



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

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

“EFECTO DEL EXTRACTO DE LA FERMENTACIÓN *in vitro* DE LA FRACCIÓN NO DIGERIBLE DEL FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) COCIDO VARIEDAD NEGRO 8025 SOBRE CÉLULAS HT-29”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA

L. N. Raquel Karina Cruz Bravo

DIRIGIDO POR:

Dra. Ma Guadalupe Flavia Loarca Piña

QUERÉTARO, QRO., OCTUBRE 2011.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

“EFECTO DEL EXTRACTO DE LA FERMENTACIÓN *in vitro* DE LA FRACCIÓN NO DIGERIBLE DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) COCIDO DE LA VARIEDAD NEGRO 8025 SOBRE CÉLULAS HT-29”

TESIS

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

Presenta:

L. N. Raquel Karina Cruz Bravo

Dirigido por:

Dra. Ma Guadalupe Flavia Loarca Piña

SINODALES

Dra. Ma Guadalupe Flavia Loarca Piña
Presidente

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Secretario

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Vocal

Dra. Minerva Ramos Gómez
Suplente

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Suplente

Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz
Director de la Facultad

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un componente importante en la dieta mexicana y una de las principales fuentes de proteínas y fibra dietética. Se ha demostrado que contiene compuestos con propiedades biológicas, tales como los polifenoles y la fibra dietética, cuya fermentación colónica produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC) relacionados con la prevención del cáncer de colon y la inhibición de la proliferación e inducción de la apoptosis en células cancerosas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del extracto de la fermentación *in vitro* de la fracción no digerible (EFFND) de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Negro 8025 sobre la sobrevivencia de células HT-29, así como proponer un mecanismo molecular de quimioprotección. El frijol Negro 8025 presentó un mayor contenido de la fracción no digerible (FND) (58.57%) que Pinto Durango y Azufrado Higuera, por lo que se eligió esta variedad para la fermentación *in vitro*. Se midió el pH del medio de incubación y la producción AGCC. Posteriormente se evaluó el efecto del EFFND sobre la sobrevivencia de las células HT-29. La CL₅₀ fue equivalente a 7.36 mmol, 0.33 mmol y 3.31 mmol de ácido acético, propiónico y butírico respectivamente del EFFND. Finalmente se trataron las células con el EFFND y con una mezcla sintética de AGCC (acético, propiónico y butírico) equivalente a la encontrada en la CL₅₀ (EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀, respectivamente). Se les extrajo el ARNm y se sintetizó el ADNc, para llevar a cabo el PCR en tiempo real con una placa de arreglos (84 genes relacionados con el gen P53 y 3 genes constitutivos como control). Los resultados mostraron que tanto el EFFND como la mezcla de los AGCC modularon la expresión de genes implicados en el arresto del ciclo celular, proliferación celular, apoptosis y reparación del ADN. Por lo que se sugiere que los productos de la fermentación de la FND del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad Negro 8025 contiene compuestos con actividad quimioprotectora que modulan los genes en células de adenocarcinoma de colon humano HT-29 a través de mecanismos antiproliferativos y pro-apoptóticos.

(Palabras clave: frijol común, FND, AGCC, arresto del ciclo celular, inhibición de la proliferación, apoptosis, reparación del ADN).

SUMMARY

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an important component in the Mexican diet and a major source of protein and dietary fiber. It has been shown that this legume contains several substances with biological properties, such as phenolic compounds and dietary fiber. The latter has been associated with prevention of the development and progression of colon cancer through the bacteria fermentation in the colon, producing short-chain fatty acids (SCFA), including butyric acid, related to the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in cancer cells. The aim of this study was to evaluate the effect of a fermented extract of the nondigestible fraction (FNDF) of cooked common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) variety Negro 8025 on the survival of human colon adenocarcinoma HT-29 cells as well as to suggest the molecular mechanism of its chemoprotection. Bean Negro 8025 showed the highest content of nondigestible fraction (NDF) (58.57%), so we chose this variety of common bean for *in vitro* fermentation. We measured the pH of the incubation medium and the SCFA production. Afterwards, the effect of FNDF on HT-29 cells survival was evaluated. The LC₅₀ was equivalent to 7.36 mmol, 0.33 mmol and 3.31 mmol of acetic, propionic and butyric acids of EFFND, respectively. Finally, cells were also treated with FNDF and a synthetic mixture of SCFA (acetic, propionic and butyric) equivalent to that found in the median lethal concentration (FNDF- LC₅₀ and SCFA-LC₅₀, respectively) for the molecular analysis. mRNA was extracted and cDNA was synthesized to carry out real-time PCR arrays (84 genes related to the P53 pathway and 3 housekeeping genes as control). The results showed that both FNDF and the mixture of SCFA modulated the expression of genes involved in cell cycle arrest, cell proliferation, apoptosis and DNA repair. These results suggested that the NDF of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), variety Negro 8025 contains compounds with chemopreventive properties (including SCFA) that modulate the expression of genes in the HT-29 human colon adenocarcinoma cells through anti-proliferative and pro-apoptotic mechanisms.

(Keywords: Common bean, NDF, SCFA, cell cycle arrest, proliferation inhibition, apoptosis, DNA repair)

DEDICATORIA

A Dios por darme la fortaleza y ser mi guía en cada paso.

A mis padres, Gustavo Cruz y Rosalía Bravo

AGRADECIMIENTOS

Al H. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro (CONCYTEQ) por el apoyo financiero otorgado para la realización y desempeño de mis estudios de posgrado.

A la Dra. Ma Guadalupe Flavia Loarca Piña por haber confiado en mí, por su apoyo, paciencia y valiosa asesoría en el diseño y realización de este trabajo de tesis.

A la Dra. Minerva Ramos Gómez, Dr. Ramón Guevara González, Dra. Rosalía Reynoso Camacho, Dra. Teresa García Gasca por su colaboración y disposición en asesorarme siempre que lo necesitaba.

Al Dr. Horacio Guzmán, Dr. Juan de Dios Figueroa, M. C. Gustavo Pedraza, Dr. Lorenzo Guevara, Dr. B. Dave Oomah, en particular al Dr. Paul A. Wiersma por su generosa ayuda y apoyo en la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio y del posgrado, en especial a Lupita Herrera, Rocío, Nataly, Gely, Consuelo, Susy, Denisse, Mari y Clau por su amistad y su gran ayuda en innumerables ocasiones.

A todo el personal administrativo y logístico de la UAQ por su apoyo durante mis estudios en el posgrado.

A toda mi familia, en especial a mi madrina Teresa por ofrecerme su afecto y apoyo, a mi sobrinita Sary por su alegría, cariño y tan calurosas bienvenidas en las aisladas visitas a casa, pero sobretodo a mis padres por su apoyo, ser mi motivación para superarme y por enseñarme a nunca rendirme ante las pruebas de la vida.

A mis grandes amigas Sandra García y Nallely Falfán por ofrecerme su invaluable amistad y ser mi familia en todos estos años fuera de casa.

A mis amigos Antonio Cervantes, Miriam Tejeda, el travieso Fer; a Shawkat, Lubna y a la pequeña Haya, por ser como mi familia durante mi estancia en Canadá.

A mis compañeros y nuevos amigos del PARC-Summerland: Geneviève Earleane, Mohit, Pauline, Claire y Choo. También a Itsi, Suman, Swapna, Virginia, Yasantha, Yuki, Dongbao, Julie, Albert, Carl, Danielle, Ben, Drew, y Fraser por su compañerismo e incluso ser mis cómplices en mis aventuras canadienses.

También agradezco a Valerie, Bernie y Suzanne Wright, Judy Harrison, John y Leslie Drover, Gary y Susan Wahlgren, Colleen Harlton y a Reinier Erkens por brindarme su afecto y hacerme sentir parte de sus familias cuando estuve lejos de mi país.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Cáncer	3
2.1.1 Cáncer de colon	4
2.1.2 El gen supresor tumoral P53	8
2.2 Ciclo celular	11
2.2.1 Etapas de la interfase	12
2.2.1.1 Fase S: síntesis	13
2.2.1.2 Fase G2	13
2.2.1.3 Mitosis	14
2.2.2 Regulación del ciclo celular	17
2.2.2.1 Punto de restricción Rb-E2F	17
2.2.2.2 Puntos de control de la regulación del ciclo celular	18
2.3 Muerte celular	20
2.3.1 Necrosis vs. Apoptosis	20
2.3.2 Apoptosis	22
2.3.2.1 Características morfológicas	23
2.3.2.2 Activación de la apoptosis	24
2.3.2.3 La vía extrínseca	25
2.3.2.4 La vía intrínseca	27
2.4 Reparación del ADN	29
2.5 Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	31

2.5.1	Generalidades	31
2.5.2	Compuestos con propiedades biológicas	33
2.5.3	Fibra dietética	35
2.6	Fermentación bacteriana y producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	39
2.6.1	Fermentación colónica de la fibra dietética	42
2.6.2	Fermentación colónica de compuestos fenólicos	45
2.7	Sistema biológico de prueba	47
3	JUSTIFICACIÓN	48
4	HIPÓTESIS	49
5	OBJETIVOS	49
5.1	General:	49
5.2	Particulares:	50
6	METODOLOGÍA	51
6.1	Materiales	51
6.1.1	Compuestos químicos	51
6.1.2	Material biológico	51
6.2	Métodos	52
6.2.1	Tratamiento térmico	52
6.2.2	Extracción de la fracción no digerible (FND)	52
6.2.3	Análisis proximal	53
6.2.3.1	Determinación de cenizas	53
6.2.3.2	Determinación de humedad	53
6.2.3.3	Determinación de proteína total	54
6.2.3.4	Determinación de lípidos	55
6.2.4	Cuantificación de almidón resistente	56
6.2.5	Extracción de oligosacáridos	56
6.2.6	Cuantificación de oligosacáridos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución	57
6.2.7	Extracción metanólica	57
6.2.8	Cuantificación de flavonoides totales	58

6.2.9	Cuantificación de taninos condensados	58
6.2.10	Fermentación <i>in vitro</i> de la FND	58
6.2.11	Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta en el EFFND	60
6.2.12	Cuantificación de proteínas totales en el EFFND	60
6.2.13	Cultivo celular	61
6.2.14	Elaboración de la curva de crecimiento de las células HT-29	61
6.2.15	Determinación de daño celular (citotoxicidad)	62
6.2.16	TUNEL	64
6.2.17	Extracción de ARN	66
6.2.18	Detección y evaluación de la calidad de ARN	67
6.2.19	Síntesis de ADNc de cadena sencilla	68
6.2.20	Síntesis de ADNc de doble cadena	69
6.2.21	Detección de ADNc de doble cadena sintetizado	72
6.2.22	Arreglos de RT-PCR cuantitativo	73
7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
8.1	Composición química de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad Negro 8025, Pinto Durango y Azufrado Higuera con y sin tratamiento térmico	74
8.2	Contenido de oligosacáridos y almidón resistente en frijol crudo, cocido y en la FND de la variedad Negro 8025	77
8.3	Contenido de taninos condensados (TC) y flavonoides totales (FT) de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad Negro 8025	78
8.4	Efecto de la fermentación del FND deL frijol común Negro 8025 sobre el pH del medio de incubación	80
8.5	Contenido de AGCC en el extracto de la fermentación <i>in vitro</i> de la fracción no digerible (EFFND).	82
8.6	Efecto del EFFND sobre la sobrevivencia de células HT-29	85
8.7	Evaluación del efecto de los AGCC en la sobrevivencia de las células HT-29	86
8.8	Efecto citotóxico del EFFND y AGCC en células HT-29	88

8.9 Efecto del EFFND sobre la fragmentación del ADN en células HT-29	90
8.10 Análisis de la regulación de la expresión transcripcional en las células HT-29 después de los tratamientos EFFND-CL ₅₀ y AGCC-CL ₅₀	92
8.11 Propuesta del mecanismo de acción molecular para el EFFND y AGCC en células HT-29	104
9 CONCLUSIONES	106
10 BIBLIOGRAFÍA	108
11 ANEXOS	132

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características diferenciales de los tumores que se desarrollan a través de las dos vías de carcinogénesis en el CCR.	6
2	Composición química del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedades Negro 8025, Pinto Durango y Azufrado Higuera.	75
3	Contenido de oligosacáridos totales, rafinosa, estaquiosa, verbascosa y almidón resistente en frijol crudo, cocido y en la FND de la variedad Negro 8025.	77
4	Contenido de taninos condensados y flavonoides totales en el frijol crudo, cocido, FND y EFFND del frijol común variedad Negro 8025.	78
5	Efecto de la FND del frijol Negro 8025 y rafinosa sobre el pH durante la fermentación <i>in vitro</i> .	80
6	Efecto de la fermentación de la FND de frijol común variedad Negro 8025 sobre el pH del medio de incubación usando inóculo fecal en diferentes condiciones.	80
7	Contenido de AGCC en el EFFND usando inóculo fecal en diferentes condiciones.	83
8	Genes regulados positivamente con los tratamientos EFFND-CL ₅₀ y AGCC-CL ₅₀ en comparación con las células HT-29 no tratadas.	92
9	Genes regulados negativamente con los tratamientos EFFND-CL ₅₀ y AGCC-CL ₅₀ en comparación con las células HT-29 no tratadas	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Modelo de Fearon y Vogelstein para la carcinogénesis colorrectal.	7
2	Esquema de las conexiones funcionales de la proteína p53.	10
3	Fases de la división celular por mitosis	15
4	Ciclo celular y puntos de control	19
5	Características morfológicas de la muerte celular por necrosis y apoptosis	21
6	ADN fragmentado detectado por tinción TUNEL en células germinales de ratas.	24
7	Mecanismos de la apoptosis por vía intrínseca y la vía extrínseca	25
8	Fermentación bacteriana de la fibra	40
9	Cultivo <i>in vitro</i> de células HT-29	47
10	Reacciones en el ensayo de citotoxicidad de la LDH liberada en el medio de cultivo	62
11	Sobrevivencia de células HT-29 después 24 horas de tratamiento con el EFFND	85
12	Comparación del efecto de los tratamientos EFFND-CL ₅₀ y AGCC-CL ₅₀ en la supervivencia de las células HT-29	86
13	Comparación del efecto citotóxico de los tratamientos EFFND-CL ₅₀ y AGCC-CL ₅₀ en las células HT-29	88
14	Efecto de los tratamientos EFFND-CL ₅₀ y AGCC-CL ₅₀ en la fragmentación del ADN en células HT-29	90
15	Regulación de la expresión de genes involucrados en el	104

	ciclo celular	
16	Regulación de la expresión de genes involucrados en la apoptosis	105
17	Curva de calibración de mg (+)-catequina	130
18	Curva de calibración de mg de rutina	131
19	Curva de calibración de rafinosa, estaquiosa y verbascosa	132
20	Curva de calibración de mg ácido acético, propiónico y butírico	133
21	Curva de calibración de µg de ASB	134
22	ARN extraído de las células HT-29	135
23	Optimización de ciclos de PCR para el ADNc de las células HT-29 control	136
24	Optimización de ciclos de PCR para el ADNc de las células HT-29 tratadas con EFFND-CL ₅₀	137
25	Optimización de ciclos de PCR para el ADNc de las células HT-29 tratadas con AGCC-CL ₅₀	138
26	Grafica de dispersión de los genes que fueron regulados al menos 2 veces positiva negativamente en las células HT-29 tratadas con EFFND-CL ₅₀ respecto al control	139
27	Genes regulados positivamente en las en las células HT-29 tratadas con EFFND-CL ₅₀ al menos 2 veces respecto al control	140
28	Genes regulados negativamente en las en las células HT-29 tratadas con EFFND-CL ₅₀ al menos 2 veces respecto al control	141
29	Grafica de dispersión de los genes que fueron regulados al menos 2 veces positiva y negativamente en las células HT-29 tratadas con AGCC-CL ₅₀ respecto al control	142
30	Genes regulados positivamente en las en las células HT-29 tratadas con AGCC-CL ₅₀ al menos 2 veces respecto al control	143

31	Genes regulados negativamente en las en las células HT-29 tratadas con AGCC-CL ₅₀ al menos 2 veces respecto al control	144
----	---	-----

1 INTRODUCCIÓN

En las sociedades occidentales, el cáncer colorrectal (CCR) es la tercera causa de neoplasias en ambos sexos, tanto en incidencia como en mortalidad, y como tal, representa un problema de salud pública importante (Jemal *et al.*, 2005).

Evidencia epidemiológica ha relacionado el consumo de la fibra dietética con la inhibición de la incidencia de CCR (Dahm *et al.*, 2010), siendo dicha fibra un grupo heterogéneo de sustancias no digeribles, destacando la fibra (soluble e insoluble), el almidón resistente y oligosacáridos como: rafinosa, estaquiosa y verbascosa, entre otros. Por ejemplo, éstos junto con los compuestos fenólicos (taninos condensados, flavonoides y antocianinas) y otros metabolitos secundarios han mostrado tener un papel quimioprotector en modelos *in vivo* al prevenir y/o reducir las enfermedades crónico-degenerativas, así como la inhibición de la sobrevivencia de líneas de cáncer de colon humano (Bazzano *et al.*, 2001; Beninger y Hosfield 2003; Waldecker *et al.*, 2008; Campos-Vega *et al.*, 2010).

Cuando estos compuestos evaden la digestión por las enzimas digestivas y llegan al colon pueden ser fermentados por la microflora asociada, produciendo principalmente ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como: el acético, propiónico y butírico, entre otros (Delzenne *et al.*, 2003), así como derivados fenólicos de los AGCC (Waldecker *et al.*, 2008). El ácido butírico es un ácido graso de cuatro carbonos que particularmente ha recibido la atención de muchos investigadores como un agente quimioprotector debido a que inhibe la proliferación de células tumorales, induce apoptosis y conduce a un fenotipo más diferenciado (Sengupta *et al.*, 2006), reduciendo así, el riesgo de desarrollar CCR. El efecto protector de los AGCC se ha estudiado en cultivos *in vitro* para evaluar el efecto por el cual un compuesto induce la diferenciación, arresto del ciclo celular, apoptosis y reparación del ADN en células transformadas. (Fu *et al.*, 2004, Rouet-Benzineb *et al.*, 2004; Li y Elsasser 2005; Li *et al.*, 2006). La línea celular HT-29 ha sido empleada como modelo para investigar el mecanismo de algunos

compuestos protectores (Wächtershäuser *et al.*, 2001; Schröder *et al.*, 2005; Bermúdez *et al.*, 2007; Campos-Vega *et al.*, 2010).

Estudios previos en el laboratorio han demostrado que compuestos indigeribles de diferentes variedades de frijol común pueden inhibir la proliferación e inducir apoptosis tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* mediante la modulación de la expresión de genes involucrados en los procesos celulares anteriormente mencionados (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008, Campos-Vega *et al.*, 2010).

Es por ello que para complementar dichos hallazgos, en el presente trabajo se evaluó el efecto del extracto de la fermentación *in vitro* de la fracción no digerible (EFFND) del frijol común variedad Negro 8025 cocido sobre la sobrevivencia de células de adenocarcinoma de colon HT-29, así como su mecanismo de acción molecular, con la finalidad de aportar conocimiento científico sobre el efecto benéfico que dicha variedad de frijol puede brindar frente al cáncer de colon humano.

2 ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer es la consecuencia del crecimiento anormal, rápido, desorganizado y descontrolado de nuevo tejido, que continúa una vez cesado el estímulo de proliferación celular. La masa de tejido formado como consecuencia de este proceso puede afectar la función del órgano originario, puede infiltrar los tejidos vecinos y diseminarse por vía sanguínea o linfática a otros tejidos distantes, comprometiendo su funcionalidad y amenazando la vida del organismo (Castells y Piqué, 2000).

De acuerdo a estadísticas mundiales de la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés, 2008), las neoplasias malignas representan la tercera causa de muerte después de las enfermedades contagiosas y las cardiovasculares. Esta enfermedad se deriva de alteraciones genéticas, tales como las mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, así como anomalías cromosomales. En los últimos años se ha revelado que los cambios epigenéticos también están desde las etapas tempranas de la tumorigénesis (Baylin y Ohm, 2006; Jacinto y Esteller, 2007; Jones y Baylin, 2007). Existen más de cien subtipos de neoplasias malignas que se originan a partir de diferentes tipos celulares en diferentes órganos. De acuerdo a esto, los síntomas del cáncer varían dependiendo de la localización y de las características del crecimiento del tumor (Moscow y Cowan, 2007).

Se cree que el origen de todos los tumores malignos es la adquisición de una naturaleza clonal, lo que significa que todas las células tumorales en un cáncer específico se derivan de una sola célula normal que se ha transformado. Sin embargo, a pesar de que todas las células tumorales que crecen en un solo tumor comparten características comunes como las mutaciones específicas y aberración cromosómica, diferentes regiones dentro del tumor muestran una

imagen más compleja. De hecho, a medida que el tumor se desarrolla, la población inicial de células monoclonales puede convertirse cada vez más heterogénea conforme las células adquieren nuevas aberraciones genéticas, lo cual conduce a subpoblaciones dentro del tumor (Hanahan y Weinberg, 2000).

Las células cancerosas son genéticamente menos estables que sus contrapartes normales y son, por lo tanto, propensas a desarrollar aberraciones genéticas adicionales a medida que crecen más allá de su esperanza de vida normal. Las mutaciones adicionales, así como lo rearreglos, duplicaciones y las deleciones de porciones de sus cromosomas durante la división celular son nuevas características que pueden adquirirse durante la tumorigénesis. Se cree que esta inestabilidad genómica se debe a puntos de control perturbados operando a diversos puntos en el ciclo celular. Las células que acumulan cambios genéticos que favorecen un crecimiento más rápido y agresivo compiten más eficientemente con otras células de tejidos circundantes (Hanahan y Weinberg, 2000).

