J Agric Food Chem.* 51:7879-7883.
- Bennink, M., & Rondini, E. (2008). *Dry beans and human health: An Overview of the status of the science on dry beans and human health*. Obtenido de *The Bean Institute*: <http://beaninstitute.com/wp-content/uploads/2010/01/Bennink-and-Rondini-article.pdf>
- Bertone, P. and Snyder, M. (2005), Advances in functional protein microarray technology. *FEBS Journal*, 272: 5400–5411.
- Beuchat, L. (1977). Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour proteins. *J Agric Food Chem*, 25: 258-263.
- Birari, R., & Bhutani, K. (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug discovery today*, 12, 879-889.
- Bloemen, J. G., Venema, K., van de Poll, M. C., Olde Damink, S. W., Buurman, W. A., & Dejong, C. H. (2009). Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. *Clin Nutr(Edinburgh, Scotland)*, 28, 657-661.
- Bloemen, J. G., Venema, K., van de Poll, M. C., Olde Damink, S. W., Buurman, W. A., & Dejong, C. H. (2009). Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. *Clin Nutr (Edinburgh, Scotland)*, 28, 657-261.
- Boateng, J., Verghese, M., Walker, L.T., Ogutu, S. (2008). Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus* spp. L.). *LWT-Food Science and Technology*, 41: 1541-1547.
- Bobik, A., Agrotis, A., Kanellakis, P., Dilley, R., Krushinsky, A., Smirnov, V., Tararak, E., Condrón, E., Kostolias, G. (1999). Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development. *Circulation*, 99: 2883–2891.
- Boniglia, C., Carratù, B., Di Stefano, S., Giammarioli, S., Mosca, M., & Sanzini, E. (2008). Lectins, trypsin and α -amylase inhibitors in dietary supplements containing *Phaseolus vulgaris*. *Eur food res technol*, 227, 689-693.
- Boullart, A., de Graaf, J., & Stalenhoef, A. F. (2012). Serum triglycerides and risk of cardiovascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821, 867-875.
- Bourdon, I., Olson, B., Backus, R., Richter, D. B., Davis, P. A., & Schneeman, B. O. (2001). Beans, as a source of dietary fiber, increase cholecystokinin and apolipoprotein B48 response to test meals in men. *J Nutr*, 131, 1485-1490.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25-30.

- Brito-Zurita, O.R., Verdín-García, P., Domínguez-Banda, A., Cortez-Valenzuela, A.E., Villanueva-Pérez, R.M., Torres-Tamayo, M. (2009). Grasa visceral y alteraciones metabólicas en hombres hipertensos. *Rev Med Inst Mex Seguro*, 47 (2): 135-140
- Brown, A. W., Hang, J., Dussault, P. H., & Carr, T. P. (2010). Phytosterol ester constituents affect micellar cholesterol solubility in model bile. *Lipids*, 45, 855-862.
- Brunzell, J. D., & Ayyobi, A. F. (2003). Dyslipidemia in the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *American Journal of Medicine*, 115, S24-28.
- Bullo M, Garcia-Lorda P, Megias I, Salas-Salvado J. (2003). Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes Res*, 11: 525–531.
- Calva-Mercado, J.J. (2000). Estudios clínicos experimentales. *Salud pública de México*, 42 (4): 349-358.
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J.A., Guzmán-Maldonado, S.H., Paredes-López, O., Oomah, B.D., Loarca-Piña, G. (2009). Chemical composition and in vitro polyssacharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Food Sci*, 74(7):59-65.
- Campos-Vega, R., Garcia-Gasca, T., Guevara-Gonzalez, R., Ramos-Gomez, M., Oomah, B. D., & Loarca-Pina, G. (2012). Human gut flora-fermented non digestible fraction from cooked bean (*Phaseolus vulgaris* L.) modifies protein expression associated with apoptoss, cell cycle arrest and proliferation in human adenocarcinoma colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(51), 12443-12450.
- Campos-Vega, R., Oomah, D., Loarca-Piña, G., & Vergara-Castañeda, H. A. (2013). Common beans and their non-digestible fraction: Cancer inhibitory activity-An overview. *Foods*, 2, 374-392.
- Cardador-Martinez, A., Loarca-Piña, G., & Oomah, B. D. (2002). Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem*, 50, 6975-6980.
- Carmona-García, R., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Tovar, J., Bello-Pérez, L.A. (2007). Composition and effect of soaking on starch digestibility of *Phaseolus vulgaris* (L.) cv. 'Mayacoba'. *Int. J. Food Sci. Tech.* 42:296–302.
- Celleno, L., Tolaini, M. V., D'Amore, A., Perricone, N. V., & Preuss, H. G. (2007). A dietary supplement containing standardized *Phaseolus vulgaris* extract influences body composition of overweight men and women. *Int J MedSci*, 4, 45-52.
- Chang, S.J., Huang, C.Y. (2010). Capítulo 13: Proteomics Analysis of the Functionality of Toona sinensis by 2D-Gel Electrophoresis. En: Bagchi, D., Bagchi, M., Lau, F. Genomics, Proteomics & Metabolomics in Nutraceutical and Functional Foods. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa. pp 201-223.
- Chávez-Santoscoy, R. A., Guitérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2013). Effect of flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats as cholesterol micelle disruptors. *Plant Foods Hum Nutr*, 68, 416-423.
- Chávez-Santoscoy, R. A., Tovar, A. R., Serna-Saldivar, S. O., Torres, N., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2014). Conjugated and free sterols from black

- bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats as cholesterol micelle disruptors and their effect on lipid metabolism and cholesterol transport in rat primary hepatocytes. *Genes Nutr*, 9(1), 367.
- Chávez-Santoscoy, R., Gutierrez-Urbe, J., Serna-Saldivar, S., Torres, N., & Tovar, A. (2014). Flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats modulate lipid metabolism and biliary cholesterol secretion in C57BL/6 mice. *The FASEB Journal*, 28 no. 1 Supplement 1045.1.
- Cifuentes-Goches, J. C., Gómez-López, J. d., Hernández-Ancheyta, L., Flores-Fuentes, S. E., Incháustegui-árias, J. L., & Cañas-Urbina, A. O. (2012). Hypertiglyceridemia and low HDL cholesterol as high impact factors for metabolic syndrome diagnosis in apparently healthy adults. *Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 50(3), 301-306.
- Cipollone, F., Fazio, M., Mincione, G., Lezzi, A., Pini, B., Cuccurullo, C., Uchino, S., Spigonardo, F., Di Nisio, M., Cuccurullo, F., Mezzetti, A., Porreca, E. (2004). Increased expression of transforming growth factor-beta1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques. *Stroke*, 35: 2253–2257.
- Clifton, P.M., Bastiaans, K., Keogh, J.B. (2009). High protein diets decrease total and abdominal fat and improve CVD risk profile in overweight and obese men and women with elevated triacylglycerol. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 19:548-554.
- Cohn, J. S., Kamili, A., Wat, E., Chung, R. W., & Tandy, S. (2010). Reduction in intestinal cholesterol absorption by various food components: Mechanisms and implications. *Atherosclerosis Supplements*, 11, 45-48.
- Cohn, J. S., Kamili, A., Wat, E., Chung, R. W., & Tandy, S. (2010). Reduction in intestinal cholesterol absorption by various food components: Mechanisms and implications. *Atheroscler suppl*, 11, 45-48.
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. ; 334:292–295
- Conterno, L., Fava, F., Viola, R., & Tuohy, K. M. (2011). Obesity and the gut microbiota: does up-regulating colonic fermentation protect against obesity and metabolic disease? *Genes Nutr*, 6, 241-260.
- Córdova-Villalobos, J. Á., Barriguete-Meléndez, J. A., Lara-Esqueda, A., Barquera, S., Rosas-Peralta, M., Hernández-Ávila, M., et al. (2008). Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Pública*, 50(5), 419-427.
- Couillard, C., Bergeron, N., Prud'homme, D., Bergeron, J., Tremblay, A., Bouchard, C., y otros. (1998). Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men. *Diabetes*, 47, 953-960.
- Crook, M. A. (2012). Chapter 13: Plasma lipids and lipoproteins. En M. A. Crook, *Clinical Biochemistry and Metabolic Medicine* (págs. 200-203). London: Hodder Education.
- Cruz-Bravo, R. K., Guevara-González, R., Ramos-Gómez, M., García-Gasca, T., Campos-Vega, R., Oomah, B. D., y otros. (2011). Fermented nondigestible fraction from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Negro 8025 modulates HT-29 cell behavior. *J. Food Sci.*, 76, T41-T47.

- Cummings, J. H. (2001). The effect of dietary fiber on fecal weight and composition. En G. Spiller, & G. Spiller (Ed.), *Dietary Fiber in Human Nutrition* (págs. 183-252). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Daniell, E. L., Ryan, E. P., Brick, M. A., & Thompson, H. J. (2012). Dietary dry bean effects on hepatic expression of stress and toxicity-related genes in rats. *British Journal of Nutrition*, 108, S66-S73.
- Darzi, J., Frost, G. S., & Robertson, M. D. (2011). Do SCFA have a role in appetite regulation? *Proc Nutr Soc*, 70, 119-128.
- Delparte, C. (2013). Structure and Physiological Actions of Ghrelin. *Scientifica*, doi:10.1155/2013/518909.
- De Mejía, E. G., Guzman-Maldonado, S. H., Acosta-Gallegos, J., Reynoso-Camacho, R. R., Pons Hernández, J., González-Chavira, M., Casellanos, J.Z, Casellanos, J.Z; Kelly, J.D. Kelly, J.D. (2003). Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, tannins, and lectins of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the semiarid highlands of México. *J. Agric.Food Chem.* 51: 5962-5966.
- de Roos, B. (2008). Proteomic analysis of human plasma and blood cells in nutritional studies: development of biomarkers to aid disease prevention. *Expert. Rev. Proteomics*. 5:819-826.
- de Roos, B., McArdle, H.J. (2008). Proteomics as a tool for the modelling of biological processes and biomarker development in nutrition research. *Br. J. Nutr.* 99: S66–S71.
- de Roos. (2010). Application of Proteomics in Nutrition Research. En: Debasis, B., Francis, C.L., Manashi, B. Genomics, Proteomics & Metabolomics. Wiley-Blackwell, pp: 213-223.
- Devaraj S, Singh U, and J Ishwarlal. (2009). The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. *Clinical Chem.* 55: 229-238.
- Devaraj, S., Yun, J.-M., Duncan-Staley, C., & Jialal, I. (2009). C-reactive protein induces M-CSF release and macrophage proliferation. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(2), 262–267.
- Díaz-Batalla, L., Widholm, J., Fahey, G., Castaño-Tostado, E., Paredes-López, O. (2006). Chemical components with health implications in wild and cultivated mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54: 2045-2052.
- Dinelli, G., Bonetti, A., Minelli, M., Marotti, I., Catizone, P., & Mazzanti, A. (2006). Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes. *Food Chemistry*, 99, 105-114.
- Domínguez-Reyes. (2007). Adiponectina: El tejido adiposo más allá de la reserva inerte de energía. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 15(3): 149-155.
- Dongowski, G., Drzikova, B., Senge, B., Blochwitz, R., Genbhardt, E., Habel, A. (2005). Rheological behaviour of β -glucan preparations from oat products. *Food Chem.* 93: 279-291.
- Dorantes-Mendoza, P. (2014). Tesis: Identificación de proteínas durante el procesamiento y digestión in vitro de una barra funcional elaborada con frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y avena (*Avena sativa*). Queretaro: Universidad Autónoma de Queretaro.
- Dornonville de la Cour, C., Lindstrom, E., Norlem, P., & Hakanson, R. (2004). Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regul Pept*, 120, 23-32.