2.1.1 Cáncer de colon

Cuando este proceso se inicia en el colon o el recto el resultado es el cáncer colorrectal (CCR), el cual es un proceso multifactorial influenciado por factores ambientales, genéticos y epigenéticos (Jänne y Mayer, 2000). Al igual que otros cánceres, la enfermedad progresa de forma local, afectando en este caso el colon y/o el recto, e infiltrando progresivamente los tejidos vecinos (Castells y Piqué, 2000). A nivel mundial, el cáncer colorrectal es la cuarta causa de muerte por tumores malignos para ambos sexos y casi el 60% de los casos ocurren en países desarrollados y es el segundo más común entre la población femenina y el tercero más frecuente en hombres (IARC, 2008). En México, la mortalidad por tumores malignos ocupó el tercer lugar en el año 2008. Específicamente, el cáncer

de colon representó el 6 % del total de defunciones registradas en el año, tanto en mujeres como en hombres (INEGI, 2008).

Se reconocen dos vías de carcinogénesis en las neoplasias colorrectales (Cuadro 1). La primera y la más común (modelo supresor o LOH, por sus siglas en inglés), que afecta al 85% de los casos, se caracteriza por la acumulación progresiva de alteraciones genéticas, que tiene lugar paralelamente a la evolución de la alteración histológica adenoma-cáncer. Incluye, de forma característica, la anulación funcional de genes supresores, como APC, p53 o DCC, también ocurre la activación de oncogenes como Ras y Myc. Los tumores originados a través de esta vía muestran una marcada inestabilidad cromosómica, son frecuentes las anomalías citogenéticas y pérdida de alelos (Fearon y Vogelstein, 1990; Ilyas, 1996).

La segunda vía alternativa (modelo mutador o RER, por sus siglas en inglés) se caracteriza por la aparición de mutaciones diseminadas por todo el genoma (Ilyas, 1996). Algunas de estas mutaciones ocurren en regiones que codifican genes implicados en el ciclo celular y en la progresión tumoral. La señal distintiva de esta vía es la alteración de la longitud y composición de pequeñas secuencias de bases del ADN (microsatélites). La presencia de una elevada incidencia de alteraciones de los microsatélites (inestabilidad de los microsatélites) (MSI) se debe a un defecto en el sistema de genes reparadores del ADN (hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2, GTBP) (Cunningham *et al.*, 1998).

Cuadro 1. Características diferenciales de los tumores que se desarrollan a través de las dos vías de carcinogénesis en el cáncer colorrectal (Diez-Alonso *et al.*, 2001).

Vía RER	Vía LOH
Edad > 45 años	Edad < 45 años
Colon derecho	Colon izquierdo y recto
Sin poliposis	Pólipos asociados
Poco diferenciados	Bien diferenciados
Diploides	Aneuploides
Mucoides	No mucoides
Baja tendencia a metastatizar	Metástasis a distancia
p53 y ras normales	p53 y ras alterados
Incidencia familiar	Esporádico

RER= modelo mutador

LOH= modelo supresor

El cáncer colorrectal puede precederse en ocasiones de la aparición de pólipos adenomatosos, crecimientos anormales a partir de las células de la capa luminal del colon que forman profusiones en la luz del intestino y que se consideran una lesión pre-cancerosa, con potencial degeneración a adenocarcinoma (Castells y Piqué, 2000). La secuencia transcurre a lo largo de una media de 7 años. Paralelamente tiene lugar un proceso de acumulación de anomalías genéticas, en genes reparadores del ADN, oncogenes, genes supresores, genes encargados de la codificación de factores de crecimiento, citocinas, moléculas reguladoras del ciclo celular, factores supresores, moléculas de adhesión celular y enzimas de la matriz extracelular (Diez-Alonso *et al.*, 2001).

El modelo de Fearon y Vogelstein (1990) (Figura 1) asume la participación del gen APC (Adenomatous Polyposis Coli, por sus siglas en inglés) en la formación del adenoma y el oncogen K-ras en la transición de los adenomas intermedios a carcinomas en el CCR esporádico (Shields *et al.*, 2000).

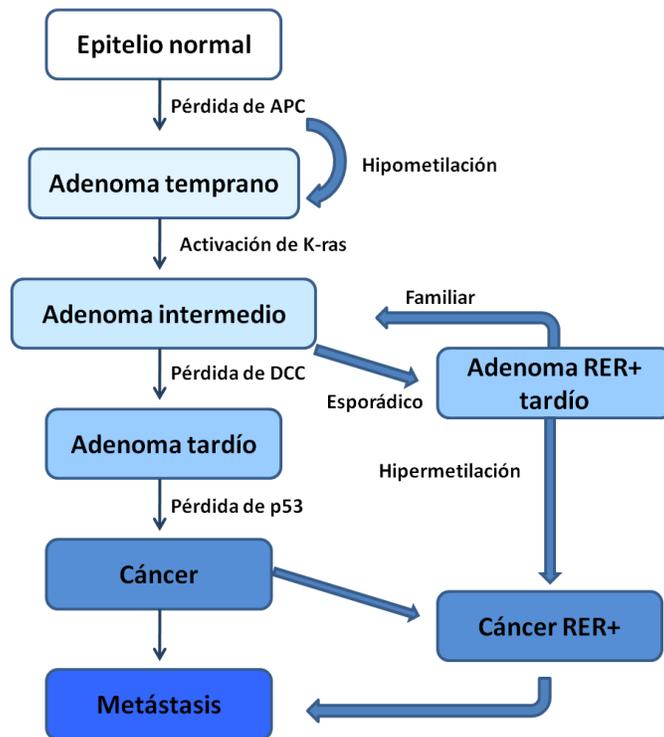


Figura 1. Modelo de Fearon y Vogelstein (1990) para la carcinogénesis colorrectal.

La progresión de los cambios morfológicos se debe no solamente a cambios en los eventos genéticos sino también epigenéticos, incluyendo un mayor número de mutaciones en el gen o cromosoma, la pérdida de heterocigosidad, cambios en los patrones metilación, y una tendencia hacia un estado de inestabilidad genómica. En esta secuencia, uno de los primeros cambios parece implicar hipometilación (Fearon y Vogelstein, 1990). Sin embargo, hay un número considerable de variaciones de este patrón idealizado, y tanto la hipometilación como la hipermetilación pueden afectar el desarrollo y progresión del cáncer de colon en varios puntos.

Se ha observado frecuentemente que la mayoría de las neoplasias de colon tienen niveles muy altos de metilación en muchos loci. Esto también ocurre en adenomas muy pequeños del tejido de colon (Rashid *et al.*, 2001). Igualmente, se ha demostrado que la hipometilación global a través de mecanismos como la

inestabilidad genómica (que incluye estructuras cromosómicas anormales) conduce a la transformación neoplásica (Laird, 2005).

Cambios más específicos en la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores involucran tanto mecanismos de metilación del ADN como de acetilación de histonas, lo que probablemente tenga efectos profundos sobre el desarrollo y progresión del cáncer de colon. Es por ello que algunos investigadores han sugerido la combinación de inhibidores de metiltransferasas y de inhibidores de la histona desacetilasa como terapia, ya que éstos pueden llevar a cabo un efecto sinérgico en la reactivación de genes silenciados epigenéticamente (Laird, 2005).

2.1.2 El gen supresor tumoral p53

Está localizado en el cromosoma 17, tiene 11 exones y codifica una fosfoproteína de 53 kDa. El marco de lectura abierto del p53 es de 393 aminoácidos, y la región central contiene el dominio de unión al ADN. (Cho *et al.*, 1994). Actúa como factor de transcripción, controlador del ciclo celular, iniciador de la apoptosis, preservador de la estabilidad genética y como promotor de la diferenciación celular (Velculescu y el-Deiry, 1996). Debido a su función como vigilante de la aparición de daño genético y como promotor de la respuesta en las células dañadas (mediante reparación del ADN y supervivencia, o en caso contrario induciendo la muerte de la célula) se le llama el guardián del genoma. La expresión del gen p53 se induce por diversas formas de estrés celular, radiación ionizante y UV (Figura 2). Es el gen supresor alterado (mutado) con mayor frecuencia en neoplasias y detectado en casi todo tipo de tumores (Soussi *et al.*, 2000, Soussi y Beroud, 2001). La afectación genética más habitual es la delección de un alelo y mutación del restante, situación denominada pérdida de estado heterocigótico (Baker *et al.*, 1990).

Las mutaciones de p53 se localizan generalmente en los exones 4 a 8 en los codones 175, 245, 248, 273 y 282. Pueden ser sin sentido, deleciones, inserciones y mutaciones de splicing que resulta en una proteína p53 truncada. La forma mutada de p53 se encuentra sobreexpresada en el cáncer de colon, en un 40-50 % de los carcinomas colorrectales y se le asocia con carcinomas agresivos. El 80 % de las mutaciones resultan de la deaminación de la citocina metilada en la región CpG del gen (codones 175, 248 y 273) (Bourdon, 2007). La proteína codificada por un gen p53 que ha sufrido una mutación posee una secuencia de aminoácidos diferentes y es inactiva (Velculescu y el-Deiry, 1996).

En su estado funcional, la proteína p53 activa la síntesis de proteína p21 cuando se produce una alteración en la secuencia normal del ADN por radiaciones, proteínas víricas, carcinógenos químicos, quimioterapia. La proteína p21 se acopla al complejo quinasa-ciclina D1, impidiendo la fosforilación (aportación de energía) de proteínas que intervienen en la replicación del ADN (en el paso de la fase G1 a la fase S), lo que bloquea la progresión del ciclo celular y permite que la célula pueda reparar ese daño. Simultáneamente también se activa la expresión de PCNA y GADD45, proteínas que actúan en la síntesis de ADN. En caso de que no sea posible la reparación del ADN, la proteína p53 activa los genes encargados de iniciar la muerte celular en apoptosis (desaparición de la célula sin activación de lisosomas ni inducción de fenómenos inflamatorios) (Velculescu y el-Deiry, 1996).

Según este modelo, la inestabilidad genética resultante de la inactivación del gen p53, proporcionan a la célula una mayor capacidad de proliferación y permiten la expansión de clones celulares con material genético alterado (Velculescu y el-Deiry, 1996). La proteína p53 codificada por el gen que ha sufrido una mutación posee una vida media prolongada y se acumula en las células neoplásicas, por lo que es fácilmente detectable mediante inmunohistoquímica y cuantificable mediante ELISA. Se ha reportado que el 60% de los adenocarcinomas colorrectales y el 20% de los adenomas presentan

sobreexpresión en el núcleo celular de la proteína p53 mutada. La presencia de mutación en el gen o la sobreexpresión de la proteína codificada, se asocian a un mayor grado de invasión local, estadio más avanzado, presencia de afectación ganglionar y metástasis (Diez *et al.*, 1995). En tumores de colon izquierdo y recto y en tumores de tipo histológico intestinal, la sobreexpresión de p53 mutado es significativamente más frecuente. Asimismo, las neoplasias con elevado índice de proliferación y aneuploidía presentan positividad con mayor frecuencia (Diez-Alonso *et al.*, 2001).

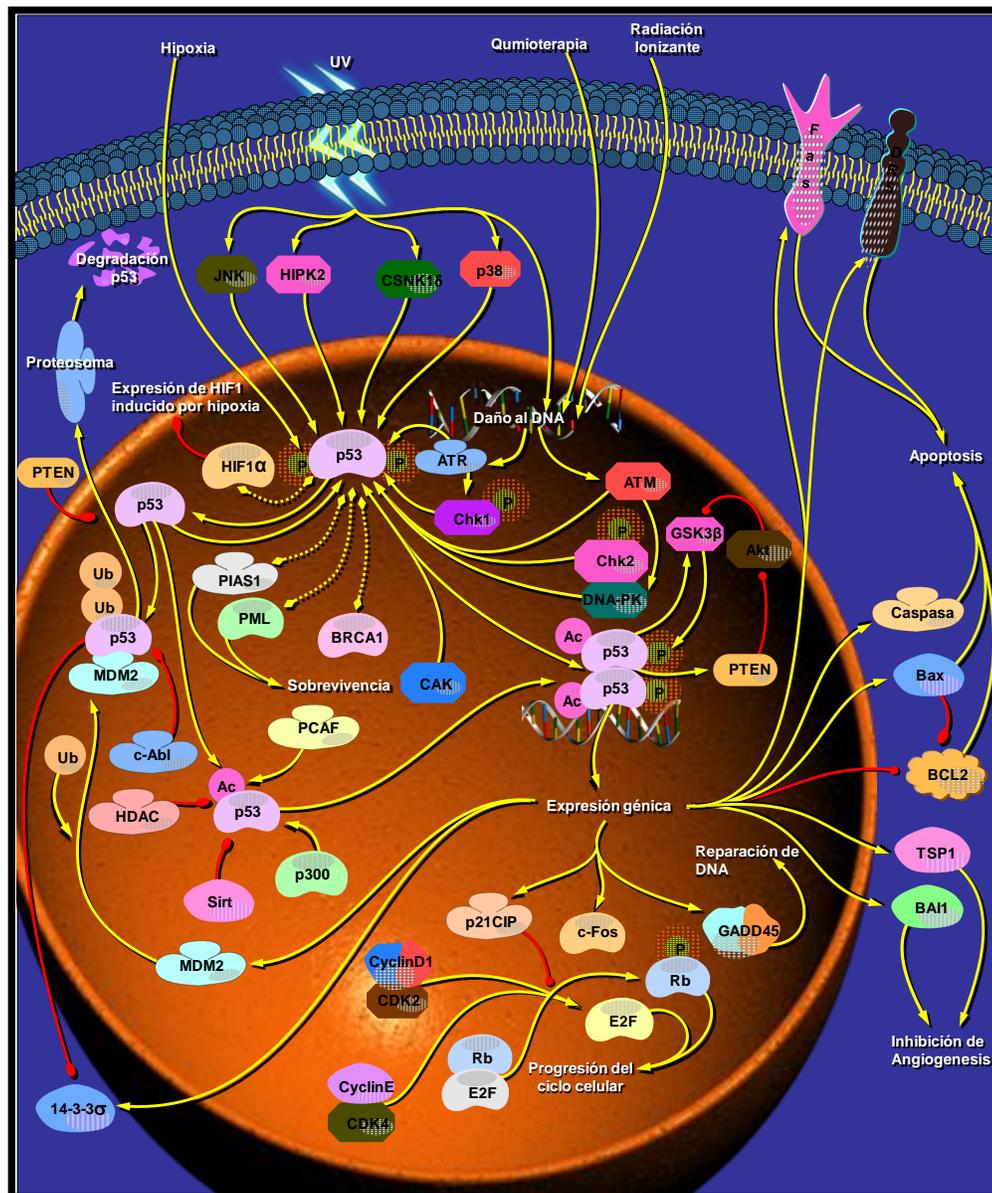


Figura 2. Esquema de las conexiones funcionales de la proteína p53 (www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=p53_Signaling).

2.2 Ciclo celular

El ciclo de división celular es el mecanismo a través del cual todos los seres vivos se propagan. En los organismos multicelulares se requieren muchas más secuencias de divisiones celulares para crear un nuevo individuo; la división celular también es necesaria en el cuerpo para reemplazar las células perdidas por desgaste, mal funcionamiento o por muerte celular programada (apoptosis). Es importante señalar que las células somáticas producidas son genética, estructural y funcionalmente idénticas tanto a la célula materna como entre sí, a menos que hayan sufrido mutaciones. Las células nuevas heredan un duplicado exacto de la información “hereditaria” (genética) de la célula “materna” (madre). Para que esto se lleve a cabo es necesario que la célula coordine un conjunto complejo de procesos citoplasmáticos y nucleares (Lomanto *et al.*, 2003).

Un ciclo celular típico se da en dos fases gigantes: la interfase que a su vez se divide en tres fases: G1, S y G2 y la mitosis que se divide en profase, prometáfase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. En la Interfase, en G1 se produce la acumulación del ATP necesario para el proceso de división y el incremento de tamaño celular; la fase S se caracteriza por la replicación del ADN nuclear. Finalmente, en G2, que es el tiempo que transcurre entre la fase S y el inicio de la Mitosis, la célula se prepara para mitosis. Por último, el ciclo celular culmina con la mitosis, donde se divide la cromatina duplicada de modo tal que cada célula hija obtenga una copia del material genético o sea un cromosoma de cada tipo. El final de la mitosis da cabida a un nuevo ciclo en G1 o puede que la célula entre en fase G0 que corresponde a un estado de reposo especial característico de algunas células, en el cual puede permanecer por días, meses y a veces años (Lomanto *et al.*, 2003).

2.2.1 Etapas de la interfase

En el inicio de un nuevo ciclo, la fase G1 que sigue a la citocinesis y precede a la fase S es un período de actividad bioquímica intensa. La célula incrementa el material enzimático, sus organelos se replican, así como otras moléculas y estructuras citoplasmáticas también aumentan en número; en consecuencia, la célula aumenta en tamaño. Algunas estructuras son sintetizadas por la célula; entre estas se encuentran microtúbulos, microfilamentos de actina y los ribosomas, los cuales están compuestos por subunidades proteicas. Las estructuras membranosas como el aparato de Golgi, los lisosomas, las vacuolas y las vesículas se derivan del retículo endoplásmico, el cual se renueva y aumenta en tamaño por la síntesis de proteínas y lípidos. También hay replicación de mitocondrias y cloroplastos previamente existentes. Las células en G1 pueden detener su progresión en el ciclo y entrar en un estado de reposo especial, llamado G0 (G cero), donde pueden permanecer durante días, semanas o años antes de volver a proliferar y en ocasiones nunca más dividirse, como por ejemplo las fibras musculares esqueléticas que no se dividen, pero sí renuevan sus organelos citoplasmáticos (Lomanto *et al.*, 2003).

Senescencia celular: el estado de G0 es de reposo y ausencia de crecimiento, que difiere de todos los estados que experimenta el ciclo celular. La ausencia de factores de crecimiento apropiados lleva a las células a una especie de latencia en el ciclo celular, en el cual el sistema de control no avanza a través de G1, ya sea porque es incapaz o porque no lo necesita. Además, si se suprimen los nutrientes a la célula, ésta no podría proseguir con el ciclo (Lomanto *et al.*, 2003).

2.2.1.1 Fase S: síntesis

La replicación del ADN comienza cuando la célula adquiere el tamaño suficiente, las proteínas necesarias se han sintetizado y se tiene el ATP necesario. Dado que el ADN lleva la información genética de la célula, antes de la mitosis debe generarse dos juegos o complementos de ADN idénticas para ser repartidas entre las dos células hijas. Durante la interfase el ADN asociado a las histonas constituye la cromatina, que se encuentra desenrollada en largas y delicadas hebras. El ADN es una doble hélice que durante la replicación se abre y cada cadena es utilizada como molde para la producción de una nueva doble cadena, que queda unida a la original y que sirve como guía. Por esta razón, la replicación del ADN se denomina semi-conservativa. Estas dos dobles cadenas de ADN quedan unidas por el centrómero hasta la mitosis, recibiendo el nombre de cromátides hermanas. El proceso clave de la replicación del ADN ocurre durante la fase S (síntesis) del ciclo celular, momento en el cual las histonas (H1, H2a, H2b, H3 y H4) y otras de las proteínas asociadas al ADN son sintetizadas (ADN polimerasas, ligasas, topoisomerasas entre otras) (Lomanto *et al.*, 2003).

2.2.1.2 Fase G2

Durante la fase G2 ocurre la preparación para la mitosis en la cual se producirá repartición equitativa del material genético. Todos los organelos y la maquinaria necesaria esencial para la división de la célula progenitora en dos células hijas idénticas en contenido, aunque de menor tamaño, se adquieren en esta etapa. La cromatina recién duplicada, que está dispersa en el núcleo en forma de cordones filamentosos, comienza a enroscarse lentamente y a condensarse en una forma compacta llamada cromosoma; además, la célula realiza una confirmación completa del ADN duplicado anteriormente. Durante este periodo la célula empieza a ensamblar las estructuras especiales requeridas para

asignar un conjunto completo y equitativo de cromosomas a cada célula hija lo cual se desarrollará durante la mitosis (Lomanto *et al.*, 2003).

2.2.1.3 Mitosis

Durante la mitosis la cromatina se condensa para formar cromosomas, la membrana nuclear se rompe, el citoesqueleto se organiza para formar el huso mitótico y los cromosomas se mueven a los polos opuestos (Figura 3). La segregación cromosómica es seguida usualmente por la división celular (citocinesis) (Lomanto *et al.*, 2003).

La mitosis está dividida convencionalmente en cuatro etapas (profase, metafase, anafase, telofase) (Figura 3), las cuales tienen como función realizar los movimientos necesarios para repartir equitativamente el material genético. La ruptura de la envoltura nuclear marca el inicio de la profase. Cada cromosoma está formado por dos cromátides dispuestas muy juntas longitudinalmente y conectadas por el centrómero. Durante la metafase los pares de cromátides se mueven dentro del huso y finalmente se dispone en el plano medial de la célula. En la anafase las cromátides hermanas se separan bruscamente y son conducidas a los polos opuestos del huso, mientras que el alargamiento del huso aumenta la separación entre los polos, cada cromátida se transforma en un cromosoma separado. Al iniciarse la telofase, los cromosomas alcanzaron los polos opuestos y el huso comienza a dispersarse en dímeros de tubulina y finalmente se vuelven a formar envolturas nucleares alrededor de los conjuntos de cromosomas (Lomanto *et al.*, 2003).