- Dos Santos, (2008). En: S.Q. Ye (Ed.), *Bioinformatics. A Practical Approach*, Chapman y Hall, CRC, Boca Raton, FL, 2008, pp. 131–187.
- Dost T, Kafkas S, Gokalp F, Karul A, Birincioglu M. (2014). Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on adiponectin levels and lipid profile in the ovariectomized-aged rats. *J Pharmacol Pharmacother*;5:21-6
- Duenas, M., Fernandez, D., Hernandez, T., Estrella, I., Munoz, R. (2005). Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *J. Food Sci. Agr.* 85: 297-304
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Dietary fiber and fiber-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chem*, 124, 411-421.
- Epping-Jordan, J., Galea, G., Tukuitonga, C., & Beaglehole, R. (2005). Preventing chronic diseases: taking stepwise action. *Lancet*, 366, 1667-1671.
- Erner, S., & Meiss, D. (2003). *Thera-Slim for Weight Loss: A randomized double-blind placebo controlled study*. Obtenido de http://www.phase2info.com/pdf/Phase2_Study8.pdf
- Errico, T. L., Chen, X., Martin Campos, J. M., Julve, J., Escolà-Gil, J. C., & Blanco-Vaca, F. (2013). Basic mechanisms: structure, function and metabolism of plasma lipoproteins. *Clinica e Investigación en Arteriosclerosis*, 25 (2), 98-103.
- Eyaru, R., Shrestha, A. K., & Arcot, J. (2009). Effect of various processing techniques on digestibility of starch in Red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) and two varieties of peas (*Pisum sativum*). *Food Res Int*, 42, 956-962.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., Henson, PM. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *Journal of Clinical Investigation*, 101(4):890–898
- Fantini, N., Cabras, C., Lobina, C., Colombo, G., Gessa, G. L., Riva, A., y otros. (2009). Reducing effect of a *Phaseolus vulgaris* dry extract on food intake, body weight, and glycemia in rats. *J Agric Food Chem*, 57, 9316-9323.
- Favier, M. L., Moundras, C., Demigné, C., & Rémésy, C. (1995). Fermentable carbohydrates exert a more potent cholesterol-lowering effect than cholestyramine. *Biochim Biophys Acta*, 1258 (2), 115-121.
- FDA, Food and Drug Administration US Department of Health and Human Services. (1996). Regulation of medical foods. Advance notice of proposed rulemaking. *Fed Regist*, 61:60661–71.
- Feregino-Pérez, A. A., Berumen, L. C., Garcia-Alcocer, G., Guevara-Gonzalez, R. G., Ramos-Gomez, M., Reynoso-Camacho, R., et al. (2008). Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on Azoxymethane-induced colon cancer. *J Agric Food Chem*, 56, 8737-8744.
- Finley, J. W., Burrell, J. B., & Reeve, P. G. (2011). Pinto bean consumption changes SCFA profiles in fecal fermentations, bacterial population of the

- lower bowel, and lipid profiles in blood of humans. *Genes Nutr*, 6, 241-260.
- Finley, J. W., Burrell, J. B., & Reeves, P. G. (2007). Pinto bean consumption changes SCFA profiles in fecal fermentations, bacterial populations of the lower bowel, and lipid profiles in blood of humans. *J Nutr*, 137, 2391-2398.
- Flock, M. R., Green, M. H., & Kris-Etherton, P. M. (2011). Effects of adiposity on plasma lipid response to reductions in dietary saturated fatty acids and cholesterol. *Adv Nutr*, 2, 261-274.
- Food and Drug Administration (FDA), Human and Human Services: Food Labeling, Health Claims; Oats and Coronary Heart disease: Proposed rule. (1996). *Fed Regist*, 61: 296-313.
- Food and Drug Administration (FDA). 2011. <http://www.fda.gov/>
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P., & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr*, 88, 587-605.
- Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., y otros. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature Communications*, 5, 1-11.
- Fukumoto, L., Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolics compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3597-3604.
- Fukushima, M., Ohashi, T., Kojima, M., Ohba, K., Shimizu, H., Sonoyama, K., y otros. (2001). Low density lipoprotein receptor mRNA in rat liver is affected by resistant starch of beans. *Lipids*, 36, 129-134.
- Galván-Portillo, M., Torres-Sánchez, L., Hernández-Ramírez, R. U., & Anaya-Loyola, M. A. (2011). Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos para estimación de ingestión de folato en México. *Salud Pública México*, 53(3), 237-246.
- Gálvez-Ranilla, L., Genovese, M., Lajolo, F.M. (2007). Polyphenols and actioxidant capacity of seed coat and cotyledon from Brazilian and Peruvian Bean Cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 55: 90-98.
- García, O.P., Ronquillo Dolores, E.S., Rodríguez, M. Caamaño, M.C., Rosado, J.L. (2006). Prevalencia y asociación de obesidad, hipertrigliceridemia y osteopenia en mujeres de una zona rural en Querétaro. *Memorias y Mejores Trabajos; La Investigación*
- García-Cañas, V., Simó, León, C., Cifuentes, A. (2010). Advances in Nutrigenomics research: Novel and future analytical approaches to investigate the biological activity of natural compounds and food functions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51: 290–304.
- Gauthier, C., Legault, J., & Pichette, A. (2009). Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorg Med Chem*, 6, 2002-2008.
- Giunti, S., Pinach, S., Arnaldi, L., Viberti, G., Perin, P.C., Camussi, G., Gruden, G. 2006. The MCP-1/CCR2 system has direct proinflammatory effects in human mesangial cells. *Kidney Int*, 69(5):856-63
- Glore, S. R., Van Treeck, D., Knehans, A. W., & Guild, M. (1994). Soluble fiber and serum lipids: a literature review. *J Am Diet Assoc*, 94, 425-436.
- Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2009). The LDL receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29, 431-438.

- Gómez-Palomares, B.I. (2012). Gómez-Palomares (2012) Optimización de la formulación de una barra nutritiva mezcla de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y avena (*Avena sativa*)". Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Goodarzi, M. O., Guo, X., Taylor, K. D., Quñones, M. J., Saad, M. F., Yang, H., y otros. (2004). Lipoprotein Lipase Is a Gene for Insulin Resistance in Mexican Americans. *Diabetes*, 53, 214-220.
- González, L.I., Giraldo, N.A., Estrada, A., Muñoz, A.L., Mesa, E., Herrera, C.M. (2007). La adherencia al tratamiento nutricional y composición corporal: Un estudio transversal en pacientes con obesidad o sobrepeso. *Rev Chil Nutr* 34(1): 469-475
- Gordon, K.J, Blobel, G.C. (2008). Role of transforming growth factor- β superfamily signaling pathways in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1782(4):197–228
- Granito, M., Guerra, M., Torres, A., Guinand, J. (2004a). Efecto del procesamiento sobre las propiedades funcionales del VignaSinensis. *Interciencia*. 29(9): 521-526.
- Granito M, Trujillo L, Guerra M. (2004b). Uso de Phaseolusvulgaris y VignaSinensiscomo extensores de una bebidaaláctea fermentada. *Arch.Lat. Nutr*. 54: 99-104.
- Granito, M., Guinand, J., Pérez, D., Pérez, S. (2009). Valor nutricional y propiedades funcionales de *Phaseolus vulgaris* procesada: un ingrediente potencial para alimentos. *Interciencia*, 34 (1): s/p.
- Grant, G., Dorward, P. M., & Pusztai, A. (1993). Pancreatic enlargement is evident in rats fed diets containing raw soybeans (*Glycine max*) or cowpeas (*Vigna unguiculata*) for 800 days but not in those fed diets based on kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) or lupinseed (*Lupinus angustifolius*). *J Nutr*, 123, 2207-2215.
- Grant, G., Dorward, P. M., Buchan, W. C., Armour, J. C., & Pusztai, A. (1995). Consumption of diets containing raw soya beans (*Glycine max*), kidney beans (*Phaseolus vulgaris*), cowpeas (*Vigna unguiculata*) or lupin seeds (*Lupinus angustifolius*) by rats for up to 700 days: effects on body composition and organ weights. *Br J Nutr*, 73, 17-29.
- Grundy, S. M., Neeland, I. J., Turer, A. T., & Vega, G. L. (2013). Waist Circumference as Measure of Abdominal Fat Compartments. *Journal of Obesity*.
- Guajardo-Flores, D., García-Patiño, M., Serna-Guerrero, D., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2012). Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans. *Food Chemistry*, 134, 1312-1319.
- Guevara-Cruz, M., Tovar, A.R., Aguilar-Salinas, C., Medina-Vera, I., Gil-Zenteno, L., Hernández-Viveros, I., López-Romero, P., Ordaz-Nava, G., Canizales-Quinteros, S., Guillen-Pineda, L.E., Torres, N. 2012. A Dietary Pattern Including Nopal, Chia Seed, Soy Protein, and Oat Reduces Serum Triglycerides and Glucose Intolerance in Patients with Metabolic. *J. Nutr*. 142: 64–69
- Guderian, D. M., Rasmussen, H. E., Wray, C. A., Dussault, P. H., & Carr, T. P. (2007). Cholesterol-lowering properties of plant sterols esterified with beef tallow fatty acids in hamsters. *Nutr Res*, 27, 283-288.

- Gurfinkel, D. M., & Rao, A. V. (2002). Determination of saponins in legumes by direct densitometry. *J Agric Food Chem*, 50, 426-430.
- Guzmán-Maldonado, H., Castellanos, J., González de Mejía, E. (1996). Relationship between theoretical and experimentally detected tanning content of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem*. 55: 333-335.
- Hall, D. A., Ptacek, J., & Snyder, M. (2007). Protein Microarray Technology. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(1), 161–167.
- Hall, T.C., Chandrasekharan, M.B., Li, G. (1999). Phaseolin: its past, properties, regulation and future. En: Shewry, P.R., Casey, R. Seed Proteins, *Kluwer Academic*, pp. 209–240.
- Han, K., Fukushima, M., Shimizu, K., Kojima, M., Ohba, K., Tanaka, A., y otros. (2003). Resistant starches of beans reduce the serum cholesterol concentration in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, 49, 281-286.
- Han, K., Iijuka, M., Shimada, K.-i., Sekikawa, M., Kuramochi, K., Ohba, K., y otros. (2005). Adzuki resistant starch lowered serum cholesterol and hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA mRNA levels and increased hepatic LDL-receptor and cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA levels in rats fed a cholesterol diet. *British Journal of Nutrition*, 94, 902-908.
- Han, K., Sekikawa, M., Shimada, K.-i., Sasaki, K., Ohba, K., & Fukushima, M. (2004). Resistant starch fraction prepared from kintoki bean affects gene expression of genes associated with cholesterol metabolism in rats. *Exp Biol Med*, 229, 787-792.
- Harris, H.E., Andersson, U, Pisetsky, D.S. (2012). HMGB1: A multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nature Reviews Rheumatology*, 8: 195-202.
- Hee Yu, J., & Kim, M.-S. (2012). Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes Metab J*, 36, 391-398.
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M., Romani, A. (2005). Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. *J. Agric. Food Chem*. 53: 3053-3056.
- Herbst, S.K. (2006). The Association Between Triglyceride and Leptin Levels in Obese Subjects Following a Low-Carbohydrate or LowFat Diet. Honors Scholar Theses.
- Hernández-Salazar, M., Osorio-Díaz, P., Loarca-Piña, G., Reynoso-Camacho, R., Tovar, J., & Bello-Pérez, L. A. (2010). *In vitro* fermentability and antioxidant capacity of the indigestible fraction of cooked black beans (*Phaseolus vulgaris*), lentils (*Lens culinaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *J Sci Food Agric*, 90, 1417-1422.
- Herzig, K.-H., Bardocz, S., Grant, G., Nustede, R., Fölsch, U. R., & Pusztai, A. (1997). Red kidney bean lectin is a potent cholecystokinin releasing stimulus in the rat inducing pancreatic growth. *Gut*, 41, 333-338.
- Hotamisligil GS. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, 140: 900–917.
- Howarth, N. C., Saltzman, E., & Roberts, S. B. (2001). Dietary fiber and weight regulation. *Nutrition Reviews*, 59, 129-139.
- Hu, S., Xie, Z., Qian, J., Blackshaw, S., & Zhu, H. (2011). Functional Protein Microarray Technology. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, 3(3), 255–268.

- Hui, D. Y., & Howles, P. N. (2005). Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Semin Cell Dev Biol*, 16, 183-192.
- Hussain, M. M., Kancha, R. K., Luchoomun, J., Zu, H., & Bakillah, A. (1996). Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1300(3), 151-170.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2013). *Causas de defunción*. Recuperado el 24 de Junio de 2015, de <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>
- Insull Jr, W. (2006). Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: A scientific review. *South Med J*, 99, 257-273.
- Iqbal J, Hussain MM (2009) Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E1183–E119
- Iriti, M., Di Maro, A., Bernasconi, S., Burlini, N., Simoneti, P., Picchi, V., et al. (2009). Nutritional traits of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds from plants chronically exposed to ozone pollution. *J Agric Food Chem*, 57, 201-208.
- Jain, N. K., Boivin, M., Zinsmeister, A. R., & Di Magno, E. P. (1991). The ileum and carbohydrate-mediate feedback regulation of postprandial pancreatico-biliary secretion in normal humans. *Pancreas*, 6, 495-505.
- Jenkins, D.J., Kendall, C.W., McKeown-Eyssen, G., et al. (2008). Effect of a low-glycemic index or a high-cereal fiber diet on type 2 diabetes: a randomized trial. *JAMA*, 300(23):2742-53.
- Jo, Y., & Debose-Boyd, R. A. (2010). Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG CoA reductase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45 (3), 185-198.
- Kahlon, T. S., Smith, G. E., & Shao, Q. (2005). In vitro binding of bile acids by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*), black gram (*Vigna mungo*), bengal gram (*Cicer arietinum*) and moth bean (*Phaseolus aconitifolius*). *Food Chem*, 90, 241-246.
- Kakade, M. L., & Evans, R. J. (1966). Growth inhibition of rats fed raw navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *J Nutr*, 90, 191-198.
- Katan, M. B. (2006). The response of lipoproteins to dietary fat and cholesterol in lean and obese persons. *Curr Cardiol Rep*, 8, 446-451.
- Kershaw EE, Flier JS. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*;89:2548-56
- Kiran, M. (2010). Atherogenic dyslipidemia: Cardiovascular risk and dietary intervention. *Lipids*, 45(10), 907-914.
- Klop, B., Elte, J. W., & Castro Cabezas, M. (2013). Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients*, 5, 1218-1240.
- Koike, T., Koizumi, Y., Tang, L., Takahara, K., & Saitou, Y. (2005). The antiobesity effect and the safety of taking "Phaseolamin(TM) 1600 diet". *J New Rem & Clin (Japanese)*, 54, 1-16.
- Kosters, A., Frijters, R. J., Schaap, F. G., Vink, E., Plösch, T., Ottenhoff, R., y otros. (2003). Relation between hepatic expression of ATP-binding cassette transporters G5 and G8 and biliary cholesterol secretion in mice. *J Hepatol*, 38, 710-716.
- Kouidhi S, Jarbouï S, Clerget Froidevaux MS, Abid H, Demeneix B, Zaouche A, Benammar Elgaaied A, Guissouma H. (2010). Relationship between

- subcutaneous adipose tissue expression of leptin and obesity in Tunisian patients. *Tunis Med*; 88(8):569-72.
- Kozuharov, S., Oakenfull, D. G., & Sidhu, G. S. (1986). Navy beans and navy bean saponins lower plasma cholesterol concentrations in rats. *Proc. Nutr. Soc. Aust*, 11.
- Kusmann, M., Affolter, M. (2006). Proteomic methods in nutrition. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 9:575-583.
- Kutos, T., Golob, T., Kac, M., & Plestenjak, A. (2003). Dietary fibre content of dry and processed beans. *Food Chem*, 80, 231-235.
- Kwon, Y.-I., Apostolidis, E., Kim, Y.-C., & Shetty, K. (2007). Health benefits of traditional corn, beans and pumpkin: In vitro studies for hyperglycemia and hypertension management. *J Med Food*, 10 (2), 266-275.
- Lage, R., Vázquez, M.J., Varela, L., Saha, A.K., Vidal-Puig, A., Nogueiras, R., Diéguez, C., López, M. (2010). Ghrelin effects on neuropeptides in the rat hypothalamus depend on fatty acid metabolism actions on BSX but not on gender. *FASEB J*, 24(8):2670-9
- Layden, B., Angueira, A. R., Brodsky, M., Durai, V., & Lowe, W. L. (2013). Short chain fatty acids and their receptors: *Transl Res*, 161(3), 131-140.
- Lazou, A., Krokida, M., Tzia, C. (2010). Sensory properties and acceptability of corn and lentil extruded puffs. *Journal of sensory studies*, 25(6): 838-860.
- Le Berre-Anton, V., Bompard-Gilles, C., Payan, F., & Rouge, P. (1997). Characterization and functional properties of the α -amylase inhibitor (α -AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Biochim Biophys Acta*, 1343, 31-40.
- Le Berre-Anton, V., Nahoum, V., Payant, F., & Rouge, P. (2000). Molecular basis for the specific binding of different α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* seeds to the active site of α -amylase. *Plant Physiol Biochem*, 38, 657-665.
- Lee, M. R., Chen, C. M., Hwang, B. H., & Hsu, L. M. (1999). Analysis of saponins from black bean by electrospray ionization and fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 34(8), 804-812.
- Liener, I. E., Sharon, N., & Goldstein, I. J. (1986). *The Lectins – Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. London: Academic Press, Inc.
- Lin, Y., Vonk, R. J., Sloof, M. J., Kuipers, F., & Smit, M. J. (1995). Differences in propionate-induced inhibition of cholesterol and triacylglycerol synthesis between human and rat hepatocytes in primary culture. *Br J Nutr*, 74, 197-207.
- Lin, Y., Meijer, G. W., Vermeer, M. A., & Trautwen, E. A. (2004). Soy protein enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters. *J Nutr*, 134, 143-148.
- Loi, B., Fantini, N., Colombo, G., Gessa, G. L., Riva, A., Bombardelli, E., y otros. (2013). Reducing effect of an extract of *Phaseolus vulgaris* on food intake in mice — Focus on highly palatable foods. *Fitoterapia*, 85, 14-19.
- Lorent, J. H., Quetin-Leclercq, J., & Mingeot-Leclercq, M. P. (2014). The amphiphilic nature of saponins and their effects on artificial and biological membranes and potential consequences for red blood and cancer cells. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12(44), 8803-8822.

- Lu, K., Lee, M. H., & Patel, S. B. (2001). Dietary cholesterol absorption; more than just bile. *Trends Endocrinol Metab*, 12, 314-320.
- Luna Vital, D. A., González de Mejía, E., Dia, V. P., & Loarca-Piña, G. (2014). Peptides in common bean fractions inhibit human colorectal cancer cell. *Food Chem*, 157, 347-355.
- Luna Vital, D. A., Loarca-Piña, G., Dia, V. P., & González de Mejía, E. (2014). Peptides extracted from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) non-digestible fraction caused differential gene expression of HCT116 and RKO human colorectal cancer cells. *Food Research International*, 62, 193-204.
- Maccioni, P., Colombo, G., Riva, A., Morazzoni, P., Bombardelli, E., Gessa, G. L., y otros. (2011). Reducing effect of a *Phaseolus vulgaris* dry extract on operant self-administration of a chocolate-flavoured beverage in rats. *Br J Nutr*, 104, 624-628.
- MacDonald, L., Foster, B.C, Akhtar, H. (2009). Food and therapeutic product interactions- A therapeutic perspective. *J Pharm Pharmaceut Sci.*, 12(3): 367-377.
- Mackay, S., & Ball, M. J. (1992). Do beans and oat bran add to the effectiveness of a low-fat diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46 (9), 641-648.
- Maere, S., Heymans, K., & Kuiper, M. (2005). BINGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, 21, 3448-3449.
- Maranesi, M., Barzanti, V., Biagi, P. L., Carenini, G., & Gentili, P. (1984). Nutritional studies on anti alpha amylase: II) Lipid metabolism investigation: fatty acid composition of organs and tissues. *Acta Vitaminol Enzymol*, 6, 347-353.
- Martínez-Hernández, A.F., Chávez-Aguirre, R. (2007). Prevalencia y comorbilidad de dislipidemias en el primer nivel de atención. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*; 45 (5): 469-475
- Marzo, F., Alonso, R., Urdaneta, E., Arricibita, F. J., & Ibáñez, F. (2002). Nutritional quality of extruded kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Pinto) and its effects on growth and skeletal muscle nitrogen fractions in rats. *J Anim Sci*, 80, 875-879.
- Marzolo, M. P., Ludwing, A., & Nervi, F. (1993). Hepatic production of very low density lipoprotein, catabolism of low density lipoprotein, biliary lipid secretion, and bile salt synthesis in rats fed a bean (*Phaseolus vulgaris*) diet. *Journal of Lipid Research*, 34, 807-814.
- Micallef, M. A., & Garg, M. L. (2009). Beyond blood lipids: Phytosterols, statins and omega-3 polyunsaturated fatty acid therapy for hyperlipidemia. *J Nutr Biochem*, 20, 927-939.
- Milner, J.A. (2007). Nutrition in the 'omics' era. *Forum Nutr.* 60:1-24
- Montoya, C., Lallès, J. P., Beebe, S., Montagne, L., Souffrant, W.B., Leterme, P. (2006). Influence of the *Phaseolus vulgaris* phaseolin level of incorporation, type and thermal treatment on gut characteristics in rats. *British Journal of Nutrition*, 95, 116–123.
- Montoya, C., Leterme, P., Beebe, S., Souffrant, W.B., Mollé, D., Lallès, J.P. (2008). Phaseolin type and heat treatment influence the biochemistry of protein digestion in the rat intestine. *British Journal of Nutrition*, 99, 531–539