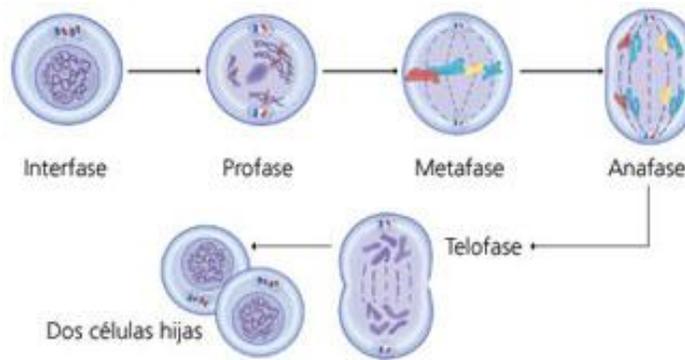


Figura 3. Fases de la división celular por mitosis
 (<http://www.biologia.arizona.edu/cell/tutor/mitosis/cells3.html>)

Profase: La transición de la fase G2 a la fase M del ciclo celular no es un proceso estrictamente definido, aunque se ha encontrado la presencia de los genes supresores tumorales LATS1, que *in vitro*, regulan negativamente la proliferación celular en este punto de control, modulando la actividad de la CDC2/ciclina A. El proceso es mucho más complejo y al parecer las quinasas p38 y Chk1 guardan una estrecha relación en el paso de G2 a M. La cromatina, que en la interfase se halla difusa, se condensa lentamente formando cromosomas definidos, cuyo número exacto es característico de cada especie. Cada cromosoma se ha duplicado durante la fase S precedente y ahora consta de dos cromátides hermanas, cada una de las cuales contiene una secuencia de ADN específica conocida como centrómero que permite la unión de las dos cromátides por proteínas específicas, necesarias para la correcta segregación del cromosoma. Hacia el final de la profase los microtúbulos citoplasmáticos que forman parte del citoesqueleto interfásico se despolimerizan y empieza a formarse el huso mitótico (Lomanto *et al.*, 2003).

Prometafase: Se inicia con la desintegración de la envoltura nuclear que se rompe originado vesículas de membrana indiferenciables de las vesículas de retículo endoplásmico. En este momento los microtúbulos del huso entran en la región nuclear. En cada centrómero maduran complejos proteicos llamados cinetócoros que se unen a los microtúbulos del huso, que ejercen una tensión

sobre los cromosomas, los cuales se ven sometidos a movimientos agitados (Lomanto *et al.*, 2003).

Metafase: Los microtúbulos del cinetócoro alinean los cromosomas en un plano ecuatorial de la célula. Cada cromosoma se mantiene en tensión en esta placa metafásica por los cinetócoros apareados y por sus microtúbulos asociados, los cuales están unidos a los polos opuestos del huso (centríolos) (Lomanto *et al.*, 2003).

Anafase: Inicia cuando los cinetócoros apareados se separan, permitiendo que cada cromátida sea arrastrada lentamente hacia un polo del huso (Lomanto *et al.*, 2003).

Telofase: Los cromosomas hijos separados llegan a los polos y los microtúbulos del cinetócoro desaparecen. Los microtúbulos polares se alargan aún más y se vuelve a formar la envoltura nuclear. La cromatina condensada se expande y los nucleolos reaparecen; la mitosis ha llegado a su fin (Lomanto *et al.*, 2003).

Citocinesis: La citocinesis habitualmente es la división del citoplasma, pero no siempre acompaña a la mitosis. Durante la citocinesis el citoplasma se divide mediante un proceso denominado segmentación, el cual es normalmente dirigido por el huso mitótico que es una reorganización de los microtúbulos del citoesqueleto y es quien determina dónde y cuándo ocurre. La partición en dos células hijas se da gracias a movimientos contráctiles producidos por los filamentos de actina y miosina presentes en el momento de la citocinesis (Lomanto *et al.*, 2003).

2.2.2 Regulación del ciclo celular

La proliferación de las células eucarióticas es controlado por varios puntos de control durante el proceso de la duplicación del ADN y la mitosis, el ciclo celular. La pérdida del control del ciclo celular resulta en una proliferación celular descontrolada, inestabilidad genética y una sobrevivencia celular inapropiada, permitiendo la proliferación y la evolución de las células con daño genético (Malumbres y Barbacid, 2001).

2.2.2.1 Punto de restricción Rb-E2F

Las células utilizan una pequeña familia de cinasas dependientes de ciclina (Cdk) emparentadas para regular la progresión a través del ciclo celular. Las principales Cdk activas son Cdk1 (también denominada CDC2), Cdk2, 4 y 6. Las ciclinas A y B actúan en las fases S y G₂, y al principio de la mitosis. Los genes que codifican muchas de las proteínas que participan en la síntesis de ADN son inducidos cuando las células atraviesan la transición de la fase G1 a S. Para la transcripción de varios de estos genes, de aquellos que codifican la Cdk2 y las ciclinas A y E, se necesita una pequeña familia de factores de transcripción E2F. Además, éstos autoestimulan la transcripción de los genes que los codifican a ellos mismos (Lodish *et al.*, 2003).

La capacidad activadora de la transcripción de los E2F es inhibida por su unión a la proteína Rb. La unión de Rb a los E2F los convierte en represores de la transcripción, porque Rb interactúa con complejos de histona desacetilasa. La fosforilación de Rb inhibe su función represora y permite la activación de los genes necesarios para la entrada en la fase S por parte de los E2F. La fosforilación de la proteína Rb es iniciada por Cdk4-ciclina D y Cdk6-ciclina D en la mitad de G1 (Figura 4). Una vez que es estimulada la expresión de Cdk2 y ciclina E, el complejo Cdk2-ciclina E fosforila adicionalmente la Rb hacia el final de

G1 (Lodish *et al.*, 2003). Dado que los E2F también estimulan su propia expresión, estos procesos forman ciclos de retro control positivo para la fosforilación de la proteína Rb. En este momento, el paso a través del ciclo celular es independiente de la actividad de Cdk4/6-ciclina D, de modo que la progresión tiene lugar incluso cuando se eliminan los mitógenos y la concentración de ciclina D disminuye. La interregulación positiva de E2F y Cdk2-ciclina E produce un rápido aumento de ambas actividades conforme las células se acercan al punto de restricción G1-S. La proteína Rb se mantiene en el estado hiperfosforilado a lo largo de las fases S, G2 y M por los complejos Cdk2-ciclina y Cdk1-ciclina. Después de la fase G1 o G0, la disminución de la concentración de Cdk-ciclina produce la desfosforilación de Rb por la acción de fosfatasas. Como consecuencia, hay proteína Rb hipofosforilada para inhibir la actividad de E2F durante los comienzos de G1 del ciclo siguiente (Lodish *et al.*, 2003).

2.2.2.2 Puntos de control de la regulación del ciclo celular

Si las células progresan hacia la siguiente fase del ciclo celular antes de que la fase previa se complete de manera adecuada, puede producirse un daño genético grave. Las células cuyo ADN está dañado, se detienen en G1 y G2 hasta que se repare la lesión (Figura 4). La detención en G1 impide el copiado de bases dañadas, lo que fijaría las mutaciones en el genoma. La replicación de ADN dañado también causa reordenamientos cromosómicos en una alta frecuencia. La detención en G2 permite que las rupturas del ADN se reparen antes de la mitosis. De lo contrario, se produce una inhabilitación física para unirse al centrómero y llevar a cabo la anafase de manera correcta (Lodish *et al.*, 2003).

Los genes cuya inactivación contribuye al desarrollo de un tumor se llaman genes supresores. El gen supresor de tumores p53 tiene un papel fundamental en el sistema de control del ciclo celular. El arresto del ciclo celular

está mediado por la inducción de p21 dependiente de p53 (waf1/cip1/CDKN1). El gen p21 está localizado en el cromosoma 6p y contiene un sitio de unión de respuesta al p53 en su región promotora (el-Deiry *et al.*, 1993). p21 inhibe a los complejos de cinasas dependientes de ciclina para facilitar el arresto en el punto de control en la fase G1/S (y G2) hasta que el daño del ADN es reparado y las concentraciones de p53 y de p21 disminuyen (Gartel *et al.*, 1996).

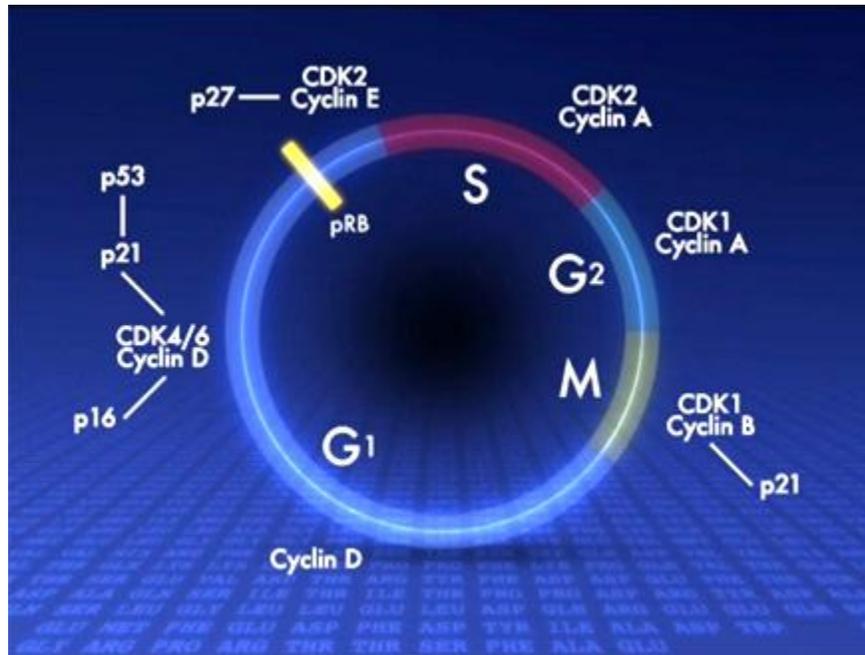


Figura 4. Ciclo celular y puntos de control (<http://www.cancer.gov/cancertopics>).

Si el daño en el ADN es grande, la p53 también activa la expresión de genes que conducen a la apoptosis. Este proceso de muerte celular programada normalmente se desencadena en células para impedir la acumulación de mutaciones múltiples que pudieran traer como resultado la aparición de una célula cancerosa. Las células con mutaciones en p53 no retrasan su entrada en la fase S tras un daño leve en el ADN y no entran en apoptosis tras una lesión más extensa del ADN. Si en estas células se produce daño en el ADN, éste se puede replicar y producir mutaciones y reordenamientos que contribuyen al desarrollo de una célula transformada metastásica. Las consecuencias de las mutaciones en p53

proporcionan un ejemplo de la importancia que tienen los puntos de control del ciclo celular para la salud de un organismo (Lodish *et al.*, 2003).

Respecto a este proceso celular, se ha demostrado en diversos estudios que uno de los mecanismos de acción de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (incluyendo el ácido butírico) sobre las células transformadas es la inducción de la expresión de algunos genes relacionados con el arresto del ciclo celular entre la fase G₁ y S (Ruemmele *et al.*, 2003; Archer *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2005; Campos-Vega *et al.*, 2010).

2.3 Muerte celular

2.3.1 Necrosis vs. Apoptosis

La muerte celular es parte del desarrollo normal y el ciclo de maduración, y es el componente de los patrones de respuesta de muchos de los tejidos vivos a los agentes xenobióticos (por ejemplo, microorganismos y sustancias químicas) y modulaciones endógenas, como la inflamación y un alteración en el suministro de sangre. La muerte celular es importante en el desarrollo del cáncer, así como su prevención y terapia (Kanduc *et al.*, 2002). Es por ello que investigadores han estado buscando agentes antitumorales en productos naturales para desarrollar nuevos agentes terapéuticos para el cáncer, y se ha demostrado que los extractos de algunos productos naturales tienen efectos citotóxicos o actividad inductora de apoptosis en líneas de células tumorales (Chen *et al.*, 2007). En este sentido, se ha demostrado que el ácido butírico, compuesto quimioprotector, tiene un efecto pro-apoptótico en cultivos de células transformadas de colon humano, al inducir la expresión de genes apoptóticos, así como la inhibición de la expresión genes antiapoptóticos (Emenaker y Basson, 2001; Ruemmele *et al.*, 2003; Rouet-Benzineb *et al.*, 2004; He *et al.*, 2007; Ooi *et al.*, 2010).

En base a diferencias morfológicas y bioquímicas, existen dos vías por las cuales las células mueren: necrosis y apoptosis (Figura 5). Ambos procesos difieren en sus mecanismos de inducción: la necrosis es inducida por compuestos químicos letales, eventos biológicos y físicos. Mientras que la apoptosis requiere procesos biológicos que necesitan energía y que están dirigidos genéticamente. La muerte celular por apoptosis ocurre cuando una célula activa un programa interno de suicidio como resultado de la acción de señales intrínsecas o extrínsecas (Kanduc *et al.*, 2002).

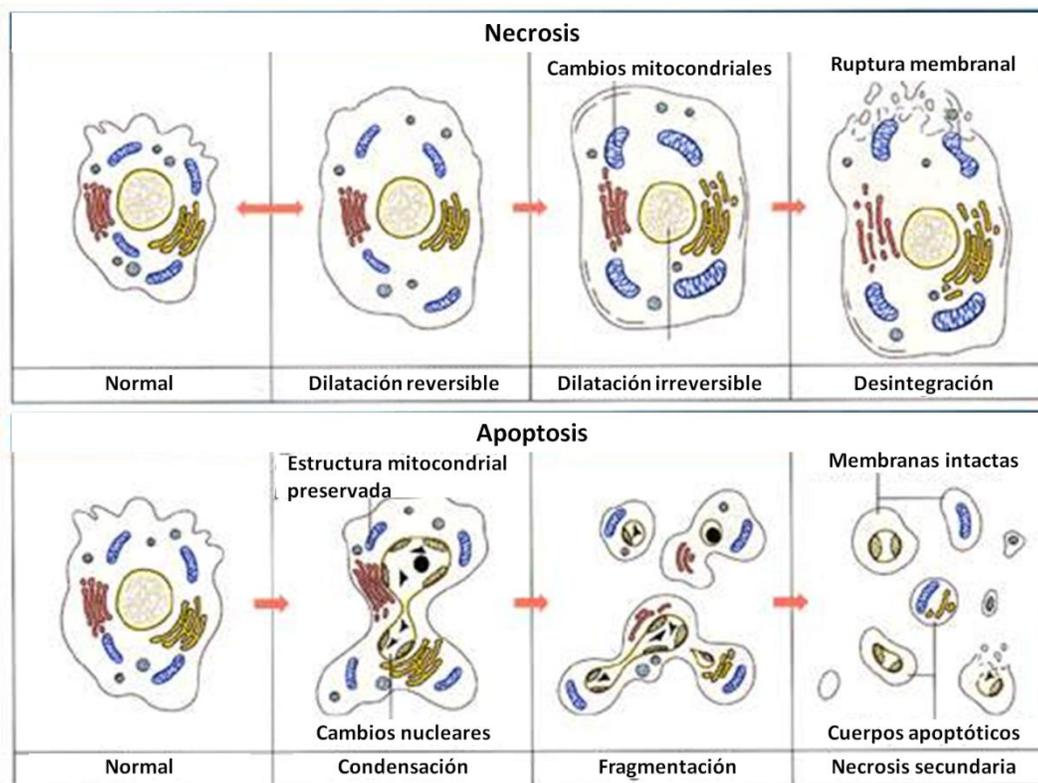


Figura 5. Características morfológicas de la muerte celular por necrosis y apoptosis (<http://retina.umh.es/temas/apoptosis/apoptosis.html>).

Las características morfológicas de la necrosis son muy distintas a las de la apoptosis. Las células apoptóticas muestran compactación nuclear, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, vesiculación de la membrana celular y desintegración de la célula en múltiples vesículas y los restos

celulares son fagocitados por las células cercanas (Kanduc *et al.*, 2002). Típicamente se produce un daño mínimo a las células vecinas, generalmente sin inflamación acompañante. En contraste, las células necróticas muestran tumefacción mitocondrial, dilatación del retículo endoplásmico y vacuolación del citoplasma. No hay vesiculación de la membrana celular, sino que las células tumefactas eventualmente se lisan (von Bernhardt, 2004). A medida que la célula muere, el citoplasma pierde definición y se pierde la tinción nuclear, llegando a la cariólisis. El contenido celular es liberado al espacio intercelular, dañando a las células vecinas y generando un proceso inflamatorio (Jordán, 2003).

2.3.2 Apoptosis

La apoptosis es la muerte celular programada caracterizada por una serie de alteraciones morfológicas y bioquímicas (Hengartner, 2000). Este proceso se caracteriza morfológicamente por el encogimiento celular, la condensación y migración de la cromatina nuclear, fragmentación del ADN, vacuolización del citoplasma y lisis celular (Kanduc *et al.*, 2002). Se le considera esencial para la morfogénesis, homeostasis de los tejidos y la defensa del organismo; juega un papel importante en la eliminación de células severamente dañadas o de células tumorales por agentes quimioprotectores (Yi *et al.*, 2006). La apoptosis es por tanto considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades (Jordán, 2003).

2.3.2.1 Características morfológicas

Los procesos apoptóticos se caracterizan por cambios morfológicos como:

Aumento brusco de la densidad intracelular. El retículo endoplasmático se dilata, formando vesículas y fusionándose con la membrana plasmática, eliminando así su contenido al medio extracelular. Esta rápida, pero selectiva salida de fluidos e iones intracelulares se encuentra mediada por transportadores iónicos (cotransportador cloro-potasio-sodio, que inhibe la pérdida de agua y sodio de las células afectadas) (Jordán, 2003).

Incremento moderado, pero sostenido, de la concentración de calcio libre citoplasmático (Ca^{+2}), diferencia clara frente a los procesos de necrosis, donde su aumento es drástico (Jordán, 2003).

Cambios en la composición de la membrana celular. Translocación de grupos glicanos a la superficie celular que van a actuar como señal de reconocimiento, permitiendo la unión de fagocitos y, de esta manera, evitando la liberación del contenido celular y la posible reacción de inflamación (Jordán, 2003).

Alteración en la conformación de elementos del citoesqueleto, como consecuencia aparece una deformación, resultado de la actividad de las proteasas, modificándose el transporte intracelular retrógrado de factores de crecimiento y de proteínas (Jordán, 2003).

Aumento y activación de la síntesis de determinadas proteínas necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular (Jordán, 2003).

Condensación y fragmentación de la cromatina, por acción de endonucleasas endógenas, en fragmentos denominados oligonucleosomas. Esta última característica morfológica se puede determinar mediante metodologías como la tinción TUNEL (Figura 6), basada en la capacidad que presentan los extremos del ADN hidrolizados por la endonucleasa a unirse a una cadena de nucleótidos dUTP. El uso de técnicas inmunológicas permite su identificación posterior (Jordán, 2003).

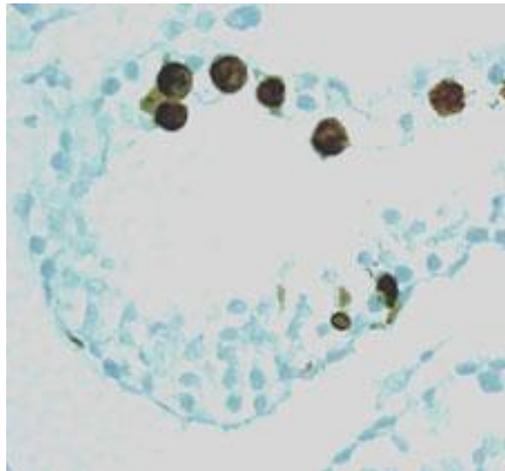


Figura 6. ADN fragmentado detectado por tinción TUNEL en células germinales de ratas (<http://www.brown.edu/Research/SRP/coreD.shtml>).

2.3.2.2 Activación de la apoptosis

La apoptosis se lleva a cabo en respuesta a señales externas, intracelulares y a interacciones con sustratos externos (Figura 7) (Avivi-Green *et al.*, 2000). La apoptosis por vía extrínseca incluye la activación de los receptores de la membrana celular, tales como Fas, TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1, por sus siglas en inglés), TRAIL-R1 (TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 1), TRAIL-R2, p75-NGFR (p75-Nerve Growth Factor Receptor) y otros (Wajant *et al.* 2003). Estos receptores de muerte tienen dos motivos de

señalización diferentes: el dominio de muerte (DD) y los dominios efectores de muerte (DED) que les permite interactuar con otras proteínas involucradas en la cascada apoptótica (Hengartner, 2000). Normalmente, la vía extrínseca involucra la activación de la caspasa iniciadora (caspasa-8) que a su vez, puede activar a la caspasa-3, o bien fragmentar al miembro de la familia Bcl-2, Bid, lo que conduce a la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa-9 (Hengartner, 2000).

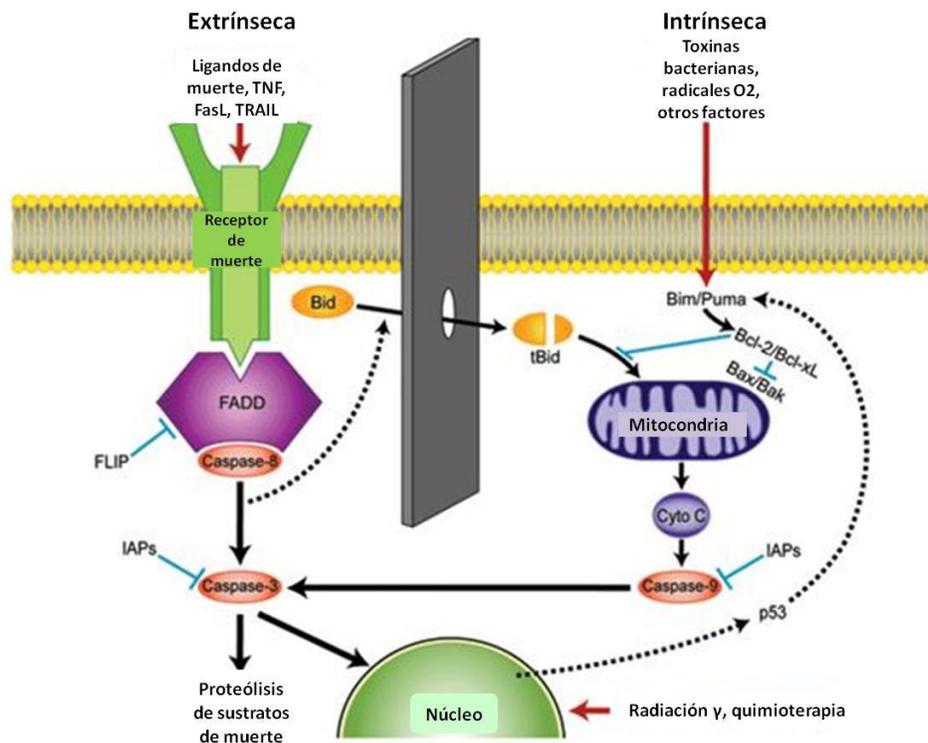


Figura 7. Mecanismos de la apoptosis por vía intrínseca y la vía extrínseca (<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v6n1/coto.html>).