- Moreno, D.A., Ilic, N., Poulev, A., Brasaemle, D.L. Fried, S.K., Raskin, I. (2003). Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition*, 19: 876-879.
- Moreno, D.A., Ripoll, C., Ilic, N., Poulev, A., Aubin, C., Raskin, I. (2006). Inhibition of lipid metabolic enzymes using *Mangifera indica* extracts. *J. Food Agric. Environ.*, 4: 21–26.
- Moreno, M. C., & Bouchon, P. (2008). A different perspective to study the effect of freeze, air, and osmotic drying on oil absorption during potato frying. *J Food Sci.* 2008 Apr;73(3):E122-8.
- Moreno Altamirano, L., García García, J.J., Urbina Cedillo, C. García de la Torre, G. (2006). Detección de hiperglucemia y factores de riesgo en habitantes de una comunidad rural. *Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina*, 2° Congreso Nacional de Química Médica
- Morrissey, B. (2002). Foreword in: Functional Foods. Vol 2. Shi, J., Mazza, G., Le Maguer, M. USA: Eds. *CRC Press*.
- Mortensen, S.B., Jensen, C.H., Schneider, M., Thomassen, M., Kruse, T.A., Laborda, J., Sheikh, S.P., Andersen, D.C. (2012). Membrane-tethered delta-like 1 homolog (DLK1) restricts adipose tissue size by inhibiting preadipocyte proliferation. *Diabetes*, 61(11):2814-22.
- Moundras, C., Behr, S. R., Remesy, C., & Demigne, C. (1997). Fecal losses of sterols and bile acids induced by feeding rats guar gum are due to greater pool size and liver bile acid secretion. *J Nutr*, 127, 1068-1076.
- Mueller, C., Liotta, L.A., Espina, V. (2010). Reverse phase protein microarrays advance to use in clinical trials. *Molecular Oncology*, 4(6): 461 – 481.
- Munguía-Miranda, C., Sánchez-Barrera, R. G., Hernández-Saavedra, D., & Cruz-López, M. (2008). Prevalencia de dislipidemias en una población de sujetos en apariencia sanos y su relación con la resistencia a la insulina. *Salud Publica Mexico*, 50, 375-382.
- Murdolo, G., Lucidi, P., Di Loreto, C., Parlanti, N., De Cicco, A., Fatone, C., y otros. (2003). Insulin is required for prandial ghrelin suppression in humans. *Diabetes*, 52, 2923-2927.
- Muzquiz, M., Burbano, C., Pedrosa, M. M., Folkman, W. Y., Gulewicz, K. (1999). Lupin as a potential source of raffinose family oligosaccharides. Preparative method for their isolation and purification. *Industrial Crops and Products*, 9: 183–188.
- Nader, N.S., Bahn, R.S., Johnson, M.D. Weaver, A.L., Singh, R., Kumar, S. (2010). Relationships between thyroid function and lipid status or insulin resistance in a pediatric population. *Thyroid*; 20(12):1333-9.
- Naka, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda-Ono, Y., Iwashita, T., Shibata, H., Mitsunaga, T., Hashimoto, F., Kiso, Y. (2005). Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 4593–4598.
- Navarro-Hernández, R. E., Flores-Alvarado, L. J., Madrigal-Ruiz, P. M., Aguilar-Aldrete, M. E., Ruiz-Mejía, M. R., González-Romero, E., y otros. (2015). Estudio de asociación entre dislipidemia, obesidad central, grasa subcutánea y síndrome metabólico en población mestiza del occidente de México. *Revista Médica MD*, 6(3), 181-188.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. (2015). Recuperado el 2 de Julio de 2015, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=2194>

- NCEP, National Cholesterol Education Program. (2001). Expert panel on detection evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. *JAMA*, 285:2486-2497.
- Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., Zhang, H. Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4669–4674.
- Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A et al. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem*, 282: 35279–35292.
- Nicolosi, R., Hughes, D., & Bechtel, D. (2007). *Evaluation of the generally recognized as safe (GRAS) status of Phase 2® white bean (Phaseolus vulgaris) extract*. Obtenido de Health Sciences International: <http://www.phase2info.com/pdf/science-dossier/phase2-gras-expert-report.pdf>
- Nilsson, A., Johansson, E., Ekström, L., & Björck, I. (2013). Effects of a brown beans evening meal on metabolic risk markers and appetite regulating hormones at a subsequent standardized breakfast: A randomized cross-over study. *PLoS One*, 8(4), e59985.
- Nilni EA, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Björbak C, Flier JS. (2000). Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J Biol Chem.* 17; 275(46):36124-33.
- Nishina, P. M., & Freedland, R. A. (1990). Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *J Nutr*, 120, 668-673.
- NOM-037-SSA2-2012. (2012). NORMA Oficial Mexicana Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias. Recuperado el 24 de Junio de 2015, de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/037ssa202.html>
- NORMA Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2012, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación
- NORMA Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002, Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba
- NORMA Oficial Mexicana NOM-120-SSA1-1994. Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas
- Nyström, L., Schär, A., & Lampi, A. M. (2012). Steryl glycosides and acylated steryl glycosides in plant foods reflect unique sterol patterns. *Eur J Lipid Sci Technol*, 114, 656-669.
- alpha-amylase inhibitor. *Br J Nutr*, 100, 1-12.
- Oboh, H. A., & Omorfa, C. O. (2008). The effects of heat treated lima beans (*Phaseolus lunatus*) on plasma lipids in hypercholesterolemic rats. *J. Nutr.*, 7 (5), 636-639.
- Oh, R.C., Lanier, J.B. (2007). Management of hypertriglyceridemia. *Am Fam Physician*, 75(9): 1365-1371.
- Ohsumi, J., Miyadai, K., Kawashima, I., Ishikawa-Ohsumi, H., Sakakibara, S., Mita-Honjo, K., Takiguchi, Y. (1991). Adipogenesis inhibitory factor A novel inhibitory regulator of adipose conversion in bone marrow. *FEBS letters*, 288(1-2): 13-16

- Oomah, D., Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Sci. Food Agric.* 85: 935-942.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2012. Consultado en línea 30 Septiembre de 2012.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>
- Osorio-Díaz, P., Tovar, J., Parédes-López, O., Acosta-Gallegos, J. A., & Bello-Pérez, L. A. (2005). Chemical composition and in vitro starch bioavailability of *Phaseolus vulgaris* (L) cv Mayocoba. *J Sci Food Agric*, 85, 499-504.
- Ostlund. (2004). Phytosterols and cholesterol metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 15:37-41.
- Palacio, R., Granados, G., Roel-Garza, E. 2004. Glicemia alterada en ayunas y factores de riesgo para diabetes mellitus (Trabajo presentado en la VIII Reunión Delegacional de Investigación Médica). RESPYN: 4
- Paredes-López, O., Valverde, M. 2006. Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamerica le ha dado al mundo. *CINVESTAV*, 65-73
- Paredes-López, O., Guevara-Lara, F., & Bello-Pérez, L. A. (s.f.). Chapter 3. En *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas*. México: Fondo de Cultura Económica.
- Pereira, L. L., Pereira, C. A., de Sousa, R. V., Santos, C. D., Ferreira de Moraes, C., & Cabral Sátiro, L. (2012). White bean flour (*Phaseolus vulgaris*): Therapeutic and toxicological research in Wistar rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 02(03), 01-07.
- Perello M, Cakir I, Cyr NE, Romero A, Stuart RC, Chiappini F, Hollenberg AN, Nilni EA. (2010). Maintenance of the thyroid axis during diet-induced obesity in rodents is controlled at the central level. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*; 299(6):E976-89.
- Porth, C. M. (2011). *Essentials of pathophysiology: Concepts of altered health* (3ed ed ed.). Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Preuss, H. G. (2009). Bean amylase inhibitor and other carbohydrate absorption blockers: Effect on diabetes and general health. *Journal of the American College of Nutrition*, 3, 266-276.
- Prior, R., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290-4302.
- Pujolà, M., Farreras, A., & Casañas, F. (2007). Protein and starch content of raw, soaked and cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 102, 1034-1041.
- Pujolà, M., Farreras, A., & Casañas, F. (2007). Protein and starch content of raw, soaked and cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem*, 102, 1034-1041.
- Pusztai, A., Grant, G., Buchan, W. C., Bardocz, S., de Carvalho, A. F., & Ewen, S. W. (1998). Lipid accumulation in obese Zucker rats is reduced by inclusion of raw kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in the diet. *Br J Nutr*, 79, 213-221.

- Queiroz-Monici, K., Costa, G. D., da Silva, N., Reis, S. M., & Oliveira, A. C. (2005). Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starchh from leguminous on the intestinal microbiota of rats. *Nutrition*, 21 (5), 602-608.
- Ramírez-Jiménez, A. K., Reynoso-Camacho, R., Mendoza-Díaz, S., & Loarca-Piña, G. (2014). Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. *Food Chem*, 161, 254-260.
- Ramasamy, K., Agarwal, R. 2008. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Lett.*, 269(2): 352–362.
- Ramírez Jiménez, A. 2010. Elaboración y evaluación del valor nutrimental, nutracéutico y sensorial de una barra horneada de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y avena (*Avena sativa*). Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Ramírez, C.; Martínez, G.; Lozano Nuevo, J.; Olvera Medel, A.; Higuera, L.; García, E. 2007. Proteína C reactiva de alta afinidad como marcador inflamatorio. *Rev Alergia Mex*;1: 7-13.
- Rasmussen, H. E., Guderian, D. M., Wray, C. A., Dussault, P. H., Schlegel, V. L., & Carr, T. P. (2006). Reduction in cholesterol absorption is enhanced by stearate-enriched plant sterol esters in hamsters. *J Nutr*, 136, 2722-2727.
- Reyes-Moreno, C., Paredes-López, O. 1993. Hard-to-cook phenomenon in common beans. A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33: 227-286.
- Rigotti, A., Marzolo, M. P., Ulloa, N., Gonzalez, O., & Nervi, F. (1989). Effect of bean intake on biliary lipid secretion and on hepatic cholesterol metabolism in the rat. *J Lipid Res*, 30, 1041-1048.
- Rizkalla, S. W., Bellisle, F., & Slama, G. (2002). Health benefits of low glycaemic index foods, such as pulses, in diabetic patients and healthy individuals. *Brit J Nutr*, 88, 255-262.
- Rocha-Guzmán, N., Herzog, A., González-Laredo, R., Ibarra-Pérez, F., Zambrano-Galván, G., Gallegos-Infante, J. 2007. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chem*, 103: 521-527.
- Romani, A., Vignolini, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Benedeteelli, S., Heimler, D. (2004). Germplasm characterization of Zolfino Landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) by flavonoid content. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3838-3842.
- Rosado, J.L., García, O.P., Ronquillo, D. Hervert-Hernández, D., Caamaño, M.C., Martínez, M.G. Gutierrez, J., García, S. 2011. Intake of Milk with Added Micronutrients Increases the Effectiveness of an Energy-Restricted Diet to Reduce Body Weight: A Randomized Controlled Clinical Trial in Mexican Women. *J Am Diet Assoc.*, 111:1507-1516.
- Roginsky, V., Lissi, E.A. 2005. Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92 (2): 235-254
- Ros, E., & Laguna, J. C. (2006). Tratamiento de la hipertrigliceridemia: fibratos frente a ácidos grasos omega-3. *Revista Española de Cardiología* , 6, 52-61.
- Rosenquist, K., Pedley, A., Massaro, J.M., Therkelsen, K.E., Murabito, J.M., Hoffman, U., Fox, C.S. 2013. Visceral and Subcutaneous Fat Quality and Cardiometabolic Risk. *J Am Coll Cardiol Img*, 6(7):762-771.

- Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T. P., Maguire, A. R., & O'Brien, N. M. (2007). Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains and legumes. *Plant Foods Hum Nutr*, 62, 85-91.
- Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T. P., Maguire, A. R., & O'Brien, N. M. (2007). Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains and legumes. *Plant Foods Hum Nutr*, 62, 85-91.
- Sadiq Butt, M., Tahir-Nadeem, E., Khan, M., Shabir, R., Butt, M. (2008). Oat: unique among the cereals. A review. *Eur. J. Nutr.* 47: 68-79.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. 2006. Resistant starch - A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5: 1-17.
- Sánchez-Muniz, F. J. (2012). Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutr Hosp*, 27(1), 31-45.
- Santimone, M., Koukiekolo, R., Moreau, Y., Le Berre, V., Rougé, P., Marchis-Mouren, G., y otros. (2004). Porcine pancreatic α -amylase inhibition by the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor (α -AI1) and structural changes in the α -amylase inhibitor complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1696, 181-190.
- Saura-Calixto, F., García-Alonso, A., Goñi, I., & Bravo, L. (2000). In vitro determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fibre analysis. *J Agric Food Chem*, 48, 3342-3347.
- Saura-Calixto, F., Goñi, I., Bravo, L., Mañas, E. 1993. Resistant starch in foods: modified method for dietary fiber residues. *J. Food Sci.* 58 (3): 642–643.
- Schneeman, B. O. (1999). Fiber, inulin and oligofructose: similarities and differences. *J Nutr*, 129, 1424S-1427S.
- Schneeman, B. O. (2001). Dietary fiber and gastrointestinal function. En B. V. McCleary, & L. Prosky, *Advanced dietary fiber technology* (págs. 168-176). Oxford: Blackwell Science.
- Schroeder, N., Marquart, L. F., & Gallaher, D. D. (2013). The role of viscosity and fermentability of dietary fibers on satiety- and adiposity- related hormones in rats. *Nutrients*, 5, 2093-2113.
- Schulman, I. G., & Heyman, R. A. (2006). Chapter 9: LXR as therapeutic target for atherosclerosis. En C. J. Packard, & D. J. Rader, *Lipids and atherosclerosis* (págs. 94-95). Boca Raton, FL: Taylor & Francis.
- Schutz, Y. (2004). Dietary fat, lipogenesis and energy balance. *Physiology & Behavior*, 83(4), 557-564. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.09.015>
- Serrano, J., Goñi, I. (2004) Role of black bean (*Phaseolus vulgaris*) on the nutritional status of Guatemalan population. *Arch Latinoam Nutr.* 54(1):36–44.
- Sharma, A., Yadav, B.S., Ritika. 2008. Resistant starch: physiological roles and food applications. *Food Reviews International*, 24(2): 193-234.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., y otros. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498-2504.
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, 116: 3015–3025.

- Shi, J., Arunasalam, K., Yeung, D., Kakuda, Y., Mittal, G., & Jiang, Y. (2004). Saponins from edible legumes: chemistry, processing, and health benefits. *J Med Food*, 7, 67-78.
- Shi, J., Mazza, G., Le Maguer, M. (2002). Functional foods: Biochemical and processing aspects. Vol. 2. Boca Ratón, FL., CRC Press
- Shiga, M., Lajolo, M., Filisetti, M. 2003. Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cienc. Tenol. Aliment.* Campinas 23 (2) : 141-148.
- Shutler, S.M., Bircher, G.M., Tredger, J.A., Morgan, L.M., Walker, A.F., Low, A.G. (1989). The effect of daily baked bean (*Phaseolus vulgaris*) consumption on the plasma lipid levels of young, normo-cholesterolaemic men. *British Journal of Nutrition*, 61, pp 257–265
- Siddhuraju, P., Becker, K. 2001. Effect of Various Domestic Processing Methods on Antinutrients and in Vitro Protein and Starch Digestibility of Two Indigenous Varieties of Indian Tribal Pulse, *Mucuna pruriens* Var. *utilis* .J. *Agric. Food Chem.* 49: 3058-3067
- Siddhuraju, P. 2006. The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of phenolics of raw and dry heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) (Jacq.) Marechal seed extracts. *Food Chem.* 99 (1): 149-157.
- Sievenpiper, J.L., Kendall, C.W., Esfahani, A. et al. 2009. Effect of non-oil-seed pulses on glycaemic control: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled experimental trials in people with and without diabetes. *Diabetologia*, 52: 1479-1495
- Silva Pereira, L., Araujo Pereira, C., Vicente de Sousa, R., Donizete dos Santos, C., Ferreira de Moraes, C., & Cabral Sátiro, L. (2012). White bean flour (*Phaseolus vulgaris*): Therapeutic and toxicological research in Wistar rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 02(03), 01-07.
- Sitrin, M. D. (2014). Digestion and Absorption of Dietary Triglycerides. En P. S. Leung (Ed.), *The gastrointestinal system* (págs. 159-178). London: Springer.
- Slavin, J. 2004 Whole grains and human health. *Nutr. Res. Rev.*, 17: 99-110.
- Sloan, A. E. 2009. Consumer Trends: New ways to achieve weight loss. *Food Tech.*, 63 (11).
- Spadafranca, A., Rinelli, S., Riva, A., Morazzoni, P., Magni, P., Bertoli, S., y otros. (2013). *Phaseolus vulgaris* extract affects glycometabolic and appetite control. *British Journal of Nutrition*, 109, 1789-1795.
- Spadafranca, A., Rinelli, S., Riva, A., Morazzoni, P., Magni, P., Bertoli, S., y otros. (2013). *Phaseolus vulgaris* extract affects glycometabolic and appetite control in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*, 109, 1789-1795.
- Steffensen, K. R., & Gustafsson, J. A. (2004). Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes*, 53 (Suppl 1), S36-S42.
- Stoddart, L. A., Smith, N. J., & Milligan, G. (2008). International Union of Pharmacology LXXI. Free fatty acid receptors FFA-1, -1, and -3: pharmacology and pathophysiological functions. *Pharmacol Rev*, 60, 405-417.
- Stone, N. J., Robinson, J., Lichtenstein, A. H., Bairey Merz, C. N., Blum, C. B., Eckel, R. H., y otros. (2013). 2013 ACC/AHA Guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in

- adults: a report of the american college of cardiology/american heart association task force on practice guidelines. *Circulation*.
- Suchy, F. J. (2012). Chapter 46: Hepatobiliary function. En W. F. Boron, & E. L. Boulpaep, *Medical physiology: A cellular and molecular approach* (2nd ed., pág. 980). Philadelphia, PA: Elsevier.
- Tapsell, L. C. (2004). Diet and metabolic syndrome: where does resistant starch fit in? *J Assoc Off Anal Chem*, 87, 756-760.
- Tessari, P., Coracina, A., Cosma, A., & Tiengo, A. (2009). Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 19, 291-302.
- Tharanathan, R. N., & Mahadevamma, S. (2003). Grain legumes-a boon to human nutrition. *Trends Food Sci Technol*, 14, 507-518.
- The Gene Ontology Consortium. (2015). Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucl Acids Res* 43 Database issue D1049–D1056. Online at Nucleic Acids Research.
- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y. S., Parker, H. E., Habib, A. M., Diakogiannaki, E., y otros. (2012). Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein coupled receptor FFAR2. *Diabetes*, 61, 364-371.
- Tong, L. (2005). Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(16), 1784-1803.
- Topping, D. L., & Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81 (3), 1032-1054.
- Tormo, M. A., Gil-Exojo, I., Romero de Tejada, A., & Campillo, J. E. (2006). White bean amylase inhibitor administered orally reduces glycaemia in type 2 diabetic rats. *Br J Nutr*, 96, 539-544.
- Tosh, S., & Yada, S. (2010). Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. *Food Res Int*, 43, 450-460.
- Traustadottir, G. A., Kosmina, R., Sheikh, S. P., Jensen, C. H., & Andersen, D. C. 2013. Preadipocytes proliferate and differentiate under the guidance of Delta-like 1 homolog (DLK1). *Adipocyte*, 2(4), 272–275.
- Tungland, B., & Meyer, D. (2002). Non-digestible oligo-and polysaccharides (dietary fiber): Their physiology and role in human health and food. *Compr rev food sci f*, 1(3), 90-109.
- Udani, J., Hardy, M., & Madsen, D. C. (2004). Blocking carbohydrate absorption and weight loss: a clinical trial using Phase 2 brand proprietary fractionated white bean extract. *Altern Med Rev*, 9, 63-69.
- Urquiza-Hernandez , M. (2008). Recuperado el 15 de Julio de 2015, de <https://biochemistryquestions.wordpress.com/about/>
- Vahouny, G. V., Satchithanandam, S., Chen, I., Tepper, S. A., Kritchevsky, D., Lightfoot, F. G., y otros. (1988). Dietary fiber and intestinal adaptation: effects on lipid absorption and lymphatic transport in the rat. *Am J Clin Nutr*, 47, 201-206.
- Valdés Martínez y Ruíz Ortiz. (2009). Legislación y declaraciones nutrimentales en alimentos funcionales. *Revista Énfasis Alimentación*. <http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/12595-legislacion-y->

- declaraciones-nutrimientales-alimentos-funcionales. Consultado el 29 de septiembre de 2015.
- van de Woestijne, A. P., Monajemi, H., Kalkhoven, E. and Visseren, F. L. J. (2011), Adipose tissue dysfunction and hypertriglyceridemia: mechanisms and management. *Obesity Reviews*, 12: 829–840
- van der Berg Gomez, L. (2011). Ventajas y desventajas del uso de la técnica de impedancia bioeléctrica. Comunidad Salud. <https://comunidadsalud.wordpress.com/page/5/?app-download=blackberry>. Consultado en línea el 4 de Octubre de 2015.
- Vargas-Torres, A., Osorio-Díaz, P., Islas-Hernández, J. J., Tovar, J., Paredes-Lopez, O., & Bello-Perez, L. (2006). Starch digestibility of five cooked black bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Comp.*
- Vergara-Castañeda, H. A., Guevara-González, R. G., Guevara-Olvera, B. L., Oomah, B. D., & Loarca-Piña, G. F. (2012). Non-digestible fraction of beans (*Phaseolus vulgaris* L) modulates signaling pathway genes at an early stage of colon cancer in Sprague Dawley rats. *British Journal of Nutrition*, 108, S145-S154.
- Villalpando, S., Shamah-Levy, T., Rojas, R., Aguilar-Salinas, C. 2010. Tendencia en la prevalencia de diabetes tipo 2 y otros indicadores de riesgo cardiovascular en México entre 1993-2006. *Salud pública Méx*, 52(1): S72-S79
- Villanueva J, Philip J, Chaparro CA, Li Y, Toledo-Crow R, DeNoyer L, Fleisher M, Robbins RJ, Tempst P. (2005). Correcting common errors in identifying cancer-specific serum peptide signatures. *J Proteome Res*, 4:1060–1072
- Vinson, J. A., Al Kharrat, H., & Shuta, D. (2009). Investigation of an amylase inhibitor on human glucose absorption after starch consumption. *Open Nutraceutical Journal*, 2, 88-91.
- Wågsäter, D., Zhu, C., Björck, H.M., Eriksson, P. 2009. Effects of PDGF-C and PDGF-D on monocyte migration and MMP-2 and MMP-9 expression. *Atherosclerosis*, 202(2): 415 - 423
- Watts, G. F., Ooi, E. M., & Chan, D. C. (2013). Demystifying the management of hypertriglyceridaemia. *Nature Reviews Cardiology*, 10, 648-641.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112: 1796–1808.
- Wildman, R.E.C. (2001). Handbook of Nutraceutical and Functional Foods. Modern Nutrition. USA, pp 26-27.
- Winham, D. M., & Hutchins, A. M. (2007a). Baked bean consumption reduces serum cholesterol in hypercholesterolemic adults. *Nutrition Research*, 27 (7), 380-386.
- Winham, D. M., Hutchins, A. M., & Johnston, C. S. (2007b). Pinto bean consumption reduces biomarkers for heart disease risk. *Journal of the American College of Nutrition*, 26 (3), 243-249.
- Wolever, T. M., Brighenti, F., Royall, D., Jenkins, A. L., & Jenkins, D. J. (1989). Effect of rectal infusion of short chain fatty acids in human subjects. *Am J Gastroenterol*, 84, 1027-1033.
- Wolosiak, R., Worobiej, E., Piecyk, M., Druzynska, B., Nowak, D., Lewicki, P.P. (2010). Activities of amine and phenolic antioxidants and their changes in