2.3.2.3 La vía extrínseca

Una de las cascadas de señalización inducida de manera extrínseca se lleva a cabo en la superficie de la célula y por la agregación de los receptores Fas y su unión al ligando multivalente FasL. Esta unión trae los dominios citoplasmáticos de los receptores de membrana a una proximidad que permite

inducir un cambio conformacional que ayuda la formación de un complejo de señalización, el complejo de señalización inductor de muerte (DISC, por sus siglas en inglés) en el extremo citoplasmático de los receptores. El DISC comprende a los receptores y ligandos, así como una proteína adaptadora FADD (Fas associated death domain), la cual se une a través de su DD C-terminal al receptor unido al ligando y recluta a la procaspasa-8. Esta última, a su vez se une al DED o FADD vía sus dominios DED N-terminal. Como consecuencia de la formación del DISC en los receptores unidos al ligando, varias moléculas de la procaspasa-8 son atraídas, resultando en una alta concentración local de éstas. La activación inducida por proximidad también se ha propuesto para la caspasa-2 (Hengartner, 2000). Sin embargo, otros estudios han sugerido que la activación de la caspasa-8 requiere de la dimerización (Boatright *et al.*, 2003). En algunas células, la caspasa-8 conduce a una amplificación que involucra la ruptura del miembro de la familia Bcl-2, Bid. Cuando Bid es fragmentado puede inducir la liberación mitocondrial del citocromo C mediado por Bax, llevando a la célula a un destino apoptótico (Ruefli *et al.*, 2001).

Otra mecanismo que sigue la muerte extrínseca es el de la citocina proinflamatoria, el factor de necrosis tumoral (TNF), el cual se secreta principalmente por células del sistema inmune, tales como los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK y linfocitos T. La síntesis del TNF- α se puede inducir por células tumorales. La respuesta de esta citocina depende directamente de la unión a sus receptores. Cuenta con dos receptores (TNF-R1 y TNF-R2). Aunque ambos median en forma cooperativa o independiente un amplio rango de respuestas celulares como la proliferación, diferenciación, citotoxicidad y apoptosis celular, la distribución del TNF-R1 es mucho más amplia que la del TNF-R2, su expresión es generalmente constitutiva y su unión al TNF es irreversible (Anaya, 2003).

El TNF- α ejerce su efecto en las células por la unión a sus receptores de la membrana celular (TNF-R1), cuyos dominios intracelulares se unen a proteínas de interacción con receptores (RIP), que con la ayuda de las proteínas de dominio de muerte asociadas al receptor TNF-R1 (TRADD) pueden generar una bifurcación en las vías de acción mediante el reclutamiento de moléculas de señalización, bien sea hacia apoptosis por la interacción con FADD y activación de la caspasa 8 (Hsu *et al.*, 1996), o hacia la vía de señales proinflamatorias por medio de la interacción con TRAF2, lo que conduce a la activación del factor NF κ B (Jordán, 2003). En resumen, la función principal del TNF-R1 es la de interactuar con la forma soluble de 17 kD del TNF- α y regular los procesos proinflamatorios y apoptóticos de esta citocina.

Por otra parte, TRAIL (también conocido como Apo2L) es otro miembro de la familia del ligando TNF que puede inducir una rápida apoptosis dependiente de caspasas en células transformadas y ha sido estudiado como potencial agente anticáncer (Tang *et al.*, 2002). TRAIL activa a DR-4 (DR-4/TRAIL-R1) y a DR-5 (DR-5/TRAIL-R2). La activación de DR-4 y DR-5 resulta en el reclutamiento intracelular de FADD, lo que a su vez activa a la caspasa 8 y 10 (Bodmer *et al.*, 2000). Estas caspasas iniciadoras traen como consecuencia efectos río abajo, como la activación de las caspasas efectoras 3, 6 y 7, induciendo, por lo tanto, la apoptosis (Griffith *et al.*, 1998).

2.3.2.4 La vía intrínseca

La vía mitocondrial alternativa (vía intrínseca) puede activarse por la vía de los receptores de muerte, o por otros estímulos que son independientes de los receptores de muerte, incluyendo el daño al ADN, la inhibición de la topoisomerasa o el retiro de factores tróficos (Parone *et al.*, 2003). Se ha demostrado un papel central de la mitocondria en la regulación de la apoptosis

inducida químicamente, por lo que entender el mecanismo de la apoptosis por parte de compuestos bioactivos tiene implicaciones importantes en la prevención y el tratamiento de muchas enfermedades (Chen *et al.*, 2007).

Esta vía involucra a los miembros de la familia Bcl-2 que regula la liberación del Citocromo C por despolarización de la mitocondria al citoplasma, donde junto con APAF-1 (apoptotic protease-activating factor 1) y la procaspasa 9 forma un complejo proteico llamado Apoptosoma. La caspasa 9 es procesada y activada cuando forma parte del apoptosoma, que a su vez promueve la activación de la caspasa 3, caspasa 6 y la caspasa 7 (Nicholson and Thornberry, 2003).

La vía intrínseca es dominada por las proteínas de la familia Bcl-2, las cuales gobiernan la liberación del citocromo C de la mitocondria (Cory y Adams, 2002). La familia Bcl-2 comprende miembros anti apoptóticos y pro apoptóticos. Los miembros de dicha familia se clasifican en base a su similitud estructural a los dominios homólogos Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 and BH4) y a su dominio transmembrana. El dominio BH3, el cual está presente en todos los miembros y es esencial para la heterodimerización entre miembros, es un dominio mínimo requerido para la función pro-apoptótica (Haupt *et al.*, 2003). La familia Bcl-2 se divide en tres clases: proteínas pro-sobrevivencia, cuyos miembros son estructuralmente mas similares a Bcl-2, tales como Bcl-XL, proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak, las cuales son estructuralmente similares a Bcl-2 y Bcl-XL y antagonizan sus funciones pro-sobrevivencia y las proteínas pro-apoptóticas que solamente tienen dominios BH3. También se incluye un subconjunto clave de los genes de la familia Bcl-2, tales como Bax, Noxa, PUMA y Bid (Haupt *et al.*, 2003).

En respuesta a la activación por estrés, Bax forma un homodímero y libera el Citocromo C de la mitocondria el cual resulta en la activación de la caspasa 9. Sin embargo, la apoptosis en el epitelio colónico en respuesta a la radiación gamma parece no ser esencial (Haupt *et al.*, 2003). Además, se ha

demostrado que la apoptosis intrínseca por activación de p53 no es fundamental en algunos tipos celulares, como los timocitos (MacLachlan y el-Deiry, 2002).

Por otro lado, la proteína pro-apoptótica Bid se distingue por su habilidad única de conectar la activación de la apoptosis extrínseca por receptores de muerte con la vía mitocondrial o intrínseca. La activación de Bid involucra su fragmentación en el citoplasma por acción de la caspasa 8. El Bid se transloca a la mitocondria, se inserta en la membrana y activa a Bax o Bak para iniciar los eventos mitocondriales que conducen a la formación del apoptosoma y, por lo tanto, la activación de la caspasa 3 para finalmente inducir la muerte apoptótica (Haupt *et al.*, 2003).

2.4 Reparación del ADN

Los genes de reconocimiento y reparación de daños al ADN constituyen un subconjunto de la clase gen supresor de tumores, ya que se ven afectados por inactivación de las mutaciones en el cáncer. Mientras que los genes supresores de tumores tales como RB1, p53, APC, e INK4 (p16) parecen tener un papel activo en la regulación del crecimiento celular y/o apoptosis, podría decirse que el reconocimiento de daños en el ADN y los genes de reparación tiene un papel más pasivo en los procesos de control del crecimiento. Sin embargo, existe una base razonable para sugerir que las mutaciones (pérdida de la función) en ambos alelos de ciertos genes de reparación del ADN y, por lo tanto, la falta de la reparación correcta de este ácido nucleico probablemente contribuye al cáncer a través de una mayor frecuencia de mutaciones en diversos genes, en particular aquellos que son determinantes en la velocidad del desarrollo tumoral. En este sentido, enfermedades como el cáncer colorrectal hereditario no poliposo (HNPCC, por sus siglas en inglés) es responsable de aproximadamente el 2-4% de casos de cáncer colorrectal en el mundo occidental. Se han identificado varios genes responsables del HNPCC, entre los que se encuentra el MSH2 (en el cromosoma 2p) y MLH1

(en el cromosoma 3p). En conjunto, las mutaciones de línea germinal en los genes MSH2 y MLH1 cuentan para prácticamente todos los casos clásicos de HNPCC. Las proteínas codificadas por los genes MSH2 y MLH1 parecen tener un papel fundamental en el reconocimiento y la reparación de los desajustes en el ADN (Park y Vogelstein, 2003).

A pesar de los avances realizados en el tratamiento quirúrgico y médico del CCR, sólo se ha conseguido una mejoría modesta en la sobrevivencia de los pacientes a los que se diagnostica la enfermedad en un estadio avanzado, de modo que es deseable desarrollar estrategias eficaces de prevención que permitan reducir la morbilidad y mortalidad debido al CCR. Se ha identificado numerosos factores de riesgo con una clara relación con un mayor riesgo de CCR, como la edad. El riesgo de padecer esta enfermedad empieza a incrementarse a partir de los 40 años, y aumenta especialmente entre los 50 y los 55 años, duplicándose en cada década posterior, así como la dieta con elevado contenido en grasas y proteínas, especialmente a partir de productos cárnicos; rica en calorías y baja en fibra (Lewis, 2000; National Cancer Institute, 2003). Por ello se ha propuesto algunos factores protectores como la suplementación de la dieta con vitaminas, antioxidantes (Jänne y Mayer, 2000) y el consumo de alimentos ricos en fibra (por ejemplo, el frijol común) cuya fermentación en el colon produce compuestos, entre otros, los AGCC y con ello reducir el riesgo del desarrollo y progresión del cáncer de colon.

2.5 Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

2.5.1 Generalidades

El frijol común *Phaseolus vulgaris* pertenece a la familia de las leguminosas o fabáceas. La planta puede llegar a medir de 50 a 70 cm de altura, cuenta con raíces bien desarrolladas y una principal pivotante, tallos delgados y débiles, cuadrangulares. Sus semillas son reniformes oblongas a ovals o redondeadas, poco comprimidas, color rojo, amarillo, café o negro. La temperatura ideal para el desarrollo de este cultivo oscila entre 10°C y 27°C, la planta es muy susceptible a condiciones extremas; exceso o falta de humedad, por tal razón debe sembrarse en suelos de textura ligera y bien drenado. Existe 70 variedades de frijol que se distribuyen en 7 grupos: negros, amarillos, blancos, morados, bayos, pintos, moteados (SIAP, 2010).

Esta leguminosa se ha cultivado desde hace aproximadamente 8 mil años, desarrollándose durante ese tiempo una diversidad de tipos y calidades de frijoles (SAGARPA, 2003). Es una planta originaria de Mesoamérica (que incluye México) y ha formado parte de la cultura gastronómica desde tiempos prehispánicos (Castillo *et al.*, 2006). Además, México es uno de los cinco principales países productores y el principal centro de origen y domesticación, por lo que es posible encontrar frijol silvestre, enmalezado y criollo, lo que hace del territorio una gran fuente de diversidad genética (Paredes-López y Valverde, 2006).

En México, las seis principales clases comerciales de frijol de alta demanda son: Negro, Azufrado, Bayo, Pinto, Flor de Mayo y Flor de Junio. El frijol Negro es la clase comercial con mayor demanda en el Distrito Federal y el sur del país (Castellanos *et al.*, 1997). Por otro lado, las variedades claras se consumen principalmente en las regiones del norte y noroeste del país, como la Mayocoba, Flor de mayo, Pinto y Bayo (SAGARPA, 2000).

La composición química de la semilla del frijol se relaciona directamente con su valor nutrimental (Jacinto *et al.*, 2002). Sin embargo, es deficiente en los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y triptófano (Carbonaro *et al.*, 2000). Contiene aproximadamente 20.3-29 % de proteínas, 1.6-3.3 % de grasa, 24 % de almidón resistente, 36-42 % fibra dietética total, de la cual 0-3.2 % corresponde a la fibra soluble y 36-39 % a la fibra insoluble. (Reyes-Moreno y Paredes-López, 1993., Bednar *et al.*, 2001., Osorio-Díaz *et al.*, 2003).

Se calcula que el consumo *per cápita* del frijol es de aproximadamente 15 Kg por año (Castellanos, *et al.*, 1997). Sin embargo éste ha disminuido en los últimos años, registrándose una disminución del 6.4% al pasar de 1.07 millones de toneladas en 2007 a 1.00 millón de toneladas en 2008. Para el cierre de 2009 el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) estima una disminución del consumo de esta leguminosa de 0.09% (Financiera Rural, 2009).

En términos generales, el consumo *per cápita* del frijol en México ha mantenido una tasa de crecimiento anual decreciente desde la década de los ochenta. Se cree que este declive se debe a la concentración y crecimiento de la población urbana que suele modificar sus hábitos alimenticios al adquirir mayores ingresos (Romero, 1993). Además, la dieta de la población ha sufrido un cambio radical al adquirir un mayor consumo de harinas refinadas, azúcares simples, bebidas carbonatadas y la comida rápida de venta en las cercanías de la comunidad. Lo cual ha conducido a la aparición de casos de enfermedades crónico-degenerativas, tales como la obesidad, diabetes mellitus, hipertensión arterial, entre otras (Muñoz-Saldaña, 2010). Por lo que resulta necesario promover el consumo de esta leguminosa a través de la difusión de los beneficios que provee a la salud, a fin de que la población readquiera hábitos más saludables de alimentación.

El frijol común ha sido históricamente uno de los alimentos más importantes en México y, junto con el maíz, aporta casi la totalidad de las proteínas vegetales que consume la mayoría de la población, por lo cual ocupa un lugar de suma importancia en la dieta básica de los mexicanos (Pérez-Herrera *et al.*, 2002). También es una excelente fuente de compuestos nutraceuticos como la fibra, los inhibidores de la proteasa, ácido fítico y polifenoles como los taninos (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1999). El color de la testa del frijol se atribuye a la presencia y cantidad de polifenoles, como los glucósidos de flavonoles, taninos condensados y antocianinas (Beninger y Hosfield, 1999; Romani *et al.*, 2004; Salinas-Moreno *et al.*, 2005), y su función es proteger las semillas contra los patógenos y los depredadores (Islam *et al.*, 2003). Estos compuestos tienen propiedades actividades antioxidante, anti-mutagénica y anticarcinogénica, así como propiedades de acarreamiento de radicales libres (González de Mejía *et al.*, 1999; Cardador-Martinez *et al.*, 2002b; Beninger y Hosfield, 2003; Veeriah *et al.*, 2006; Theodoratou *et al.*, 2007; Bobe *et al.*, 2008; Bernhaus *et al.*, 2009).

2.5.2 Compuestos con propiedades biológicas

Los alimentos proporcionan no sólo nutrimentos esenciales necesarios para la vida, sino también otros compuestos bioactivos para la promoción de la salud y prevención de enfermedades (Liu, 2003). Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo regular de frutas, verduras, granos enteros y otros alimentos vegetales se asocia con un menor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como la obesidad, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Bazzano *et al.*, 2001; Willet, 2002; Park *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2005, Divisi *et al.*, 2006; Dahm *et al.*, 2010).

Se ha sugerido que los fitoquímicos (compuestos bioactivos de plantas no nutritivos) presentes en frutas, hortalizas, granos y otros alimentos vegetales, son responsables de su actividad biológica vinculada a la reducción del riesgo de las principales enfermedades crónicas (Willet, 2002, Liu, 2003, Liu, 2004). Estos compuestos pueden tener mecanismos de acción complementarios, incluyendo la modulación de las enzimas de desintoxicación, la estimulación del sistema inmune, la reducción de la agregación plaquetaria, la modulación de lípidos y metabolismo de las hormonas, efectos antioxidante, antibacteriano, antimutagénico, antiangiogénico, la reducción de la iniciación de tumores y la promoción e inducción de apoptosis (Lampe, 1999).

El Fondo Mundial para la Investigación en Cáncer (WCRF, por sus siglas en inglés) / Instituto Americano para la Investigación en Cáncer (AACR, por sus siglas en inglés) reconocen la importancia biológica de las leguminosas en la prevención del cáncer, y recomiendan dar prioridad a estudios en que se determine esta relación (Rodríguez y Fernández, 2003). Los compuestos responsables de este efecto incluyen las saponinas (Kerwin, 2004; Shi *et al.*, 2004); monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos (Pierre *et al.*, 1997), y los componentes fenólicos como el ácido ferúlico (Kawabata, *et al.*, 2000; Jayaprakasam, *et al.*, 2006), ácido p-cumárico (Janicke *et al.*, 2005), kaempferol (Mutoh *et al.*, 2000), el fitato (Vucenik y Shamsuddin, 2003), y en concentraciones más pequeñas, las catequinas (Franke *et al.*, 2002), antocianidinas (Cooke *et al.*, 2006), y las isoflavonas (Bises *et al.*, 2007).

Asimismo, se ha reportado la presencia de las proantocianidinas (el grupo de flavonoides más ampliamente distribuido) en variedades de frijol negro y azul-violeta, principalmente en la testa del grano y sus extractos fenólicos tienen actividad antioxidante y antimutagénica (Cardador-Martínez *et al.*, 2002a,b; Beninger y Hosfield, 2003; Aparicio-Fernández *et al.*, 2005).

Otros fitoquímicos del frijol negro (incluyendo los flavonoides y taninos), tales como el ácido fítico, triterpenos y fitoesteroles, pueden ser responsables de la actividad anticancerígena de esta leguminosa. Se ha demostrado que los almidones resistentes y polisacáridos del frijol (Pool-Zobel, 2005; Bauer *et al.*, 2006) pueden prevenir el cáncer ya sea solos o en combinación, y de manera directa a través de sus funciones quimioprotectoras o indirecta por sus metabolitos y los cambios en la microflora y el pH del colon (Serrano y Goñi, 2004). Los oligosacáridos como la rafinosa, estaquiosa y verbascosa son compuestos responsables de la flatulencia y a menudo se consideran los factores que limitan el consumo del frijol (Iniestra *et al.*, 2005). Sin embargo, pueden ejercer efectos benéficos al reducir el colesterol (Bourdon *et al.*, 2001), la presión sanguínea (Kabagambe *et al.*, 2005) y prevenir el cáncer (Hangen y Bennink, 2002, Lanza *et al.*, 2006).

2.5.3 Fibra dietética

Los polisacáridos de los alimentos se pueden dividir en dos grupos: digeribles y no digeribles. Los polisacáridos digeribles son hidrolizados por las enzimas digestivas y se metabolizan después de la hidrólisis enzimática. Los polisacáridos no digeribles no son ni hidrolizados ni absorbidos en el intestino delgado, y son los principales componentes de la fibra dietética (FD) (Díaz-Rubio y Saura-Calixto, 2007).

La American Association of Cereal Chemist (2001) define: “la fibra dietética es la parte comestible de las plantas o hidratos de carbono análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso. Incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias asociadas de la planta. Las fibras dietéticas promueven efectos fisiológicos benéficos como laxante, y/o atenúa los niveles de colesterol en sangre y/o atenúa la glucosa en sangre”. Aunque también se incluye otros

carbohidratos absorbibles como el almidón resistente, la inulina, diversos oligosacáridos y disacáridos como la lactulosa. Se podría definir a la fibra total como la suma de fibra dietética más fibra funcional (Escudero y González, 2006), que además incrementar el volumen fecal (Baghurst *et al.*, 1996), también puede modular el metabolismo de sustancias cancerígenas y acarrea intermediarios reactivos (Ryden y Robertson, 1995; Kestell *et al.*, 1999) a través del aumento en la generación de ácido butírico por acción de la flora intestinal (Cummings y Macfarlane, 1991).

Las fibras insolubles o poco solubles son capaces de retener el agua en su matriz estructural formando mezclas de baja viscosidad; esto produce un aumento de la masa fecal que acelera el tránsito intestinal, por lo cual dicha fibra suele utilizarse en el tratamiento y prevención del estreñimiento crónico, además de contribuir en la disminución de la concentración y el tiempo de contacto de carcinógenos potenciales con la mucosa del colon (Escudero y González, 2006).

Las fibras solubles en contacto con el agua forman un retículo donde queda atrapada el agua, gelificándose la muestra y originándose de esta manera soluciones de gran viscosidad. Los efectos derivados de tal viscosidad son los responsables de sus acciones sobre el metabolismo lipídico, de la glucosa y en parte su potencial anticarcinogénico (Escudero y González, 2006).

Principalmente los polisacáridos viscosos disminuyen el colesterol en humanos, lo que contribuye a la reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular asociado con dietas altas en alimentos ricos en fibra (Brown *et al.*, 1999; Schneeman, 1999). Hay varios mecanismos que son responsables del efecto hipocolesterolémico de los polisacáridos viscosos, estos incluyen el aumento de la excreción fecal de ácidos biliares y esteroides, así como la alteración de la absorción intestinal de lípidos y la producción de ácidos grasos de cadena corta (Schneeman, 1998). Varios estudios han asociado la reducción del colesterol por el consumo del frijol a su contenido en polisacáridos viscosos, sin

embargo, las proteínas también pueden contribuir a dicha respuesta (Costa *et al.*, 1994; Dabai *et al.*, 1996; Shutler *et al.*, 1989; Bourdon *et al.*, 2001).