- broad beans (*Vicia faba*) after freezing and steam cooking. *J. Food Sci. Tech.* 45: 29–37.
- Wong, J. M., & Jenkins, D. J. (2007). Carbohydrate digestibility and metabolic effects. *J Nutr*, 137, 2539S-2546S.
- Wu, X., Xu, X., Shen, J., Perricone, N., & Preuss, H. G. (2010). Enhanced weight loss from a dietary supplement containing standardized *Phaseolus vulgaris* extract in overweight men and women. *Journal of Applied Research*, 10, 73-79.
- Xu, B.J., Yuan, S.H., Chang, S.K.C. 2007. Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *J. Food Sci.* 72: S167–77.
- Xu, B. J., & Chang, S. C. (2008). Total phenolic content and antioxidant properties of Eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. *Journal of Food Science*, 73(2), 19-27.
- Xu, B. J., & Chang, S. C. (2009). Total phenolic, phenolic acid, antochyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4754-4764.
- Yap, F., Craddock, L., & Yang, J. (2011). Mechanism of AMPK suppression of LXR-dependent Srebp-1c transcription. *International Journal of Biological Sciences*, 7(5), 645-650.
- Yu, J. H., & Kim, M. S. (2012). Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes Metab J*, 36, 391-398.
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., y otros. (2004). INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with MI in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, 364, 937-952.
- Zhang, J., Shi, X., Shi, J., Ilic, S., Xue, S. J., & Kakuda, Y. (2009). Biological Properties and Characterization of Lectin from Red Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Food Review International*, 25(1), 12-27.
- Zhang, N., Yuan, C., Li, Z., Li, J., Li, X., Li, C., Li, R., Wang, S.R. (2011). Meta-analysis of the relationship between obestatin and ghrelin levels and the ghrelin/obestatin ratio with respect to obesity. *Am J Med Sci*; 341(1):48-55.
- Zhang, Y., Breevoort, S. R., Angdisen, J., Fu, M., Schmidt, D. R., Holmstrom, S. R., y otros. (2012). Liver LXRA expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 122 (5), 1688-1699.
- Zhu, Z., Jiang, W., & Thompson, H. J. (2012). Edible dry bean consumption (*Phaseolus vulgaris* L.) modulates cardiovascular risk factors and diet-induced obesity in rats and mice. *British Journal of Nutrition*, 108, S66-S73.

ANEXO I

Carta de consentimiento informado **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**



PROGRAMA DE POSGRADO DE ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO CLÍNICO QUE
EVALUARÁ LA EFICACIA DE UN REFRIGERIO A BASE DE FRIJOL-AVENA
SOBRE DISMINUCIÓN DE TRIGLICÉRIDOS SANGUÍNEOS**

DERECHOS DE LOS SUJETOS PARTICIPANTES EN ESTUDIOS DE NUTRICIÓN

Todos los participantes invitados a esta investigación gozarán de los siguientes derechos

1. Sabes qué área, tema o asunto se está estudiando
2. Saber qué le sucederá y cuáles son los procedimientos
3. Saber los riesgos potenciales o incomodidades del estudio, si las hay
4. Saber si se debe esperar algún beneficio al participar y si lo hay en qué consiste
5. Poder preguntar acerca del estudio antes de consentir y durante el estudio
6. Saber qué tratamiento está disponible si ocurre una complicación o lesión como resultado de la investigación
7. Poder negarse a participar en el estudio o dejar de participar una vez iniciado.
8. Recibir copias de los derechos de los sujetos participantes de experimentos y forma de consentimiento firmadas y fechadas
9. Estar libre de presiones para participar en el estudio

FIRMA DEL PARTICIPANTE

FECHA

FIRMA DEL INVESTIGADOR

FIRMA TESTIGO 2

No. de expediente _____

Información de contacto:

Para cualquier duda o aclaración podrá consultar con los responsables del programa Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña y M. C. Aurea Karina Ramírez Jiménez, Posgrado de Química, Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Universitario, Cerro de las Campanas s/n CP 76010, Santiago de Querétaro, Qro. Tel : 1921200 extensión 5585 correo electrónico aurea_ramirez@hotmail.com. Dra. Olga P. García, Facultad de Ciencias Naturales. Tel: 192-1200 ext 5323, correo electrónico: olga.garcia@uaq.mx.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO CLÍNICO QUE EVALUARÁ LA EFICACIA DE UN REFRIGERIO A BASE DE FRIJOL PARA DISMINUIR TRIGLICÉRIDOS SANGUÍNEOS

Usted ha sido invitado a participar en un estudio clínico en el cual se evaluará la eficacia de un refrigerio tipo barra de frijol y cereales en la disminución de triglicéridos (grasas) en sangre. Su participación es muy importante para nosotros, así como aclarar las dudas que tenga sobre el objetivo e implicaciones del programa.

RESPONSABLES DEL PROYECTO:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña y M. C. Aurea Karina Ramírez Jiménez, investigador en el Programa de Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad autónoma de la UAQ.

Nombre del proyecto: Elaboración y evaluación del valor nutrimental, nutracéutico, sensorial de refrigerios a base de leguminosas y cereales, y sus beneficios contra enfermedades crónico degenerativas.

Este proyecto fue financiado por Fondos Mixtos de Querétaro FOMIX-QRO-2011.

OBJETIVO DEL PROGRAMA:

Dado los beneficios observados de ciertas sustancias que contiene el frijol sobre la prevención y protección en ciertas enfermedades como obesidad, diabetes mellitus, disminución de colesterol y glucosa, así como en enfermedades del corazón, se quiere saber si el consumo de un refrigerio natural elaborado a base de frijol puede ayudar a disminuir triglicéridos (grasas) en sangre. Además también se verá si este refrigerio puede reducir los procesos de inflamación relacionados con el desarrollo de ciertas enfermedades.

DESCRIPCIÓN DEL PROGRAMA

Si usted acepta participar en este estudio, se le pedirá que asista a las instalaciones de la clínica de Nutrición en el Campus Juriquilla. Esta cita tendrá una duración aproximada de 1.5 hrs. Para esta ocasión se le pedirá que llene un cuestionario para tener información relacionada con su salud, dieta e historia médica. Además se le medirá el peso, altura, se medirá la circunferencia de cintura y cadera, también se le determinará el porcentaje de grasa y músculo corporal. Se le tomará una muestra de sangre del brazo. Este procedimiento se hará de acuerdo a los lineamientos de buenas prácticas de laboratorio de análisis clínicos, incluyendo uso de material nuevo y desecho adecuado de la sangre que no se utilice para análisis, acorde con los procedimientos correspondientes al manejo de muestras biológicas. Se le solicitará presentarse con un ayuno de 12 horas. Lo anterior significa que no podrá consumir alimentos sólidos por lo menos 12 horas de tomar la muestra, agua pura podrá tomar con moderación, sin embargo no podrá consumir café, té, refresco, jugos, leche agua de sabor, atoles y otras bebidas, puesto que podrían alterar los análisis que se le realizarán. La muestra de sangre será de 2 cucharaditas (11 ml) aproximadamente, a la cual se le determinarán, glucosa, colesterol total, colesterol malo y bueno, triglicéridos (grasas). Los resultados de estos análisis se le entregarán por escrito posteriormente, así como indicaciones en el caso necesario.

Si su nivel de grasas es normal, no podrá pasar a la siguiente etapa del estudio y agradeceremos su participación.

Si su nivel de grasas está dentro del rango elevado, se le invitará a continuar con el estudio. El procedimiento que seguiría sería el que se describe a continuación:

- a) Asistir nuevamente para ser asignado a uno de los grupos de estudio y se le pedirá que otra vez nos permita tomar una muestra de sangre (aproximadamente 8 ml) para determinar ciertos compuestos inflamatorios que están relacionados con el desarrollo de enfermedades crónicas, así como un estudio para determinar posibles proteínas asociadas al riesgo de padecer diabetes, enfermedades del corazón o cáncer. La asignación a los grupos será aleatoria en un grupo que consumirá el producto por tres meses además de orientación nutricional. El segundo grupo recibirá orientación nutricional sin el consumo del producto. El suministro del refrigerio de frijol será semanal, el cual no tendrá ningún costo. Un paquete que contiene 6 pequeñas barras (50 g) de este producto será consumido en forma diaria. Se le pedirá que registre puntualmente la

forma y frecuencia de consumo en los formatos: Registro de consumo y Aceptabilidad del tratamiento, que se le proporcionarán en la sesión de orientación nutrimental, de igual forma en esta sesión se le indicará cómo debe llenar estos formatos.

- b) A los tres meses de iniciado el tratamiento se le pedirá que asista nuevamente a las instalaciones de Ciencias Naturales en el campus Juriquilla. En esta cita se le volverán a hacer las mediciones presión sanguínea, peso, altura, se medirá la circunferencia de cintura y cadera, también se le determinará su porcentaje de grasa y músculo corporal. Nuevamente se le tomarán muestras de sangre del brazo, por lo tanto se le solicitará presentarse con un ayuno de 12 horas y seguir las indicaciones que se le dieron anteriormente.
- c) Al finalizar el estudio recibirá un informe de su estado de salud general y los resultados de los análisis clínicos por escrito.

RIESGOS

No existen riesgos mayores al participar en este estudio. Al realizar la toma de sangre, podría sentir alguna incomodidad o molestia pasajera y en ocasiones se puede formar un pequeño moretón.

BENEFICIOS

Se evaluará su estado de salud, realizando mediciones de porcentaje de grasa, músculo y análisis clínicos para conocer, todo lo anterior será informado por escrito. Además, se realizará un seguimiento hasta el final del estudio en cuanto a su estado nutricional.

CONFIDENCIALIDAD

Sus datos personales y la información proporcionada en cuestionarios o en los análisis clínicos serán vistos solamente por los investigadores. Los datos obtenidos serán publicados en revistas científicas, pero se presentarán por grupo e identificados por un código por lo que su nombre no será usado. Los datos se mantendrán en la mayor confidencialidad posible.

COSTOS/COMPENSACIONES

Las mediciones de grasa y músculo, los análisis clínicos y el refrigerio de frijol no tendrán costo alguno para los participantes. A usted no se le cobrará nada sino que recibirá una compensación económica equivalente a \$1000. Se pagará la mitad al iniciar el tratamiento y la mitad al finalizar. A aquellas personas que no puedan terminar el estudio no se les pedirá que devuelvan esta cantidad.

CONSENTIMIENTO

Su firma, indicará que usted ha decidido participar voluntariamente en nuestro estudio y que ha leído la información que se le ha mencionado arriba. Usted recibirá una copia de este consentimiento firmada para que la tenga consigo. También se le dará una copia de los derechos que tiene al participar en este estudio.

ANEXO II



Formato de historia clínica **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

PROGRAMA DE POSGRADO DE ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA

Nombre: _____

Expediente: _____

HISTORIA CLÍNICA

1. DATOS PERSONALES

Fecha de nacimiento (dd/mm/aaaa) _____ Edad _____ Sexo: _____
M ___ F ___

Domicilio: _____

_____ Calle _____ No. Exterior _____ No. interior _____
_____ Colonia _____ Ciudad _____ Estado _____
Telefono particular _____ Celular: _____

e-mail: _____

2. ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES. Marque con una "X" la patología que padezca o hayan padecido tus padres, abuelos o hermanos

Diabetes Mellitus	SI	NO	Tuberculosis	SI	NO	Convulsiones	SI	NO
Colitis	SI	NO	Cáncer	SI	NO	Enfermedades corazón	SI	NO
Presión alta	SI	NO	Enf. Hígado	SI	NO	Asma	SI	NO
Sobrepeso u Obesidad	SI	NO	Alzheimer	SI	NO	Colesterol elevado	SI	NO
Intestino irritable /Cronh	SI	NO	Artritis	SI	NO	Enfermedades mentales	SI	NO

3. ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLÓGICOS

	NO	SI	Edad de inicio	Veces por semana que consume	Cantidad por ocasión (cuantas copas, cigarros o dosis)
¿Toma bebidas alcohólicas?					
¿Fuma?					
¿Consume drogas?					

¿Practica ejercicio o haces actividad física? NO ___ SI ___ ¿Qué tipo de ejercicio? _____

¿Cuántas veces por semana lo practica? _____ ¿Cuántas horas por sesión? _____
 ¿Ha hecho alguna dieta o tomado suplementos para bajar de peso en los últimos tres meses? NO ___ SI ___
 ¿Has bajado de peso en los últimos tres meses? NO ___ SI ___ ¿Cuántos kilos? _____
 ¿Está actualmente tomando medicamentos o suplementos para controlar el peso? NO ___ SI ___
 ¿Cuáles? _____

4. ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS

¿Tiene algún padecimiento desde su nacimiento? NO ___ SI ___ ¿Qué enfermedad?

¿Tiene diabetes? NO ___ SI ___ ¿Con qué te controla su diabetes? Insulina: NO ___ SI ___
 Medicamento NO ___ SI ___

¿EN LOS ÚLTIMOS 12 MESES LE HAN DIAGNOSTICADO ALGUNA DE LAS SIGUIENTES ENFERMEDADES? Marque con una X

Problemas de peso: Bajo peso () Sobrepeso () Obesidad ()
 Ninguno ()

Enfermedad de la tiroides: Hipertiroidismo () Hipotiroidismo ()

Enfermedades cardiovasculares o cardíacas: Presión baja () Presión alta ()
 Enfermedad cardíaca ()

Especifique que enfermedad cardíaca

Enfermedades hepáticas: Hepatitis () que tipo: _____ Cirrosis ()
 Otra enfermedad: _____

Enfermedades gastrointestinales: Diarrea () Ardor/agruras o gastritis () Reflujo
 o hernia hiatal ()

Dolor, distensión abdominal o colitis () Úlcera gástrica y/o intestinal ()
 Hemorroides ()

Enfermedades hematológicas: Anemia () Leucemia () Hemofilia ()
 Problemas de coagulación ()

Alergias a: Medicamentos () ¿Cuál? _____ Alimentos ()
 ¿Cuál? _____

¿La han operado? NO___SI___ De que

¿Está actualmente tomando medicamentos antiinflamatorios (Paracetamol, ibuprofeno, naproxeno, aspirina, celecoxib) ?NO___SI___
¿Qué otro tipo de medicamentos toma actualmente?

EVALUACIÓN NUTRICIA

Tipo de sangre_____¿Ayunó? SI___NO___ Hora del último alimento_____

¿Toma algún medicamento? SI___NO___

¿Cuál?:_____ ¿Por cuánto tiempo?_____

¿Se encuentra desvelado? SI___NO___ Horas de sueño_____

ANTROPOMETRÍA

	1	2	3	Promedio
ESTATURA				
PESO				

Actividad física: Ligera – caminata 2 h/ día (trabajo de oficina)

Normal – caminata 4 h/día (producción, obreros, etc)

Elevada – caminata más de 4 h/día (granjero, trabajos de construcción, etc)

Severa – atletas de alto rendimiento, herreros, mineros, etc

	1	2	3	Promedio
CINTURA				
CADERA				

CUESTIONARIO DE HÁBITOS

No. de comidas al día_____

¿Desayuna? SI___NO___ Horario_____ Casa_____ Fuera de casa_____

¿Realiza comida? SI___NO___ Horario_____ Casa_____ Fuera de casa_____

¿Cena? SI___NO___ Horario_____ Casa_____ Fuera de casa_____

¿Come entre comidas? SI___NO___

En general

¿Qué

come? _____

En promedio ¿cuántas hrs pasas frente a la computadora, video juegos,

TV? _____

¿Cuántas hrs realizas de ejercicio o algún tipo de actividad

física? _____

¿Has estado en un régimen alimenticio para bajar de peso? SI___NO___¿De qué

tipo? _____

FRECUENCIA DE CONSUMO DE LEGUMINOSAS

Escriba el número de veces que consume el alimento

	Número de veces al				
	Día	Semana	Mes	Año	
Frijoles					
Habas					
Lentejas					
Soya texturizada					
Garbanzo					

ANEXO III

Formato de Orientación Nutricional

Recomendaciones para controlar nivel de triglicéridos

<i>Grupo de alimento (frescos o congelados)</i>	<i>Permitido (todos los días)</i>	<i>Limitado (2 por semana)</i>	<i>Desaconsejado (sólo excepcionalmente)</i>
Cereales	Harinas, pan, cereales, arroz de preferencia integral, maíz, pastas italianas, galletas integrales.	Cereales con azúcar, pastas de huevo.	Pastelería, Croasants, madalenas, galletas.
Frutas, Verduras, Legumbres	Todas (en especial legumbres).	Aceitunas, Aguacates (*).	Patatas xips
Frutos secos	Nueces, ciruelas, pasas, albaricoques, dátiles.	Almendras, castañas, avellanas, cacahuetes (*).	Coco
Huevos, Leche y derivados	Leche, yogurt descremado, clara de huevo, flan sin huevo.	Huevo entero, quesos frescos y cuajada.	Leche entera, nata, crema, flan de huevo, quesos duros y cremosos.
Pescado y marisco	Pescado azul y blanco, atún en lata, salmón ahumado.	Marisco, sardinas lata, bacalao salado.	Huevos pescado, Caviar, Mojama.
Carnes Rojas		Ternera, buey, cerdo, caballo, cordero (sólo magra).	Hamburguesas, frankfurts, butifarras, salchichas.
Volatería y Caza		Pollo, pavo (sin piel), conejo, ciervo, casza menor.	Oca, pato.
Grasas	Aceites de oliva y girasol, maíz o pepita de uva.	Margarinas vegetales, jamón.	Manteca cerdo, mantequilla, vísceras, despojos, embutidos.
Postres	Mermeladas, repostería casera (helados, sorbetes, pasteles) preparada con leche descremada o margarina.	Miel, caramelos, frutas en almíbar.	Chocolates, pastelería.
Bebidas	Agua mineral, zumos naturales, vinos, alcohol (2 tomas al día), café y té (3 x día).	Bebidas ligeras azucaradas.	Sopas de sobre o lata.

Salsas: evitar las hechas con manteca, leche entera, huevo o grasa de cerdo.

Cocción: con poco aceite (oliva, girasol o maíz). Evitar fritos y guisados. Retirar la grasa visible de la carne antes de cocerla.

Frecuencia aconsejada de ingesta de grasas y volatería: carnes rojas, 2 días por semana; pollo, pavo sin piel o conejo 2-3 días por semana. Ingesta de sólo una vez al día y sólo 200 grs.

Condimentos: utilizar todo tipo de condimento, sal con moderación.

La dieta debe modificarse en caso de diabetes, hiperuricemia o hipertensión.

(*) Si no hay sobrepeso no hace falta limitarlo.

Porciones equivalentes por grupo de alimento

CEREALES Y FECULAS

Por cada equivalente de este grupo puede consumir:

ALIMENTO	RACION
Amaranto tostado	1/3 taza
Arroz cocido	1/2 taza
Arroz Inflado	1/2 taza
Avena Cocida	1/2 taza
Avena en hojuelas	1/4 taza ó 3 cdas.
Bolillo sin miga	1/2 pieza
Camote cocido	1/3 taza
Elote cocido	1/2 taza
Fécula de Maíz	2 cucharadas
Galletas de animalitos	6 piezas
Galletas Marías	5 piezas
Galletas habaneras	3 piezas
Harina de arroz	2 cucharadas
Hojuelas de Maíz	1/2 taza
Palomitas sin grasa	3 tazas
Pan de caja	1 rebanada
Papa	1 pieza mediana
Pasta cocida	1/2 taza
Salvado de trigo	6 cucharadas
Tortilla de maíz	1 pieza

LECHE Y SUSTITUTOS

Por cada equivalente de este grupo puede consumir:

ALIMENTO	RACION
Leche Descremada líquida	1 taza ó 240 ml.
Leche descremada en polvo	3 cdas. soperas
Yogurt Natural	1 taza ó 240ml
Jocoque	¾ taza ó 200 g.

CARNE Y SUSTITUTOS

Por cada equivalente de este grupo puede consumir:

ALIMENTO	RACION
Huevo Entero	1 pieza ó 50 gr.
Clara de Huevo	2 piezas ó 60 gr.
Pollo sin piel	40 gr.
Res	30 gr.
Pescado fresco	40 gr.
Queso fresco, panela	30 gr.
Queso cottage	45 gr. ó 3 cucharadas
Requesón	3 cucharadas soperas

VERDURAS A (LIBRES)

Este grupo se **puede consumir sin restricción**

ALIMENTO		
Espinacas	Perejil	Jitomate
champiñones	Pepinos	Jícama
Verdolagas	Berros	Alcachofa
Nopales	Col	Lechuga
Acelgas	Cilantro	Coliflor
Flor de Calabaza	Tomate	Rábanos
Ejote	Apio	Papaloquelite

VERDURAS B (LIMITADAS)

Por cada equivalente **puede consumir ½ taza**

ALIMENTO		
Brócoli cocido	Espárragos	Haba verde
Zanahoria	Jitomate	Chayote
Romeritos	bola	Betabel
Chile poblano	Huitlacoche	Huauzontle
Cebolla	Jugo de	Chicharo
Col de Bruselas	Verduras	Pimiento morrón
Germinado de	Poro	
Soya		

ANEXO IV

Aceptabilidad del tratamiento

1 ¿Cómo considera la porción de barras de la semana?

☐ Muy bien ☐ Bien ☐ Regular ☐ Mal ☐ Muy mal

2 ¿Seguirá consumiendo las barras en la misma porción?