También se ha demostrado el papel de la fibra dietética en la disminución del peso corporal. Esto puede suceder por la intervención de sustancias bloqueadoras del almidón, los cuales promueven la pérdida de peso a través del impedimento y/o disminución de la degradación de los carbohidratos complejos, lo que reduce la disponibilidad de las calorías derivadas de los carbohidratos (Gibbs y Alli, 1998; Santimone *et al.*, 2004; Udani *et al.*, 2004). Asimismo, se ha demostrado que el consumo de carbohidratos del frijol pueden disminuir el peso corporal, sugiriendo la posible participación de los almidones resistentes como un papel importante en la pérdida de peso corporal (Higgins *et al.*, 2004; Celleno *et al.*, 2007).

El almidón resistente (RS) se define como la suma del almidón además de productos de degradación del almidón no se absorbe en el intestino delgado de individuos monogástricos sanos (Asp, 1992). La clasificación de RS ha sido propuesta por Englyst y colaboradores (1992), y se basa tanto en la naturaleza del almidón y de su entorno en los alimentos. El RS1 corresponde a los almidones físicamente inaccesible, atrapado en una matriz celular, como en las semillas de leguminosas. El RS2 son nativos de gránulos crudos de almidón, tales como almidón de papa cruda o plátano, cuya cristalinidad los hace poco susceptibles a la hidrólisis. Por último, el RS3 son los almidones retrogradados los cuales se forman en los alimentos cocinados que se mantienen a temperatura baja o ambiente.

Las leguminosas crudas y procesadas, contienen cantidades significativas de RS en comparación con los cereales, tubérculos y frutas inmaduras (Jenkins *et al.*, 1982; Tovar *et al.*, 1992a,b; Tovar y Melito, 1996; Velasco *et al.*, 1997, Bravo *et al.*, 1998, 1999). Esto explica, al menos en parte, que la velocidad de digestión del almidón sea lenta, por lo tanto, que la liberación de glucosa en el torrente

sanguíneo después de la ingestión de leguminosas sea más lenta, lo que reduce la glucemia y la respuesta postprandial insulinémicos en comparación con los granos de cereales o papas (Jenkins *et al.*, 1982; Tovar *et al.*, 1992a, b), aunque también se le ha reconoce como un sustrato favorable para la producción de ácidos grasos de cadena corta, lo que a su vez se les relaciona con la inhibición del desarrollo de cáncer de colon (Wisker *et al.*, 2000; Emenaker y Basson, 2001; Topping y Clifton, 2001; Waldecker *et al.*, 2008).

Además del almidón, las leguminosas contienen altas cantidades de fibra dietética de tal forma que le da a las paredes celulares alta resistencia a la desintegración durante la cocción (Würsch *et al.*, 1986; Tovar *et al.*, 1992b; Melito y Tovar, 1995). Esto, junto con la presencia de ciertos factores antinutricios, podría explicar la relativamente baja digestibilidad del almidón en leguminosas. Otros de los componentes de la fibra dietética soluble son los oligosacáridos (resistentes a la digestión). Éstos pueden definirse como carbohidratos con un nivel de polimerización menor que los polisacáridos, tienen de 3 a 10 moléculas de monosacárido (Mateu de Antonio, 2004). Dependiendo del azúcar base para su composición, se distinguen principalmente:

- Fructooligosacáridos (FOS) o fructanos. Formados por moléculas de fructosa. Existen dos tipos: levanos e inulinas. Los primeros son producidos por bacterias y los segundos están presentes en las frutas y verduras. Estrictamente hablando, la inulina no sería un oligosacárido ya que contiene más de 10 monómeros, pero actúa biológicamente de manera muy similar al resto de FOS. La inulina se encuentra en la achicoria, la cebolla y la aguaturna, y los FOS en muchas frutas (Mateu de Antonio, 2004).
- Galactooligosacáridos (GOS) u oligosacáridos de la serie de la rafinosa (RSO). Formados por moléculas de galactosa, los más frecuentes en el mundo vegetal son la rafinosa, la estaquiosa y la verbascosa, de tres,

cuatro y cinco galactosas, respectivamente. Están mayoritariamente presentes en las leguminosas (Mateu de Antonio, 2004).

- Xilooligosacáridos (XOS). Oligosacáridos con base de xilosa. Se presentan en frutas y verduras, pero también en la miel y la leche (Mateu de Antonio, 2004).
- Isomaltosooligosacáridos (IMOS). Se presentan en la salsa de soya, el sake y la miel. Sólo una pequeña parte llega a colon, mientras que el resto es digerido (Mateu de Antonio, 2004).

2.6 Fermentación bacteriana y producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

La fibra dietética que ingresa al intestino grueso es un sustrato para la microbiota colonica. Bacteriológicamente, el intestino grueso es un ecosistema extremadamente complejo, el cual contiene más de 400 diferentes especies de bacterias. Durante la fermentación, la masa bacteriana incrementa y consecuentemente el volumen fecal. La parte no fermentable de la fibra dietética también se añade a la materia fecal. Un incremento en las heces resulta en un tiempo de tránsito más corto y previene la constipación. Las partículas grandes de las paredes celulares de las plantas tienen un mayor efecto sobre el peso de las heces y en una mayor salida de agua fecal en comparación con las partículas menores. La densidad de la población microbiana en el intestino grueso es de 10^{11} - 10^{12} células por gramo de heces. El contenido colónico es, en promedio de 220 g, de los cuales las bacterias constituyen el 40-55 % en las personas con dietas occidentales. La fermentación por la microbiota resulta en la formación de un número de productos finales que influyen la fisiología y metabolismo del intestino grueso. Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos durante

la fermentación reducen el pH y alteran el balance de la microbiota en el colon (Karppinen, 2003).

La mayor parte de las bacterias intestinales son sacarolíticas, es decir, utilizan carbohidratos complejos como principal fuente energética, originando como principales productos finales AGCC, gases y un incremento de la masa bacteriana (Figura 8). El género *Bifidobacterium* es el mayoritario. Su población supone el 25% del total de la flora en el adulto y el 95% en el recién nacido. Una de las áreas más prometedoras para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales se centra en la capacidad de algunos ingredientes alimentarios (probióticos, prebióticos y simbióticos) para incrementar el porcentaje de Bifidobacterias y tratar de conseguir así un sistema gastrointestinal más saludable (Saura-Calixto *et al.*, 2003). Las bacterias pueden desarrollar una gran variedad de actividades enzimáticas, muchas de ellas implicadas en la generación de toxinas, mutágenos, carcinógenos y promotores tumorales (Szylił y Andrieux, 1993). Es interesante destacar la capacidad de adaptación de la flora al tipo de sustrato presente en el medio, ya que éste determina la formación de los enzimas bacterianos adecuados para su degradación (Goñi y Gudiel-Urbano, 2001; Gudiel-Urbano y Goñi, 2002). Por ello, la dieta puede modificar la composición de la microflora, afectando no sólo al recuento total de bacterias, sino también a los géneros y especies predominantes. Estos cambios influyen en el tipo y cantidad de productos originados en el metabolismo bacteriano y, por tanto, repercuten en los efectos sobre la salud del huésped (Saura-Calixto *et al.*, 2003).

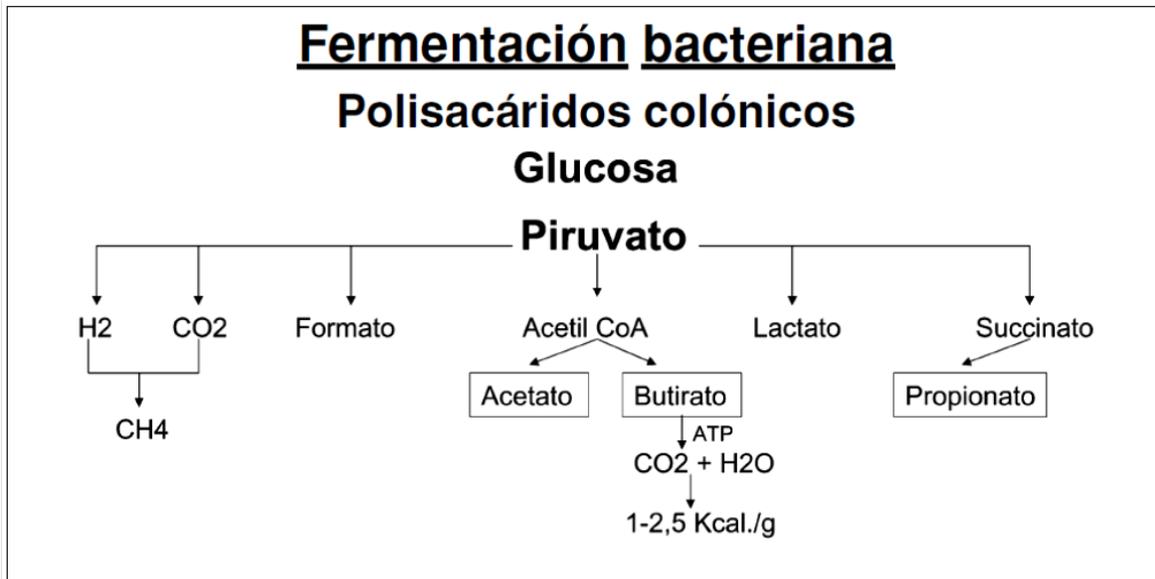


Figura 8. Fermentación bacteriana de la fibra (García-Peris, 2002).

Todos aquellos compuestos que llegan al colon son substratos potenciales de fermentación. En su mayor parte son componentes de la dieta (almidón, fibra, proteínas, lípidos, polifenoles, oligosacáridos, etc.), aunque una proporción considerable tiene procedencia endógena (mucina, células epiteliales, enzimas, etc.) (Saura-Calixto *et al.*, 2003).

Los substratos se pueden clasificar de acuerdo a (Saura-Calixto *et al.*, 2003):

1. Grado de fermentabilidad (no fermentable, parcial y completamente fermentable)
2. Velocidad de fermentación (rápido, intermedio y lento)
3. Cantidad total y proporciones de los AGCC producidos (acetato, propionato y butirato).

2.6.1 Fermentación colónica de la fibra dietética

La mayor fracción de carbohidratos indigeribles que llega al colon está constituida por almidón resistente a la digestión en el intestino delgado (Asp *et al.*, 1996) y fibra dietética, principalmente la fracción soluble (Saura-Calixto *et al.*, 2003). Su fermentación está determinada por sus propiedades fisicoquímicas grado de lignificación de la pared celular, solubilidad en agua, tamaño de partícula y presencia de otros componentes vegetales capaces de inhibir la actividad bacteriana (Saura-Calixto *et al.*, 2003).

La fermentación de la fibra en el colon es un proceso fundamental en el colon, ya que gracias a él se produce el mantenimiento y el desarrollo de la flora bacteriana, así como de las células epiteliales. Como resultado de esta fermentación bacteriana se produce ATP, gases (dióxido de carbono, hidrógeno y metano), agua, pequeñas proporciones de otros ácidos orgánicos (isobutírico, valérico, isovalérico, láctico y succínico). Además, se incrementa el número total de bacterias y se producen los ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico) en una proporción molar casi constante 60:25:20 (Titgemeyer *et al.*, 1991), aunque también se ha demostrado que la concentración molar relativa y absoluta de los AGCC producidos durante la fermentación son muy diferentes para cada tipo de fibra, proporcionando así una explicación de por qué las diferentes fibras tienen diferentes impactos en el intestino (Ferguson *et al.*, 2001).

Los AGCC se generan en el metabolismo del piruvato producido por la oxidación de la glucosa a través de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof (Figura 8) (Wolin y Miller, 1983). Existen dos vías para la metabolización del piruvato: en una de ellas se genera propionato, a través del succinato, en la otra vía se convierte el piruvato en acetil-CoA que posteriormente es hidrolizado para formar acetato o reducido para producir butirato (García-Peris *et al.*, 2002). Estos compuestos tienen efectos fisiológicos, como la disminución del pH intestinal y ejercen un efecto vasodilatador, por lo que se incrementa la absorción de agua y

sales en el intestino grueso. Los AGCC también constituyen estímulos químicos de la motilidad intestinal, que junto con los estímulos mecánicos producidos por el incremento de gases y la masa bacteriana, aumentan la velocidad de tránsito (Saura-Calixto *et al.*, 2003).

Los principales ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico) representan el sustrato energético fundamental del colonocito. Una vez que dichos AGCC se han absorbido son metabolizados por el epitelio colónico. Diversos estudios han demostrado que el orden de utilización de los mismos por el colonocito es butírico > acético > propiónico. La mayoría del ácido butírico (aproximadamente el 90%) y entre el 10 y el 50% del ácido propiónico es metabolizado por la mucosa colónica. El remanente del ácido propiónico y del acético alcanza el hígado (Wong *et al.*, 2006). El primero será posteriormente utilizado como sustrato para la gluconeogénesis y el ácido acético será metabolizado, dando lugar a glutamina y cuerpos cetónicos, acetoacetato y β -hidroxibutirato (Rombeau y Kriple, 1990).

A nivel sistémico, los AGCC regulan el metabolismo lipídico y de la glucosa. Anderson y Bridges (1984) evaluaron el efecto de los AGCC producidos a partir de la fermentación de la fibra sobre el metabolismo de la glucosa en hepatocitos aislados de ratas, observando una influencia significativa del ácido propiónico aumentando la utilización de la glucosa y disminuyendo su producción hepática. En cuanto al metabolismo lipídico, se ha demostrado que el propiónico disminuye la síntesis hepática de colesterol por inhibición de la actividad de la hidroximetilglutaril-coenzima A (Delzenne y Kolk, 2001). El efecto de cada uno de los 3 ácidos mayoritarios se puede resumir como se describe a continuación:

El ácido acético es utilizado mínimamente por los colonocitos, se absorbe y transporta al hígado, y tejidos periféricos. En el hígado es utilizado como un sustrato lipogénico y gluconeogénico en ausencia de un consumo adecuado de carbohidratos. En otros tejidos periféricos tales como tejido adiposo, glándula

mamaria, músculo, riñón y corazón, aportan energía y participan en la lipogénesis (Saura-Calixto *et al.*, 2003).

El ácido propiónico es utilizado parcialmente por los colonocitos, pero su principal órgano de metabolización es el hígado, donde parece estar implicado en la inhibición de la síntesis de colesterol. Se ha observado una relación inversa entre los niveles de propiónico y los valores plasmáticos de colesterol total y colesterol LDL (Saura-Calixto *et al.*, 2003).

El ácido butírico es la principal fuente de energía para los colonocitos y es activamente metabolizado a cuerpos cetónicos, dióxido de carbono y agua. Su presencia es fundamental para el crecimiento y proliferación de las células sanas del epitelio colónico y retarda o inhibe el crecimiento de algunas líneas celulares neoplásicas (Saura-Calixto *et al.*, 2003).

Este ácido graso es fisiológicamente relevante para el epitelio del colon, y sirve como principal fuente de energía. El incremento en el interés por su papel como agente quimioprotector ha surgido de sus efectos anti-proliferativos en cultivo de células *in vitro*, incluyendo las líneas de células tumorales de colon. También se ha demostrado que protege contra el daño genético inducido por peróxido de hidrógeno en células primarias del colon (Abrahamse *et al.*, 1999) y en líneas de células tumorales de colon (Rosignoli *et al.* 2001).

Un aspecto a destacar es cómo el ácido butírico también puede actuar como regulador de la expresión de genes implicados en la reducción de proliferación y promoción de la diferenciación del colonocito. Se ha demostrado que éste promueve el arresto del ciclo celular de células transformadas por medio de la inducción de la expresión del gen p21, así como la apoptosis mediante un incremento en la expresión de genes como la caspasa 3 e inhibición del bcl-2, (Ruemmele *et al.*, 2003). Además, también se le ha implicado en la inhibición de la inflamación de la mucosa intestinal (Inan *et al.*, 2000). En este sentido, se ha

propuesto que el ácido butírico (a partir de la fermentación de los polisacáridos) podría ejercer un mecanismo de defensa frente al cáncer de colon actuando como factor antitumorogénico (García-Peris *et al.*, 2002).

Sin embargo, se ha demostrado que los productos de la fermentación inhiben el crecimiento celular de manera más eficaz que las mezclas de AGCC, y que dichas mezclas son más activas que el butirato, probablemente debido a los fitoprotectores y al propionato, los cuales también inhiben el crecimiento celular. Por lo anterior, se puede concluir que la fermentación de fuentes de fibra dietética son los inhibidores más potentes de crecimiento de células tumorales que el butirato por sí solo (Beyer-Sehlmeyer *et al.*, 2003).

2.6.2 Fermentación colónica de compuestos fenólicos

Los sustratos cuantitativamente más importantes de la microflora del colon son los hidratos de carbono, tales como la fibra dietética, almidón resistente y oligosacáridos (Wong *et al.*, 2006). Sin embargo, pequeñas cantidades de proteína, grasa y compuestos fenólicos también llegan al colon (Kahle *et al.*, 2006), los cuales no se absorben en el intestino delgado debido a su alto peso molecular, por lo que también son susceptibles de fermentación por las bacterias colónicas, que los convierten a compuestos de peso molecular menor, como es el caso de algunos aromáticos (Déprez *et al.*, 2000).

La disminución del riesgo de presentar tumores de colon por el consumo de alimentos vegetales se ha demostrado en estudios epidemiológicos (Glade *et al.*, 1999). Esto se debe en parte, por la presencia de diversos fitoprotectores, incluyendo los flavonoides polifenólicos, que actúan inhibiendo el crecimiento de las células tumorales (Boyer y Liu, 2004) e induciendo la diferenciación, apoptosis, y mejorando las respuestas anti-inflamatorias en líneas celulares de cáncer colorrectal (Kawaii *et al.*, 1999; Wenzel *et al.*, 2000).

Déprez y colaboradores (2000) demostraron la degradación de polímeros de proantocianidinas después de 48 h de su fermentación *in vitro*, identificando metabolitos como el ácido fenilacético, fenilpropiónico y fenilvalérico, en su forma monohidroxilada, principalmente en la posición *meta* o *para*. Asimismo, Goñi y colaboradores (2005) demostraron que entre el 95-97 % del total de los polifenoles de la cáscara de uva son degradados por la microflora intestinal en cultivos *in vitro*.

Al estudiar el metabolismo de fenoles como la rutina a través de su fermentación *in vitro*, Rechner y colaboradores (2004) identificaron como productos finales al ácido 3-hidroxifenilacético y 3-(3-hidroxifenil)-propiónico. Cabe mencionar que el grado de degradación de estos compuestos se vio significativamente influenciado por la concentración de sustrato y por las variaciones individuales en la composición de la flora fecal. Respecto a esto, se ha demostrado que los polifenoles pueden modificar positivamente la composición de la microflora *in vitro* mediante el estímulo del crecimiento de algunas Bifidobacterias y la inhibición del crecimiento de algunos Clostridium (Ahn *et al.*, 1993).

Aunque el efecto quimioprotector de los ácidos grasos derivados de la fermentación es menos efectivo que los compuestos fenólicos de los que provienen, se ha observado que tienen efecto inhibitorio en la proliferación de células HT-29 (Veeriah *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha reportado que sus metabolitos como los ácidos p-cumárico, el 3-(4-OH-fenil)-propiónico, fenilbutírico y el fenilacético son inhibidores efectivos de la histona desacetilasa (HDAC) (Lea *et al.*, 1999; Waldecker *et al.*, 2008) contribuyendo asimismo a la inhibición de la proliferación de células transformadas.

Durante la fermentación también se pueden formar otros ácidos, tales como el láctico, ácido succínico, ácidos grasos de cadena ramificada y pequeñas cantidades de ácido valérico, caproico heptanoico cuyos efectos fisiológicos son

menos conocidos, sin embargo, la reducción del pH en el lumen puede representar un efecto benéfico *per sé* (Wong *et al.*, 2006).

2.7 Células HT-29 como sistema biológico de prueba

Los cultivos *in vitro* han sido ampliamente utilizados para evaluar el efecto y/o los mecanismos por los cuales una sustancia induce la diferenciación e inhibe la sobrevivencia y/o proliferación (Wächtershäuser *et al.*, 2001; Schröder *et al.*, 2005, Bermúdez *et al.*, 2007).

La capacidad de las células cultivadas para proliferar en forma indefinida o su tendencia a ser transformadas varía de acuerdo con la especie animal de donde proviene. Entre las células humanas, sólo las células tumorales proliferan de forma indefinida, tal es el caso de la línea celular HT-29 (Figura 9), la cual pertenece a un grupo de células epiteliales originalmente aisladas de adenocarcinoma de colon humano.

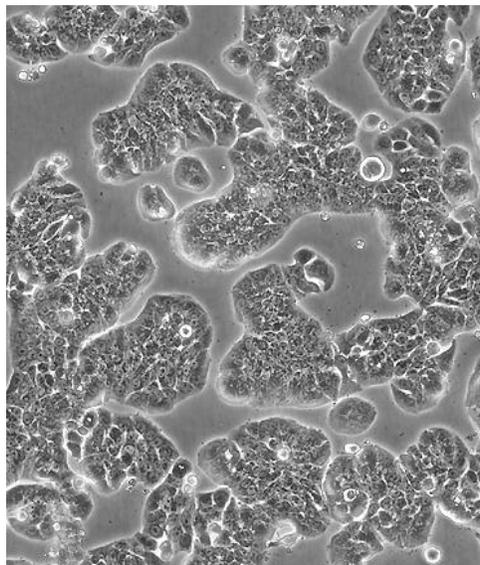


Figura 9. Cultivo *in vitro* de células HT-29 (www.atcc.org/Attachments/1986.jpg)

Esta línea celular se estableció en 1975 por Fogh y Trempe. Genéticamente, las células HT-29 presentan cambios característicos de los tumores colorrectales, tales como APC, DCC, K-ras y las mutaciones de p53 con la consiguiente pérdida de su función, así como la amplificación de c-myc (Rodrigues *et al.*, 1990; Brink *et al.*, 2003; Takayama *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010) y un fenotipo de inestabilidad cromosómica y aneuploidía. Esta línea celular se ha utilizado como modelo para investigar el mecanismo por el cual algunos compuestos protectores sensibilizan a estas células para controlar la proliferación e inducir la apoptosis (Beyer-Sehlmeyer *et al.*, 2003; Daly *et al.*, 2005; Campos-Vega *et al.*, 2010).

3 JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el cáncer constituye una de las principales causas de muerte en México, encontrándose dentro de este grupo el cáncer colorrectal (CCR). A pesar de que se han llevado a cabo diversos tipos de tratamiento, no se ha logrado obtener resultados óptimos en términos de salud pública. Es por ello que se debe buscar alternativas que permitan reducir la morbilidad y mortalidad a causa de esta enfermedad.

Una de las estrategias preventivas a seguir es una dieta adecuada a base de alimentos que aporten compuestos que puedan proveer beneficios a la salud. El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) contiene compuestos no digeribles con propiedades nutraceuticas, entre los que destacan los compuestos fenólicos, fibra (insoluble y soluble), lectinas, inhibidores de proteasas y la parte no digerible de los oligosacáridos. Por lo anterior, en los últimos años se ha despertado el interés de los investigadores por estudiar los efectos que estos agentes tienen en la salud a través de la prevención y/o quimioprotección contra enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, obesidad y el cáncer.

Estudios preliminares realizados por nuestro grupo de trabajo permitieron elegir entre tres variedades de frijol común (Negro 8025, Pinto Durango y Azufrado Higuera) al Negro 8025 por ser el que presentó mayor contenido de fibra dietética total (insoluble y soluble), lo que sugiere mayor contenido de sustrato fermentable. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del extracto de la fermentación *in vitro* de la fracción no digerible (EFFND) del frijol Negro 8025 sobre la sobrevivencia de las células transformadas de colon humano HT-29, así como proponer el mecanismo de acción ejercido por el EFFND mediante el empleo de herramientas moleculares que permitieran cuantificar la expresión de genes y involucradas en el cáncer de colon.

4 HIPÓTESIS

El extracto de la fermentación *in vitro* de la fracción no digerible (EFFND) del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido de la variedad Negro 8025 inhibe la sobrevivencia de las células HT-29 y modula la expresión de genes involucrados en el arresto del ciclo celular, proliferación, apoptosis y reparación del ADN.

5 OBJETIVOS

5.1 General:

Evaluar el efecto del extracto de la fermentación *in vitro* de la fracción no digerible (EFFND) del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido de la variedad Negro 8025 sobre la sobrevivencia de células de adenocarcinoma de colon humano HT-29.

5.2 Particulares:

1. Determinar la composición química (proximal, fibra dietética total, almidón resistente y taninos condensados) de la fracción no digerible (FND) del frijol de las variedades Negro 8025, Pinto Durango y Azufrado Higuera.
2. Caracterizar parcialmente el extracto de la fermentación *in vitro* de la fracción no digerible (EFFND) del frijol cocido variedad Negro 8025 (ácidos grasos de cadena corta, flavonoides, taninos condensados y proteínas totales).
3. Evaluar el efecto del EFFND sobre las células HT-29.
 - a. Curva dosis-respuesta
 - b. Determinar la concentración letal media (CL₅₀).
4. Identificar el mecanismo de acción del EFFND del frijol común sobre la sobrevivencia de las células HT-29.
 - a. Cuantificar el efecto citotóxico mediante la actividad de la enzima LDH.
 - b. Determinar el efecto apoptótico mediante la técnica de TUNEL.
 - c. Evaluar el efecto en la regulación de la expresión de genes relacionados con el arresto del ciclo celular, proliferación, apoptosis y reparación del ADN.

6 METODOLOGÍA

6.1 Materiales

6.1.1 Compuestos químicos

Los reactivos y solventes de uso general fueron de J. T. Baker. El medio de cultivo McCoy's 5A fue obtenido de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, EUA). Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (Gibco, Grand Island, NY). El HEPES fue obtenido de Promega. El suero fetal bovino (SFB), los antibióticos y antimicóticos fueron de la marca Gibco (Gibco, Grand Island, NY). Los reactivos para electroforesis se obtuvieron de BioRad y el kit para LDH de BioVison.

6.1.2 Material biológico

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedades: Pinto Durango, Negro 8025 y Azufrado Higuera, fueron donados por el INIFAP campo experimental Bajío.

La línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29 (p53 mutado) fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, EUA).

6.2 Métodos

6.2.1 Tratamiento térmico

El frijol se sometió a tratamiento térmico de acuerdo con el protocolo de Aparicio-Fernández *et al.*, (2005). Brevemente, se colocaron 50 g de frijol en 250 mL de agua destilada. La cocción se llevó a cabo por ~3 horas a 90 ± 1 °C. Con la muestra se formó un homogenizado el cual se liofilizó y almacenó a 4°C hasta su uso.

6.2.2 Extracción de la fracción no digerible (FND)

La fracción no digerible, considerada como las fracciones soluble e insoluble de la fibra dietética total (FDT), se obtuvo de acuerdo con el método 991.43 de la AOAC (2002), que consiste en una digestión enzimática a diferentes pH simulando la digestión en un individuo monogástrico. Por cada g de frijol previamente cocido, liofilizado y pulverizado, se adicionaron 50 mL de solución amortiguadora de fosfato 0.08 mM y se ajustó a pH 6 (con hidróxido de Na 0.275 N y/o HCl 0.375 N), seguido de 100 µL α -amilasa (0.1 mL) tapando el frasco y protegiéndolo de la luz. Se incubó en baño María a 95°C por 30 minutos, agitando cada 5 minutos, se atemperó y se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 0.275N. Posteriormente, se adicionaron 0.1 mL de proteasa (5 mg/mL) y se incubó en baño maría a 60°C por 30 minutos con agitación continua, la muestra se atemperó y se ajustó el pH a 4-4.6 con HCl. Se adicionaron 0.3 mL de amiloglucosidasa, se volvió a incubar en baño maría por 30 minutos a 60°C con agitación continua. Posteriormente se adicionó 95 mL de etanol en una proporción de 1:4 (muestra:etanol) y se dejó a temperatura ambiente por 24 horas. Las muestras se filtraron a peso constante y los residuos se lavaron 3 veces con 10 mL de agua destilada. Los residuos se colocaron en un horno a 90 °C por 2 horas y se pesaron. La FDT se determinó gravimétricamente y se consideró como el extracto

de la FND. Por último, la muestra se sometió al proceso de liofilización y se almacenó hasta su uso.

6.2.3 Análisis proximal

La determinación de fibra soluble e insoluble, cenizas, proteína, humedad y grasa se realizó siguiendo las metodologías descritas por la AOAC (2002).

6.2.3.1 Determinación de cenizas

Las cenizas de la muestra se determinaron siguiendo el método 945.46 descrito por la AOAC (2002). Se pesaron 2 g de muestra en un crisol de porcelana a peso constante. La muestra se calcinó durante 3 horas en una mufla precalentada a 550-600°C. Se enfrió el crisol en desecador y se pesó para por diferencia de pesos calcular el porcentaje de cenizas hasta la primera cifra decimal.

Cálculos:

$$[(W1 + M1) - (M2 - W1)] \times 100 = \% \text{ Cenizas.}$$

Donde:

W1 = Peso del crisol; M1 = Peso de la muestra; M2 = Peso de la muestra calcinada

6.2.3.2 Determinación de humedad

La humedad se determinó de acuerdo al método 925.23, descrito por la AOAC, (2002). Brevemente, se pesaron 5 g de muestra, en una cápsula de humedad previamente colocada a peso constante. Se colocó la muestra en la

estufa por 30 minutos a 100 °C, se secó y enfrió en un desecador a temperatura ambiente y se pesó.

Cálculos:

$$\% \text{ de humedad y material volátil} = (W2 - W1) \times 100 / W \text{ Muestra}$$

Donde:

W2 = Peso de la cápsula + muestra; W1 = Peso de la cápsula + muestra (después de secado).

6.2.3.3 Determinación de proteína total

La proteína total se determinó utilizando el método 920.105 (Kjeldhal), descrito por la AOAC (2002). Se colocaron 2 g de muestra en un matraz de digestión Kjeldhal. Se agregaron 3.5 g de sulfato de sodio y 0.4 g de sulfato de cobre, más 10 mL de ácido sulfúrico. Se colocó en el digestor durante aproximadamente una hora, hasta que el contenido tomó un color verde claro, se dejó enfriar un poco y se colocó el tubo en el destilador, donde se le adicionaron agua destilada e hidróxido de sodio al 40%. El destilado se recibió en un matraz que contenía 25 mL de ácido bórico y como indicadores rojo de metilo y verde de bromocresol. Posteriormente se tituló con ácido clorhídrico 0.08 N. Se determinó nitrógeno (N) total multiplicado por un factor de conversión equivalente al % de proteína presente en el alimento.

Cálculos:

$$\% \text{ N} = (A - B) * C * D * 100$$

$$\% \text{ P} = \% \text{ N} (6.25)$$

Donde:

A = mL solución gastados en la muestra problema; B = mL solución gastados del blanco; C = meq N₂ 0.014; D = Normalidad del ácido; M = Peso de la muestra

6.2.3.4 Determinación de lípidos

Los lípidos totales se determinaron utilizando el método 920.39 (extracto etéreo), descrito por la AOAC (2002). Dentro de un cartucho de celulosa se colocaron de 2 a 5 g de frijol, se tapó con un pedazo de algodón y se colocó en el compartimento de extracción Soxhlet. Éste a su vez se ensambló a un matraz receptor, el cual contenía el solvente (éter petróleo) a 2/3 partes del volumen total, y el refrigerante. A continuación se llevó a ebullición y el calentamiento se ajustó hasta obtener alrededor de 10 reflujos por hora, por aproximadamente 5 a 6 horas. Terminando dicho tiempo, se retiró el matraz colector y se recuperó el disolvente por simple destilación. El matraz se colocó en la estufa para la completa eliminación de solvente y humedad, con el fin de obtener únicamente el peso de la fracción lipídica. Los matraces se enfriaron y pesaron con aproximación de mg para obtener el porcentaje de lípidos mediante los siguientes cálculos:

$$\% \text{ de grasa} = \frac{P_f - P_o}{M} \times 100$$

Donde:

P_f = Peso del recipiente después de la extracción (g); P_o = Peso del recipiente antes de la extracción (g); m = Peso del frijol (g).

6.2.4 Cuantificación de almidón resistente

El porcentaje de almidón resistente en las muestras fue calculado de acuerdo con lo sugerido por Saura-Calixto *et al.*, (1993), mediante una digestión enzimática posterior a la extracción de la FND. A 100 mg de muestra (FND) se le adicionaron 6 mL de una solución de KOH (2M) con agitación continua por 30 minutos a una temperatura de 25°C. Al término fueron añadidos 3 mL de solución amortiguadora de acetatos (0.4M, pH 4.75) y 5 mL de HCl (2N). El pH se ajustó a 4.74 y posteriormente se adicionaron 60 µl de amiloglucosidasa y fueron incubadas por 30 min a 60°C en baño maría con agitación continua. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 g por 15 minutos en una centrifuga Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik, Alemania) y el sobrenadante fue colectado. El residuo remanente fue resuspendido con 10 mL de agua destilada y se repitió la centrifugación. El residuo obtenido es el almidón resistente, la muestra fue liofilizada y pesada. La cuantificación se realizó por diferencia de pesos con respecto a la fracción insoluble de la muestra.

6.2.5 Extracción de oligosacáridos

La extracción de oligosacáridos se realizó a partir de las muestras crudas, cocidas y de la FND mediante la técnica descrita por Brenes y colaboradores (2003). Se homogenizaron 10 g de muestra en 50 mL de etanol al 80% y colocados en un soxhlet a 80 °C por 60 minutos. El solvente se evaporó en rotavapor y la fase acuosa se liofilizó y almacenó en un desecador protegida de la luz hasta su análisis.

6.2.6 Cuantificación de oligosacáridos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución

Los oligosacáridos se cuantificaron de acuerdo a lo descrito por Muzquiz y colaboradores (1999). Los oligosacáridos (7 mg) se disolvieron en agua HPLC (1 mL), se filtraron y analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La muestra (20 μ L) se inyectó en un equipo Agilente modelo HP-1100 (Agilent, USA) equipado con un detector de índice de refracción (DIR, 61362A), una precolumna Zorbax NH₂ (4.6 x 12.6 mm, 5 μ m) y una columna Zorbax (250mm x 4.6 mm). Se usó una mezcla agua/acetonitrilo (65:35) como fase móvil en un flujo de 1mL/minuto. La temperatura del detector y de la columna se mantuvo a 25°C.

El área bajo la curva de los picos de retención obtenidos fue interpolada en una curva de calibración externa utilizando estándares comerciales de rafinosa, estaquiosa y verbascosa. Los resultados fueron expresados en mg por gramo de muestra liofilizada.

6.2.7 Extracción metanólica para la cuantificación de compuestos fenólicos

La extracción se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Cardador-Martínez y colaboradores (2002a). Se pesaron 200 mg de muestra previamente liofilizada, se colocó en un matraz y se mezcló con 10 mL de metanol. El matraz se protegió de la luz y se mantuvo en agitación (HAAKE modelo SWB20 a 40 rpm) por 24 horas a 25 °C. Después se centrifugó a 4000 g por 10 minutos en una centrífuga Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik, Alemania). Se recuperó el sobrenadante para inmediatamente después cuantificar los compuestos fenólicos.

6.2.8 Cuantificación de flavonoides totales

Se cuantificó el contenido de flavonoides por el método sugerido por Oomah y colaboradores (2005). El método consiste en mezclar 50 μL del extracto metanólico con 180 μL de agua destilada y 20 μL de solución de 2-aminoetildifenilborato (10%) en los pozos de la microplaca. El estándar de rutina se preparó en metanol al 80%. La absorbancia del extracto se determinó a 404 nm en un Multiskan (Thermo Scientific, U.S.A. Multiskan Ascent, model 51118307) y comparada con una curva estándar de rutina en un intervalo de 0 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los flavonoides se expresaron como mg equivalentes de rutina por g de muestra.

6.2.9 Cuantificación de taninos condensados

Los taninos condensados se cuantificaron de acuerdo a la metodología descrita por Deshpande y Cheryan (1985) con algunas modificaciones para su adaptación a microplaca (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008). Se expresaron como mg equivalentes de (+)-catequina por gramo de muestra. Para cada pozo se tomó 50 μL del extracto metanólico y se le añadió 250 μL de la mezcla de vainillina-HCL (1:1) (vainillina 1%: HCl 4%) y se analizaron las muestras en una placa de 96 pozos por triplicado. Los taninos condensados se cuantificaron a una absorbancia de 495 y 540 nm en Multiskan Ascent (Thermo Scientific, U.S.A. Multiskan Ascent, model 51118307) comparando contra una curva estándar de (+)-catequina con un intervalo de 0-1 mg/mL del estándar de referencia.

6.2.10 Fermentación *in vitro* de la FND

Las fermentaciones *in vitro* (Campos-Vega *et al.*, 2009) se realizaron por duplicado utilizando como sustrato la FND del frijol Negro 8025. La rafinosa (100 mg) se utilizó como control positivo de carbohidrato fermentable bajo las mismas condiciones. Se utilizó inóculo fecal humano como fuente de flora bacteriana

representativa del colon. Por razones de disponibilidad, las muestras fecales se conservaron en congelación y se descongelaron a en baño de agua a 37 °C inmediatamente antes del experimento. Posteriormente, se realizaron las fermentaciones con heces frescas, congeladas y liofilizadas, para lo cual se obtuvo la muestra fecal de un solo donador pre-seleccionado (fisiológicamente sano y con ausencia de enfermedades gastrointestinales y de consumo de antibióticos en los 3 meses previos a la toma de la muestra). Debido a que el rendimiento final de los AGCC no fue el esperado para realizar el ensayo biológico con la línea celular, se decidió finalmente realizar la fermentación *in vitro* con las heces frescas de un donador con los mismos pre-requisitos anteriormente mencionados.

Se llenaron tubos estériles (15 mL) con 9 mL de medio de cultivo basal que contenía (g/L): agua de peptona 2.0, extracto de levadura 2.0, NaCl 0.1, K₂HPO₄ 0.04, KH₂PO₄ 0.04, MgSO₄·7H₂O 0.01, CaCl₂·2H₂O 0.01, NaHCO₃ 2.0, cisteína HCl 0.5, sales biliares 0.5, tween 80 2 mL y hematina 0.2g (previamente diluida en NaOH 1M). Los tubos se sellaron y se mantuvieron bajo una atmósfera anaerobia que contenía una mezcla de gases (H₂-CO₂-N₂:10:10:80, respectivamente, por vol) durante 48 horas. El inóculo fecal (3 g de materia fresca) fue homogenizado con 27 mL de solución de fosfato de sodio 1M (pH 7.0). Los tubos (conteniendo el medio de cultivo basal) se inocularon con 1 mL de homogenizado fecal, y se adicionaron 100 mg del extracto de la FND después de la inoculación, excepto para el control negativo. Los tubos se agitaron con un vortex por ~15 segundos y colocados en baño de agua a 37°C. Se mantuvo un flujo continuo de la mezcla de gases hasta el término de la fermentación (48 horas). Durante la fermentación se determinó el pH y la producción de AGCC a las 12, 24 y 48 horas de dicho proceso. La fermentación se detuvo colocando las muestras en congelación y se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

6.2.11 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta en el EFFND

La concentración de ácidos grasos de cadena corta se realizó por cromatografía de gases con la metodología descrita por Campos-Vega y colaboradores (2009). Las muestras (1.5 mL) se descongelaron y centrifugaron a 4500 rpm por 15 minutos a 4 °C; se transfirieron 800 µL del sobrenadante a un tubo de 8 mL y se ajustó el pH a 2.9-3.1 con HCl 1 M. Se transfirieron 750 µL de la muestra a un nuevo tubo y se le añadieron 120 µL de ácido fórmico. La muestra se cargó en el puerto de inyección de un equipo Agilent 6890 Plus acoplado a un detector de ionización de flama (FID, Agilent Technologies Wilmington, DE) y se separó en una columna capilar Carbowax 20M (25 x 320µm x 0.30µm). Se utilizó el helio como gas acarreador con un flujo de 1mL/min. La temperatura inicial del horno fue de 95°C y se mantuvo durante 2 minutos, seguida de una elevación de temperatura de 20 °C por minuto hasta alcanzar 180°C. La temperatura del FID y del puerto de inyección fue de 240 y 200 °C, respectivamente. El flujo de hidrogeno, aire y nitrógeno fue de 30, 300 y 20 mL/min. Se emplearon estándares externos puros (ácidos: acético, propiónico y butírico; 0-100 mM/mL) para cuantificar los AGCC en el EFFND.

6.2.12 Cuantificación de proteínas totales en el EFFND

Para determinar la concentración de proteínas en el EFFND, se realizó el ensayo de Bradford (1976), usando la albúmina sérica bovina (ASB) como estándar. El método se basa en la unión de un colorante (Comassie Blue G-250) a las proteínas. El colorante, en solución ácida (color azul) se une a las para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre.

Se colocaron 10 µL de la muestra en una microplaca y se adicionaron 240 µL del reactivo de Bardford. La placa se incubó 5 minutos a temperatura

ambiente y se analizó en el Multiskan Ascent (Thermo Scientific, U.S.A. Multiskan Ascent, model 51118307) a una longitud de onda de 540 nm. La absorbancia de la muestra se comparó con una curva estándar de ASB en un intervalo de 0 a 100 µg/mL.

6.2.13 Cultivo celular

Las células HT-29 se cultivaron en medio base McCoy's 5A (ATCC) adicionado con suero fetal bovino (10%; Gibco, Grand Island, NY), antibióticos y antimicóticos (1%).

El medio de cultivo se cambió por medio fresco cada tercer día hasta alcanzar la confluencia. Las células se mantuvieron bajo una atmósfera humificada de 10% de CO₂ a 37 °C en una incubadora (FELISA) con cámaras de gasificación manual; las células se manejaron en una campana de bioseguridad (NUAIRE).

6.2.14 Elaboración de la curva de crecimiento de las células HT-29

Las células HT-29 se sembraron en cajas de 24 pozos (5x10⁴ células/pozo) en medio de cultivo McCoy's 5A (ATCC) adicionado con suero fetal bovino (10%; Gibco, Grand Island, NY), antibióticos y antimicóticos (1%). A las 24 horas de incubación, se sustituyó el medio por medio McCoy's 5A al 0.5 % de albúmina sérica bovina (ASB) (Sigma-Aldrich, Canada Ltd.), conteniendo 0 (control), 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35% del EFFND (previamente esterilizado por filtración).

Después de 24 horas de tratamiento, las células se cosecharon con tripsina y se contaron con un hemocitómetro (Marienfeld, GmbH & Co. KG, Germany), determinando el porcentaje de sobrevivencia para obtener la concentración letal cincuenta (CL₅₀), que se refiere a la concentración necesaria del EFFND para inhibir la sobrevivencia del 50 % de la población celular sometida al tratamiento. Con fines comparativos, también se evaluaron soluciones de estándares puros de AGCC (acético, propiónico y butírico) a la concentración determinada en la CL₅₀ del EFFND (7.36 mmol, 0.33 mmol y 3.31 mmol de ácido acético, propiónico y butírico respectivamente). El porcentaje de sobrevivencia se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Sobrevivencia} = \frac{\# \text{ de células después del tratamiento}}{\# \text{ de células iniciales (Co)}} \times 100\%$$

Los experimentos se realizaron por duplicado para su evaluación estadística.

6.2.15 Determinación de daño celular (citotoxicidad)

La muerte celular por necrosis o citotoxicidad se evalúa clásicamente por la cuantificación de los daños en la membrana plasmática. El ensayo con el kit de citotoxicidad-LDH (BioVision) es un método rápido y simple para cuantificar la citotoxicidad basada en la medición de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada por las células dañadas, la cual se puede determinar mediante una reacción enzimática acoplada, donde la LDH oxida al lactato en piruvato, el que posteriormente reacciona con sal de tetrazolio para formar un compuesto colorido (formazán) (Figura 10). El aumento en la cantidad de formazán producida en el medio de cultivo se correlaciona directamente con el aumento en el número de células lisadas. El formazán es soluble en agua y pueden detectarse espectrofotométricamente a 500 nm.