☐ Definitivamente si ☐ Probablemente si ☐ Indecisa ☐ Probablemente no ☐ Definitivamente no

¿Por qué? _____

3 ¿Considera que la barra le ayudó a controlar su peso?

☐ Definitivamente si ☐ Probablemente si ☐ Indecisa ☐ Probablemente no ☐ Definitivamente no

4 ¿Cómo se siente después de haber consumido la barra por 1 semana?

☐ Muy bien ☐ Bien ☐ Regular ☐ Mal ☐ Muy mal

5 ¿Cómo han cambiado sus hábitos de alimentación?

☐ Mejorado mucho ☐ Mejorado algo ☐ Iguales ☐ Empeorado algo ☐ Empeorado mucho

6 ¿Seguirá consumiendo la misma cantidad de alimentos al terminar el estudio?

☐ Definitivamente si ☐ Probablemente si ☐ Indecisa ☐ Probablemente no ☐ Definitivamente no

7 ¿Qué cree que le ayudo más a controlar su peso?

☐ Plan de alimentación ☐ Barras ☐ Ambas ☐ Ninguna ☐ Indecisa

8 ¿La barra redujo o aumento su apetito?

OBSERVACIONES

TRATAMIENTO ASIGNADO

¿Cuántas porciones debió tomarse? Unidades

¿Cuántas porciones se tomó? Unidades

Porcentaje de apego al tratamiento . %

¿La adherencia resultante se encuentra dentro de un rango $\geq 90\%$? No ☐ ☐

¿Se entregaron los empaques vacíos? No ☐ Si ☐

¿Cuántos empaques vacíos fueron entregados? Unidades

¿Se entregó tratamiento para la siguiente semana? Si ☐ ☐

¿Cuántas unidades de tratamiento se le entregaron?

CONTINÚA PERIODO DE INTERVENCIÓN

Finalización de la participación ☐

Causas

Presenta un criterio de eliminación ☐

Retiro voluntario de sujeto ☐

Otros ☐

Ó prosigue en el estudio

☐

OBSERVACIONES

ANEXO V

Registro de consumo de tratamiento

INSTRUCCIONES: Anotar el consumo diario de alimentos en cada recuadro.

DIA	FECHA	Desayuno	Refrigerio 1	Comida	Refrigerio 2	Cena	Observaciones*
Lunes							
Martes							
Miércoles							
Jueves							
Viernes							
Sábado							
Domingo							

ANEXO VI

Carta aprobación Comité de Bioética



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales



Querétaro, Qro, 4 de octubre de 2013

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Investigador
Facultad de Ciencias Naturales

Estimada Dra. Loarca Piña:

Nos permitimos hacer de su conocimiento que el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales dio la siguiente resolución del proyecto de Investigación del cual usted es responsable:

Titulo	Resolución
EFECTO DEL CONSUMO DE UNA BARRA DE FRIJOL (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Y AVENA (<i>Avena sativa</i>) SOBRE EL PERFIL PROTEÓMICO DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS	APROBADO

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.

Atentamente,

Dra. Olga P. García O.
Comité de Bioética
Facultad de Ciencias Naturales

ANEXO VII

Curvas de calibración para la cuantificación de oligosacáridos

Para la cuantificación de oligosacáridos de frijol común, se utilizaron como estándares rafinosa (10 mg/ml), estaquiosa (10 mg/ml) y verbascosa (1 mg/ml). Las curvas de calibración para cada estándar se muestran en la Figura 14.

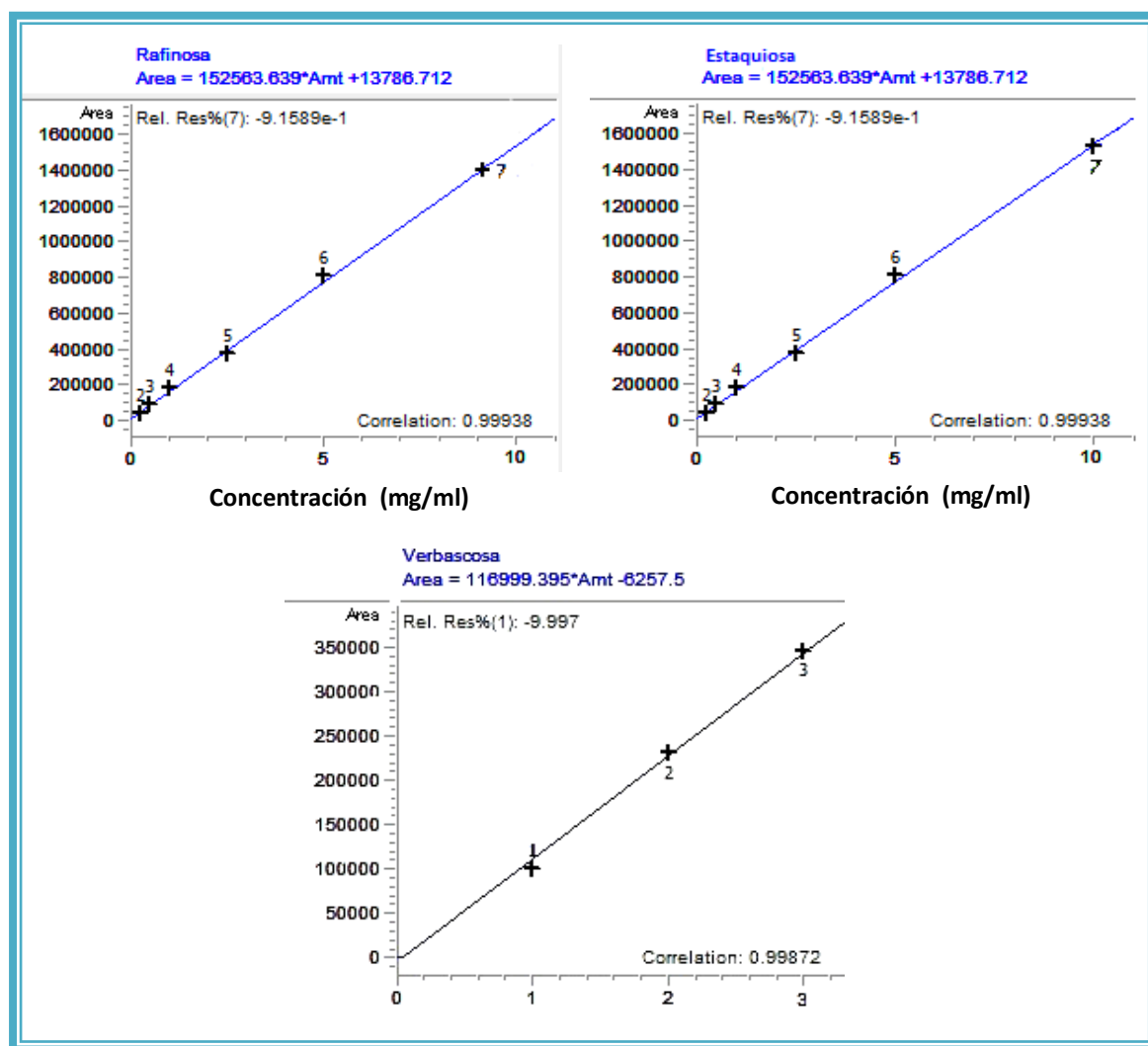


Figura 4. Curva de calibración de rafinosa, estaquiosa y verbascosa para la cuantificación de oligosacáridos

Curvas de calibración para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford

En la Figura 16 se muestran los datos utilizados para la construcción de la curva de calibración con un estándar de proteína de suero bovina (BSA), de la misma manera, la curva se puede observar en la Figura 15.

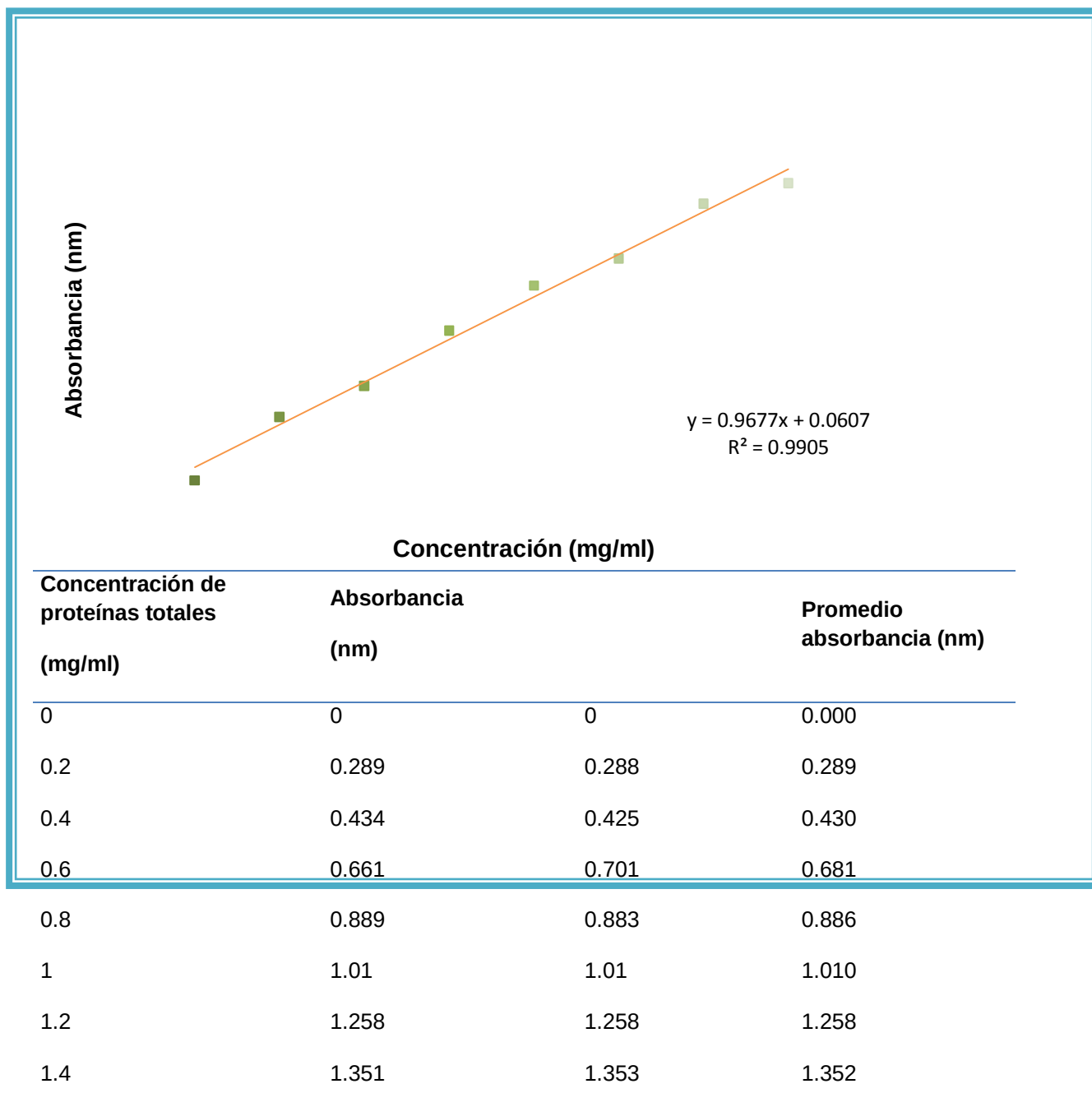


Figura 5. Curva de calibración de proteínas por el método de Bradford