Este método se aplicó para evaluar el posible efecto citotóxico del EFFND y la mezcla sintética de los AGCC en las células HT-29. Las células fueron tratadas con el EFFND y con la mezcla sintética de AGCC durante 24 horas en una caja de 24 pozos bajo las mismas condiciones usadas en la curva de crecimiento. Después de someterse a los tratamientos correspondientes, el medio de cultivo se recuperó para inmediatamente después realizar el ensayo de citotoxicidad. Se usó el medio base (McCoy's 5A) al 0.5 % de albúmina sérica bovina (medio-ASB) como control negativo, así como el Tritón al 1% (adicionado al medio-ASB) como control de daño celular.

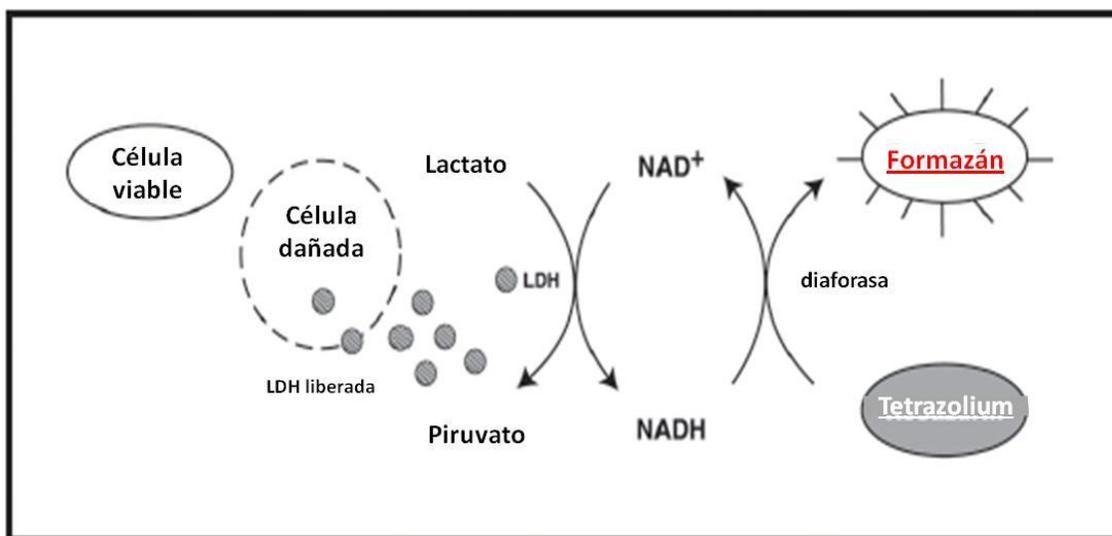


Figura 10. Reacciones en el ensayo de citotoxicidad de la LDH liberada en el medio de cultivo.

El porcentaje de citotoxicidad se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{\text{Abs}_{\text{tratamiento}} - \text{Abs}_{\text{control con medio ASB}}}{\text{Abs}_{\text{control tritón al 1\%}} - \text{Abs}_{\text{control con medio ASB}}} \times 100$$

6.2.16 TUNEL

Para evaluar la apoptosis en las células tratadas con EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀ (mezcla sintética de ácido acético, propiónico y butírico equivalente a la concentración encontrada en la EFFND-CL₅₀) y de las células control (sin tratamiento) se utilizó el marcaje del ADN fragmentado por la técnica de TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling, por sus siglas en inglés), la cual consiste en la marcación de los extremos 3' terminal cortados (en el proceso de apoptosis) de ADN genómico con dUTP conjugado con biotina por la acción de la enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal. El ADN fragmentado se detecta por la unión de la streptavidina (marcada con peroxidasa de rábano picante) con los nucleótidos biotinilados. Este método permite la detección específica e inequívoca de células cuyo ADN nuclear (visualizado en color café) se encuentra segmentado por el proceso de apoptosis (Balbarrey *et al.*, 2001).

El procedimiento fue el siguiente:

1. Después de someter a las células con el tratamiento dado, bajo condiciones ambientales y de tiempo predeterminados, se cosecharon (células sobrevivientes) por tripsinización.
2. Las células recuperadas se centrifugaron para eliminar el sobrenadante (medio).
3. Se resuspendió el pellet (células) con PBS 1X y se colocó sobre un cubreobjetos hasta quedar completamente seco.
4. Las células se fijaron con metanol.
5. Se colocó peróxido de hidrógeno al 3 % sobre las células fijadas durante 5 minutos.
6. Se adicionó agua destilada y se dejó sobre las células por 5 minutos.
7. Se retiró el agua y se volvió a colocar agua destilada por otros 5 minutos.
8. Se adicionó la solución amortiguadora TdT por 5 minutos.

9. Se colocó la solución TUNEL sobre las muestras.
10. La reacción TUNEL se realizó durante 1 hora a 37 °C en estufa o cámara húmeda.
11. Se adicionó la solución stop durante 15 minutos.
12. Se colocó PBS 0.1 M sobre las muestras y se dejó durante 5 minutos.
13. Se adicionó PBS suplementado con 1% de albumina serica bovina sobre las muestras y se dejó incubando durante 10 minutos.
14. Se realizó la reacción con la solución ABC durante 30 minutos a oscuras.
15. Se lavaron los cubreobjetos con PBS durante 5 minutos.
16. Se retiró lo anterior y se volvió a lavar con PBS durante 5 minutos.
17. Se llevó a cabo la reacción con la diaminobenzidina (DAB) durante 5 minutos. Se adicionó 1 gota por cubreobjetos (aprox 40 μ L por muestra).
18. Se adicionó agua bidestilada sobre los cubreobjetos durante 5 minutos 2 veces.
19. Se adicionó el colorante Hematoxilina Mayer y se dejó reaccionar durante 2 minutos.
20. Se lavó con agua destilada por 5 minutos como agua corriente dos veces.
21. Los cubreobjetos se dejaron secar y se colocaron sobre un portaobjetos, fijándolos con resina para ser visualizados en el microscopio.
22. Los puntos café representando a las células apoptóticas se identificaron y cuantificaron con un microscopio de luz invertido.

6.2.17 Extracción de ARN

El ARN de las células HT-29 (2×10^6) de las células (tratadas con EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀) y de las células control se obtuvo empleando el RNeasy Mini Kit siguiendo las indicaciones descritas en el protocolo Qiagen.

El procedimiento fue el siguiente:

1. Para cada muestra (tratamientos y control) se colocaron 2×10^6 células en un tubo (1.5 mL) sobre una cama de hielo y se adicionaron 600 μ L de solución amortiguadora RLT.
2. Las muestras se homogenizaron por agitación manual en un vortex por unos segundos, evitando sobrecalentar la muestra.
3. Se colocó el contenido en una columna QIA Schreder mini spin.
4. Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 3 minutos.
5. El sobrenadante se transfirió a un tubo (1.5 mL) limpio.
6. Se añadió 1 volumen de etanol al 70% y homogenizar por pipeteo.
7. Se tomaron 700 μ L del homogenizado y se colocó en una columna RNeasy.
8. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 15 segundos.
9. La fase superior se conservó en la columna, y el volumen se desechó el volumen precipitado.
10. Se adicionaron 350 μ L de solución amortiguadora RW1.
11. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 segundos.
12. El precipitado se eliminó y se recuperó la fase superior.
13. Se adicionó la DNasa al volumen recuperado y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente.
14. Se adicionaron 350 μ L de la solución amortiguadora RW1.

15. Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 segundos y el volumen precipitado se eliminó.
16. Se adicionaron 500 μ L de solución amortiguadora RPE y los tubos se centrifugaron a 10 000 rpm por 15 segundos.
17. Se eliminó el volumen precipitado y los tubos se volvieron a centrifugar a 10 000 rpm por 2 minutos.
18. Se colocó la columna en un tubo nuevo de 2 mL y se adicionaron 40 μ L de agua libre de RNasas.
19. Se centrifugaron los tubos a 10 000 rpm por 1 minuto y finalmente se colocaron en un recipiente con hielo.

6.2.18 Detección y evaluación de la calidad de ARN

Se examinó el ARN de las muestras para confirmar la ausencia de ADN, ARN degradado, pureza y estabilidad a través de electroforesis en un gel de agarosa desnaturalizante. La agarosa desnaturalizante se preparó mezclando:

- 0.96 g agarosa
- 8 mL de MOPS 10X
- 2.4 mL formaldehído 37%
- 69.6 mL agua destilada estéril con DEPC

El procedimiento fue el siguiente:

1. Se fundió la agarosa en el agua con DEPC
2. Se enfrió hasta aproximadamente a 42°C.
3. Se adicionó MOPS 10X
4. Se adicionó formaldehído
5. Se adicionó 1 μ L de bromuro de etidio.

Se vació la agarosa en la cámara de electroforesis colocando el peine con el tamaño de pozo adecuado para el volumen de la muestra, se esperó a que se solidificara, se retiró el peine y se adicionó a la cámara el regulador de corrida MOPS 1X, el cual se preparó a partir de MOPS 10X. Para la dilución se utilizó agua tratada con DEPC hasta alcanzar la concentración 1X. El volumen del regulador de corrida en la cámara de electroforesis se adicionó hasta cubrir la superficie del gel, posteriormente se cargaron las muestras de ARN (5 μ L) mezcladas con el regulador de carga (2 μ L) que proporciona mayor densidad a las muestras para que éstas permanezcan dentro del pozo y marquen el avance de la electroforesis. El gel se observó con una lámpara de luz ultravioleta, empleando el software BioCaptMW Versión 10.02, la imagen se guardó en formato JPG.

6.2.19 Síntesis de ADNc de cadena sencilla

La síntesis de ADNc de cadena sencilla se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el manual del SMART PCR ADNc síntesis y de la enzima SUPER SCRIPT II. La enzima SUPER SCRIPT II (Life Technologies) tiene la capacidad de aumentar la probabilidad de que los mensajes sean transcritos completamente, debido a que posee actividad de transferasa terminal, la cual añade algunos nucleótidos de deoxicitidina al extremo 3' del ADNc, lo que permite que el oligonucleótido SMART II A se acople creando un templado extendido asegurando la transcripción del mensaje completo (Clontech, Laboratories). Además, esta enzima está genéticamente diseñada mediante la introducción de mutaciones puntuales, en lugar de la delección del centro activo de la ARNasa H, por lo que reduce de 10^6 a 10^7 veces actividad ARNasa H y las mutaciones selectivas producidas en el centro activo mantienen completa la actividad polimerasa, lo que permitió mejorar la calidad y rendimiento de la síntesis de ADNc de cadena sencilla.

El ARN total (1µg) se empleó como templado para sintetizar ADNc de cadena sencilla.

1. Para cada muestra control y problema de ARN de estudio se mezclaron los siguientes reactivos en un tubo eppendorf estériles de 0.5 mL respectivamente:

3 µL de ARN Total
+ 1 µL 3' oligonucleótido II A SMART CDS (10 µM)
1 µL Oligonucleótido SMART II A (10 µM)
5 µL Volumen Total

2. Se mezcló y centrifugó brevemente a velocidad máxima por 5-6 segundos en una microcentrífuga.

3. Se incubó la reacción a 70°C en un termociclador por 2 minutos.

4. Se centrifugó brevemente para coleccionar el contenido.

5. Se añadieron los siguientes reactivos a cada tubo de reacción:

2 µL Regulador de primera cadena 5X

1 µL DTT (20 mM)

1 µL dNTP 50X (10 mM)

1 µL Transcriptasa reversa SuperScript II.

6. Se mezcló en vortex y se centrifugaron los tubos brevemente.

7. Se incubaron los tubos a 42°C por 1 hora en un termociclador.

8. Se diluyó el producto de la reacción de primera cadena adicionando 40 µL de regulador TE (10 mM Tris [pH 7.6], 1 mM EDTA).

9. Se calentaron los tubos a 72°C por 7 minutos.

6.2.20 Síntesis de ADNc de doble cadena

El ADNc de cadena sencilla tiene en sus extremos secuencias que sirven como sitios de reconocimiento para que el oligonucleótido PCR se una y se inicie

con la amplificación por PCR, por lo cual es necesario determinar el número de ciclos óptimo de PCR necesarios para obtener un ADNc de doble cadena que mejor represente los ARNm, presentes en cada condición. La optimización del número de ciclos óptimo para la amplificación de la segunda cadena es importante debido a que esto asegura que los ADNc se encuentran en su fase exponencial de amplificación; es decir todos los ADNc provenientes de los ARNm se encuentran expresados.

Se llevo a cabo un barrido de ciclos de PCR: 15, 20, 30, 35,40 y 45 como se muestra a continuación:

Para cada muestra control y problema, se adicionó un tubo extra de reacción para determinar el número óptimo de ciclos de PCR, debido a que es necesario llevar la amplificación de ADNc de doble cadena a la fase exponencial. El protocolo se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se calentó el termociclador a 95°C.
2. Para cada reacción, se empleó 10µL de ADNc de cadena sencilla
3. Se preparó la mezcla de reacción para todos los tubos, más un tubo adicional, se mezclaron los siguientes componentes en el orden en que se enlistan a continuación:

Para cada reacción:

	2.0 µL	Agua desionizada
	1.5 µL	Taq Platinum
	10.0 µL	Regulador 10X solución amortiguadora PCR minus
+	2.0 µL	dNTP 50X (10 mM)
	2.0 µL	Oligonucleótido 5´ PCR Primer II A (10 µM)
	3.0 µL	Mezcla Advantage MgCl ₂
<hr/>		
	20.0 µL	Volumen total

4. Se colocaron 20 μL de la mezcla anterior y se adicionaron al tubo del paso 2
5. Se mezcló ligeramente en vortex y se centrifugó brevemente a velocidad máxima por 5-6 segundos en una centrifuga de mesa.
6. La mezcla se dividió en dos tubos uno con 70 μL y otro con 30 μL ,
7. Los 30 μL se alicuotaron en volumen de 5 μL en tubos PCR, se cerraron los tubos y se colocaron en el termociclador precalentado.
8. Se inició la amplificación por PCR utilizando el programa para el termociclador PE9700: el paquete proporciona las condiciones adecuadas dependiendo del termociclador con que se cuente.
 - 95°C 2 min
 - x ciclos
 - ✓ 94°C 30 segundos
 - ✓ 55°C 30 segundos
 - ✓ 72°C 6 minutos

Se llevaron todos los tubos a 15 ciclos y el tubo con 70 μL se retiró del termociclador y almacenado a -20°C , después se empleó el tubo extra de cada reacción para determinar el número óptimo de ciclos de PCR, como se describe a continuación:

8. Para cada tubo extra (5 μL) se determinó el número óptimo de ciclos de PCR:
 - a. Se continuó con la reacción de PCR para todos los tubos y cada 5 ciclos se fue retirando un tubo hasta completar los 40 ciclos para el último de los tubos. Cada tubo se almacenó en un recipiente con hielo.
9. Se llevó a cabo una electroforesis de 5 μL de cada tubo de reacción de PCR junto a 0.1 μL de marcador de ADN de 1.0 kb en un gel de agarosa al 1.2% / EtBr en solución reguladora TAE 1X.

10. Los tubos de 15 ciclos (70 μ L de cada muestra) de PCR almacenados a -20°C se colocaron en el termociclador, para llevar a cabo los ciclos adicionales, hasta que se alcanzó el número óptimo de ciclos.
11. Cuando el número de ciclos se completó, se analizaron 5 μ L de la muestra junto a 0.1 μ L de marcador de tamaño 1 kb en un gel de agarosa al 1.2% / EtBr en solución reguladora TAE 1X.
12. Se adicionaron 2 μ L de EDTA 0.5 M a cada tubo para terminar la reacción.
13. Los productos de PCR para cada una de las muestras se almacenaron a -20°C .

6.2.21 Detección de ADNc de doble cadena sintetizado

Para iniciar con el análisis de la síntesis de ADNc de doble cadena fue necesario llevar a cabo una electroforesis en gel de agarosa como se indica:

Se pesaron 1.2 g de agarosa y se adicionaron 2 mL de TAE 50X más 98 mL de agua destilada estéril en un matraz, después se mezcló y se calentó en horno de microondas 1.5 minutos, se dejó enfriar y se adicionó 1 μ L de bromuro de etidio.

1. Se vació la agarosa dentro del molde de la cámara de electroforesis, colocando un separador en un extremo del molde para generar pozos, se esperó a que se solidificara la agarosa, con precaución el separador fue retirado y se adicionó regulador de corrida TAE 1X hasta cubrir la superficie del gel perfectamente.
2. Se adicionaron 3 μ L de marcador de tamaño molecular 1.0 kb al carril número 1.

3. Empleando una punta estéril se tomaron 5 μL de ADNc de doble cadena y 2 μL de regulador de carga, se mezclaron por pipeteo y se depositaron los 7 μL en el siguiente pozo del gel.
4. Se aplicaron 86 volts durante 45 minutos ó hasta antes que las bandas del regulador de carga alcanzaran el final del gel.
5. Se observó el gel con una lámpara de luz ultravioleta, empleando el software BioCaptMW Versión 10.02, la imagen se guardó en formato JPG.

6.2.22 Arreglos de RT-PCR cuantitativo

Para la determinación cuantitativa de los transcritos de la cascada de señalización de p53, se homogenizaron 102 μL de ADNc diluido (100 ng/ μL) de las células tratadas y del control con la mezcla RT² Real-Time™ SYBR Green/ROX PCR mastermix (PA-012, SABiosciences, USA) de acuerdo al protocolo de manufactura. La expresión de 84 genes se determinó empleando el arreglo para PCR en tiempo real RT² Profiler diseñado para muestras humanas (SABiosciences USA, PAHS-027A) como se especifica en el protocolo de manufactura utilizando el equipo Mx 3005P QPCR system (Stratagene, La Jolla, CA, USA) bajo las siguientes condiciones: 95 °C, 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C-15 segundos / 60 °C-1 minuto. El arreglo incluyó genes relacionados con la cascada de señalización de p53 relacionados con apoptosis, ciclo celular, proliferación celular, diferenciación y reparación del ADN. Se incluyeron 3 genes constitutivos como controles: beta-2-microglobulina (B2N), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y beta-actina (ACTB).

Los datos se evaluaron con el software MxPro (Stratagen) y se analizaron a través del portal en internet para el análisis de datos para arreglos de PCR cuantitativo proporcionado por SABioscience. Se consideraron secuencias como potencialmente moduladas si el cambio entre las muestras provenientes de

las células sometidas a tratamiento y las no tratadas fue mayor de 1.1 veces (inducción o inhibición) de acuerdo con las instrucciones del portal (<http://sabioscience.com/pcr/arrayanalysis.php>).

7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados entre variedades de frijol se realizó la comparación entre medias con la prueba de Tukey. La concentración letal media (CL₅₀) se calculó por regresión lineal y se expresó como el Log de la concentración del EFFND y su equivalencia en mmol de ácido acético, propiónico y butírico. El paquete estadístico para el análisis se realizó con el programa JMP versión 5.0.1 ($\alpha = 0.05$). El análisis de datos para la expresión transcripcional se hizo mediante el portal web de análisis de datos de arreglos de PCR provisto por la compañía SABiosciences, basado en el método $\Delta\Delta C_t$ con normalización de los datos crudos para los genes control.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Composición química de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025, Pinto Durango y Azufrado Higuera con y sin tratamiento térmico

En el cuadro 2 se muestra el contenido de proteínas, grasa, fibra total (insoluble y soluble) de las tres variedades de frijol en estudio; donde se observa un incremento en relación al porcentaje de proteínas en el frijol cocido respecto al frijol crudo. Lo anterior puede explicarse debido a que el proceso de cocción puede modificar las características fisicoquímicas de las leguminosas. Además, el proceso de liofilización incrementa la concentración de los nutrimentos, por lo que

estos factores tienen efecto en las cantidades finales de los mismos (de Almeida-Costa *et al.*, 2006).

Dichos porcentajes son comparables con los reportados anteriormente por autores como Reyes-Moreno y Paredes-López (1993), quienes obtuvieron valores de 20.3% - 29% de proteínas en diversas variedades cultivadas en México. Estas variaciones pueden deberse debido a que la cantidad total de proteínas depende de la variedad, origen, locación, clima, condiciones ambientales y tipo de suelo en el cual crecen (Worthington, 1972).

En cuanto al porcentaje de lípidos, el frijol cocido presentó una ligera disminución en comparación con el crudo, lo cual puede deberse a la formación de complejos almidón-lípidos (Osorio-Díaz *et al.*, 2002) y a la oxidación de las grasas en el tratamiento térmico dando lugar a productos secundarios (Reyes-Moreno y Paredes-López, 1993). Estos resultados son similares a lo citado por Bednar y colaboradores (2001) quienes reportaron de 1.6 a 3.3% para frijol común de las variedades negro y rojo.

Cuadro 2. Composición química del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedades Negro 8025, Pinto Durango y Azufrado Higuera.

	Negro 8025		Pinto Durango		Azufrado Higuera	
	Crudo	Cocido	Crudo	Cocido	Crudo	Cocido
Proteína	20.33 ± 0.07 ^d	22.24 ± 0.62 ^{cd}	21.63 ± 0.23 ^{cd}	23.45 ± 0.29 ^c	26.30 ± 0.24 ^b	28.39 ± 0.71 ^a
Lípidos	2.13 ± 0.23 ^{ab}	1.68 ± 0.04 ^{ab}	3.08 ± 0.84 ^a	1.59 ± 0.16 ^{ab}	1.20 ± 0.19 ^b	1.23 ± 0.02 ^b
Humedad	10.57 ± 0.02 ^b	63.64 ± 0.26 ^a	11.30 ± 0.3 ^b	64.52 ± 0.07 ^a	9.47 ± 0.08 ^c	64.56 ± 0.21 ^a
Cenizas	4.30 ± 0.05 ^a	3.60 ± 0.10 ^b	4.34 ± 0 ^a	3.82 ± 0.03 ^b	3.86 ± 0.02 ^b	3.82 ± 0.03 ^b
Fibra total	49.78 ± 0.65 ^b	58.57 ± 0.46 ^a	37.47 ± 1.68 ^d	46.37 ± 0.71 ^{bc}	44.53 ± 0.83 ^c	51.34 ± 0.21 ^b
Fibra insoluble	49.11 ± 0.84 ^b	57.84 ± 0.47 ^a	37.15 ± 1.68 ^d	46.12 ± 0.72 ^{bc}	43.28 ± 0.98 ^c	50.82 ± 0.14 ^b
Fibra soluble	0.67 ± 0.19 ^b	0.73 ± 0.01 ^{ab}	0.32 ± 0 ^b	0.25 ± 0 ^b	1.25 ± 0.14 ^a	0.52 ± 0.07 ^b

Resultados expresados como la media ± error estándar de dos experimentos independientes con dos repeticiones cada uno presentados como el porcentaje (%) por gramo de muestra base seca. Letras diferentes por renglón indican diferencia significativa de $\alpha=0.05$

En el contenido de fibra dietética total puede observarse un aumento en el frijol cocido respecto al crudo. Autores como Serrano y Goñi (2004) han sugerido que estos cambios pueden deberse a la presencia de sustancias amiláceas en el grano, que al enfriarse retrograda parte del almidón y éste se cuantifica como fibra dietética. Los resultados correspondientes a las variedades en estudio del presente trabajo son comparables con aquellos reportados por Bednar y colaboradores (2001) para la fibra dietética total (36.2 - 46.2%) y para la fibra soluble (0 - 3.2%). Sin embargo, el contenido de fibra insoluble es ligeramente mayor comparado con el que reportan estos mismos autores (36.2 - 39.4%). Además, cabe mencionar que la variedad que presentó un menor cambio en la cantidad de fibra dietética total al someterse al tratamiento térmico fue Azufrado Higuera, probablemente relacionado con el menor tiempo de cocción requerido para esta variedad de frijol.

Debido a que el frijol Negro 8025 cocido presentó una mayor cantidad de fibra dietética (sustrato fermentable) en comparación con las variedades Pinto Durango y Azufrado Higuera (12.2 % y 7.23 % más, respectivamente), se eligió esta variedad para la fermentación *in vitro* y evaluar el efecto del EFFND sobre las células HT-29.

8.2 Contenido de oligosacáridos y almidón resistente en frijol crudo, cocido y en la FND de la variedad Negro 8025

En el cuadro 3 se muestra el contenido de oligosacáridos totales, rafinosa, estaquiosa, verbascosa y almidón resistente en frijol crudo, cocido y en la FND de la variedad Negro 8025., siendo la estaquiosa el α -galactósido mayoritario en el frijol cocido, seguido de la verbascosa y rafinosa. Proporciones similares se han reportado previamente por Muzquiz y colaboradores (1999) y Trugo y colaboradores (2000) para variedades de frijol común. El mayor contenido de oligosacáridos en el frijol cocido se debió probablemente a una mayor lixiviación de los componentes solubles y la liberación de oligosacáridos durante la cocción (Han y Baik 2006). También se ha reportado que los oligosacáridos sufren una hidrólisis enzimática y liberan oligosacáridos a partir de las macromoléculas unidas durante la cocción, dando como resultado un aumento en el contenido de oligosacáridos (Jambunathan *et al.*, 1994; Trugo *et al.*, 2000). El porcentaje de almidón resistente en la FND fue de 26.82%, ligeramente menor al 30.8% reportado por Feregrino-Pérez y colaboradores (2008) para el frijol cocido de la misma variedad. Las diferencias entre cultivares podrían deberse por las condiciones ambientales de cultivo. Sin embargo, el rendimiento de la extracción de la FND a partir de la muestra de frijol cocido fue de un 58%, lo que implica que este cultivar tiene una cantidad apreciable de compuestos susceptibles de fermentación en el colon, y por ende, de la producción de compuestos con actividad biológica.

Cuadro 3. Contenido de oligosacáridos totales, rafinosa, estaquiosa, verbascosa y almidón resistente en frijol crudo, cocido y en la FND de la variedad Negro 8025.

	Crudo	Cocido	FND
Oligosacáridos totales	1.02 ± 0.09 ^b	4.39 ± 0.13 ^a	0.32 ± 0.01 ^c
Rafinosa	0.04 ± 0.01 ^c	0.13 ± 0 ^b	0.23 ± 0.01 ^a
Estaquiosa	0.89 ± 0.47 ^b	2.74 ± 0.12 ^a	<LD
Verbascosa	0.09 ± 0.06 ^b	1.51 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0 ^b
Almidón resistente	ND	ND	26.82 ± 0.10 ^a

Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes ± error estándar.

Los oligosacáridos se expresan como mg por gramo de muestra en base seca y el almidón resistente se expresa como el porcentaje (%) por gramo de muestra base seca.

Letras diferentes por línea indican diferencia significativa de $\alpha=0.05$, Prueba de Tukey.

ND = no determinado; <LD = por debajo del límite de detección.

8.3 Contenido de taninos condensados (TC) y flavonoides totales (FT) de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025

El cuadro 4 muestra el contenido de TC y FT en frijol crudo y cocido de la variedad Negro 8025 y en su FDN. Los taninos condensados se expresan en miligramos equivalentes de (+)-catequina / gramo de muestra. Estos compuestos disminuyeron en las muestras de frijol cocido, lo que sugiere la formación de complejos con proteínas (Reyes-Moreno y Paredes-López 1993). De acuerdo con Bressani y colaboradores (1983), alrededor del 60% de los compuestos fenólicos se retienen en el frijol negro durante la cocción con una porción unida a proteínas y al almidón, complejos que no son detectables por diversos métodos (Deshpande y Cheryan, 1983). Resultados similares para variedades de frijol Negro se ha documentado por Aparicio-Fernández y colaboradores (2005) y Feregrino Pérez y colaboradores (2008).

Por otra parte, puede observarse un incremento en el contenido de taninos condensados en el FDN, la cual consiste no solamente de fibra dietética, sino también de otros compuestos con resistencia a la acción de las enzimas digestivas, tales como el almidón resistente, proteínas resistentes, polifenoles, compuestos de Maillard, entre otros (Saura-Calixto *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la mayor parte de los polifenoles se encuentran asociados a la FND de los alimentos, entre los cuales se encuentran los taninos condensados y polifenoles hidrolizables, siendo las leguminosas uno de los alimentos con la más alta concentración de estos compuestos (Saura-Calixto *et al.*, 2007). Además, se ha reportado que la porción de polifenoles no extraíbles en la dieta puede ser incluso el doble que los polifenoles extraíbles, cuyos efectos biológicos están asociados a su biodisponibilidad, la cual tiene lugar principalmente en el intestino grueso, donde estos compuestos pueden ser metabolizados por las bacterias colónicas (Serrano *et al.*, 2005; Saura-Calixto *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Contenido de taninos condensados y flavonoides totales en el frijol crudo, cocido, FND y EFFND del frijol común variedad Negro 8025.

Muestra	Taninos condensados¹	Flavonoides totales²
Frijol crudo	17.90 ± 0.23 ^b	1.00 ± 0.02 ^a
Frijol cocido	14.61 ± 0.01 ^c	0.69 ± 0.05 ^b
FND	20.71 ± 0.44 ^a	0.61 ± 0.03 ^b
EFFND	<LD	0.41 ± 0 ^c

¹mg equivalentes de (+)-catequina por gramo de muestra base seca o mL de EFFND.

²mg equivalentes de rutina por gramo de muestra base seca o mL de EFFND.

Resultados expresados como la media ± error estándar de dos experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Letras diferentes por columna indican diferencia significativa, $\alpha=0.05$, prueba de Tukey.

FND = Fracción no digerible a partir del frijol cocido

EFFND = Extracto de la fermentación de la fracción no digerible del frijol cocido.

El contenido de FT disminuyó significativamente después del tratamiento térmico. Sin embargo, esta diferencia no se observó entre el frijol cocido y su FDN (Cuadro 4). Estos valores son más bajos que los obtenidos por Feregrino Pérez y colaboradores (2008) para el cultivar del mismo frijol. Se puede atribuir las diferencias entre cultivares a las condiciones climáticas durante la temporada o el tipo de suelo donde se realizó el cultivo, así como las condiciones de almacenamiento poscosecha.

La pequeña cantidad detectada de compuestos fenólicos después de la fermentación (EFFND) sugieren que estos compuestos se liberan de la matriz del alimento y se solubilizan en el medio de fermentación por la acción de las enzimas bacterianas del colon. Además, los TC son compuestos particularmente susceptibles a la fermentación con la microbiota intestinal, por lo que su biodisponibilidad en el intestino grueso aumenta, lo que también explica que no haya sido posible detectar el contenido de estos en el EFFND (Saura-Calixto *et al.*, 2007).

8.4 Efecto de la fermentación del FND del frijol común Negro 8025 sobre el pH del medio de incubación

En el cuadro 5 se muestra la evolución del pH como consecuencia de la fermentación de la FND del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Negro 8025 y de la rafinosa (como control de sustrato fermentable) en el medio de incubación empleando el inóculo fecal de un donador. Se puede observar una disminución en el pH en el transcurso del tiempo. La marcada disminución del pH por la fermentación de la rafinosa puede deberse a que este oligosacárido es rápidamente fermentable y se encontraba más disponible a la acción de las bacterias comparado con el complejo de la FND (Guillon y Champ, 2002).

Cuadro 5. Efecto de la FND del frijol Negro 8025 y rafinosa sobre el pH durante la fermentación *in vitro*.

Muestra	0 h	12 h	24 h	48 h
Control	7.07 ± 0.014 ^a	6.87 ± 0.014 ^a	6.95 ± 0.007 ^a	7.14 ± 0.007 ^a
FND	6.93 ± 0.007 ^b	5.82 ± 0 ^b	5.73 ± 0.007 ^b	5.80 ± 0 ^b
Rafinosa	7.05 ± 0.007 ^a	4.45 ± 0.014 ^c	4.27 ± 0.007 ^c	4.38 ± 0.007 ^c

FND: fracción no digerible.

Los resultados se presentan como el promedio de dos experimentos independientes con dos repeticiones cada uno ± error estándar.

Letras minúsculas en la misma columna muestran diferencia significativa entre muestras $\alpha=0.05$, prueba de Tukey.

En el cuadro 6 se muestra la evolución del pH en el medio de incubación durante la fermentación *in vitro* realizada con las heces frescas, congeladas y liofilizadas de un donador, donde se puede observar una tendencia similar, independiente del inóculo fecal empleado. Puede observarse un pH mayor al inicio y disminuyendo en el tiempo, lo que sugiere la producción de ácidos orgánicos en el proceso (Gibson *et al.*, 1996; Belenguer *et al.*, 2007).

Cuadro 6. Efecto de la fermentación de la FND de frijol común variedad Negro 8025 sobre el pH del medio de incubación usando inóculo fecal en diferentes condiciones.

Inóculo	0 h	12 h	24 h	48 h
Fresco	6.93 ± 0.02 ^a	5.82 ± 0.02 ^{ab}	5.72 ± 0.05 ^a	5.80 ± 0.29 ^a
Congelado	7.02 ± 0.02 ^a	5.75 ± 0.02 ^b	5.75 ± 0.05 ^a	5.76 ± 0.29 ^a
Liofilizado	6.88 ± 0.02 ^a	5.98 ± 0.02 ^a	5.54 ± 0.05 ^a	5.36 ± 0.29 ^a

Cada valor representa la media ± error estándar de dos experimentos con dos repeticiones cada uno. Letras diferentes entre inóculos indican diferencia significativa de $\alpha = 0.05$. Prueba de Tukey.

8.5 Contenido de AGCC en el extracto de la fermentación *in vitro* de la fracción no digerible (EFFND).

Para fines comparativos, se decidió evaluar la producción de AGCC en el EFFND expresados como mmol de ácido graso por mL de EFFND (Cuadro 7), usando como inóculo las heces frescas, congeladas y liofilizadas de un mismo donador. Se puede observar que el mayor rendimiento de estos ácidos se obtuvo utilizando las heces frescas, en menor concentración con las congeladas y finalmente cabe destacar que bajo las condiciones experimentadas, no hubo producción de AGCC usando las heces liofilizadas. Este comportamiento pudiera atribuirse a la falta de reactivación de las bacterias productoras de AGCC antes de llevar a cabo la fermentación o probablemente a que la viabilidad se ve afectada por el estrés al que se someten las bacterias en el proceso de liofilización.

Interesantemente, no se observó una relación directa en la producción de los tres AGCC evaluados con la evolución del pH del medio de incubación (Cuadro 6), ya que en todos los casos se presentó una tendencia similar, independientemente de la producción de los tres AGCC determinados (Cuadro 7). Barry y colaboradores (1995) reportaron un efecto similar al realizar la fermentación *in vitro* de fibra de soya usando inóculo fecal humano, observando que el pH no se relacionó directamente con la producción de AGCC, ni con el índice de fermentabilidad, por lo que sugieren que el pH no debe usarse como indicador de los anteriores.

Los resultados sugieren la influencia de la producción de ácidos orgánicos intermediarios (ácido láctico) como resultado del desarrollo de bacterias lácticas, provocando una disminución del pH, lo que a su vez favorece el crecimiento de estas (Hove y Mortensen, 1995; Granito *et al.*, 2003). Además, se ha demostrado que la disminución del pH puede ser suficiente para inhibir la fermentación a AGCC (Holtug *et al.*, 1992; Belenguer *et al.*, 2007).

Por otro lado, el EFFND correspondiente a las 48 horas de fermentación (extracto usado en el ensayo biológico) presentó la mayor producción de ácido acético seguido del butírico y propiónico (Cuadro 7), siendo el ácido butírico detectable solamente en el extracto de la fermentación de la FND del frijol (EFFND). Lo anterior sugiere que la fermentación de la FND pudiera conferir mayor efecto quimioprotector comparado con la fermentación a partir de carbohidratos de manera aislada (Titgemeyer *et al.*, 1991; García-Peris *et al.*, 2002). La proporción entre el ácido acético, propiónico y butírico (67:3:30, respectivamente) en el EFFND proveniente de la fermentación con el inóculo fecal fresco es similar a lo que se ha reportado en otros estudios (Beyer-Sehlmeyer *et al.*, 2003; Munjal *et al.*, 2009).

Cuadro 7. Contenido de AGCC en el EFFND usando inóculo fecal en diferentes condiciones.

Inóculo	12 horas				24 horas				48 horas			
	C2	C3	C4		C2	C3	C4		C2	C3	C4	
Fresco	42.47 ± 0.004 ^a	7.45 ± 0.006 ^a	<LD	<LD	43.53 ± 0.004 ^a	6.00 ± 0.002 ^a	4.44 ± 0.002 ^a	4.44 ± 0.002 ^a	53.98 ± 0.006 ^a	2.42 ± 0.002 ^a	24.26 ± 0.008 ^a	2.42 ± 0.002 ^a
Congelado	2.19 ± 0.004 ^b	0.03 ± 0.006 ^b	<LD	<LD	4.68 ± 0.004 ^b	<LD	<LD	<LD	8.85 ± 0.006 ^b	<LD	2.65 ± 0.008 ^b	<LD
Liofilizado	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

C2: ácido acético, C3: ácido propiónico, C4: ácido butírico.

Los resultados se presentan como mmol de ácido graso por mL de EFFND.

Cada valor representa el promedio de dos experimentos ± error estándar.

Letras diferentes indican diferencia significativa entre inóculos, $\alpha=0.05$. Prueba de Tukey.

<LD: por debajo del límite de detección.

8.6 Efecto del EFFND sobre la sobrevivencia de células HT-29

En la figura 11 se muestra la sobrevivencia de las células HT-29 después de 24 horas de tratamiento con el EFFND de la variedad Negro 8025, así como aquellas correspondientes al control negativo (células sin tratamiento). Con la curva dosis-respuesta se calculó el valor de la concentración letal media (CL₅₀) equivalente a 7.36 mmol, 0.33 mmol y 3.31 mmol de ácido acético, propiónico y butírico, respectivamente.

En base a lo anterior se puede sugerir que la FND contiene sustratos fermentables por las bacterias del colon, lo que se correlaciona con la producción de AGCC. Estos resultados son similares a los reportados por Campos-Vega (2009), quien evaluó el extracto de la fermentación de polisacáridos del frijol común cocido variedad Bayo Madero, observando una inhibición en la sobrevivencia de las células HT-29 en las mismas condiciones evaluadas en este trabajo, con una CL₅₀ equivalente a 5.1, 0.68 y 1.19 mmol/mL de ácido acético, propiónico y butírico, respectivamente. Las diferencias en las concentraciones de los AGCC en la CL₅₀ entre los dos estudios pueden atribuirse a factores como la variedad de frijol común, composición química influida por las condiciones de cultivo, cosecha, almacenamiento, y a las variables relacionadas con la fermentación *in vitro* como la microflora del donador del inóculo fecal (Cummings *et al.*, 2001; Wichienchot *et al.*, 2006, Wong *et al.*, 2006; Mallillin *et al.*, 2008). Asimismo, estos resultados sugieren la participación de otros compuestos presentes en el EFFND, probablemente compuestos fenólicos y biopéptidos.

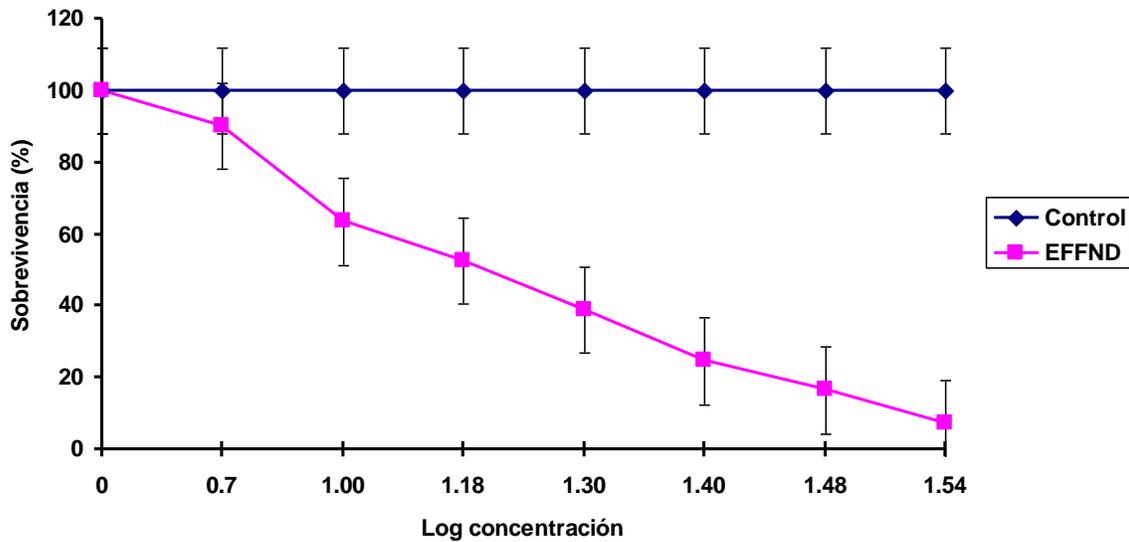


Figura 11. Sobrevivencia de células HT-29 después 24 horas de tratamiento con el EFFND.

Cada valor representa la media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes con dos repeticiones cada uno.

8.7 Evaluación del efecto de los AGCC en la sobrevivencia de las células HT-29

Para determinar la influencia de los AGCC en el efecto inhibitorio del EFFND sobre la sobrevivencia de las células HT-29, se realizó el ensayo biológico con una mezcla sintética de los AGCC en las concentraciones equivalentes a la CL_{50} (7.36 mmol, 0.33 mmol y 3.31 mmol de ácido acético, propiónico y butírico, respectivamente), usando las mismas condiciones de incubación que se emplearon para el ensayo con el EFFND. En la figura 12 se puede observar que el 82.37% de las células sobrevivieron después del tratamiento con AGCC- CL_{50} , lo que representa un efecto inhibitorio del 17.63%.

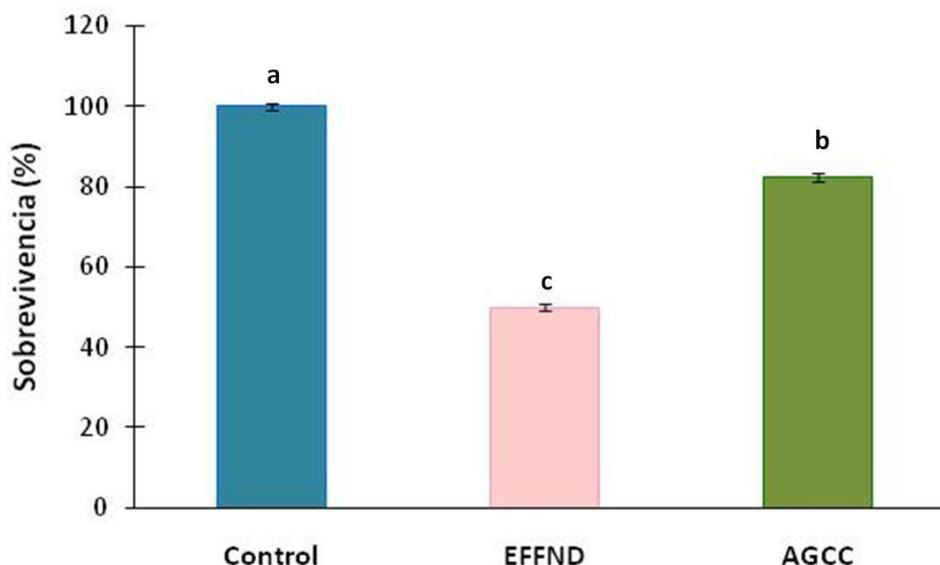


Figura 12. Comparación del efecto de los tratamientos EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀ en la sobrevivencia de las células HT-29

Cada valor representa la media \pm error estándar de dos experimentos independientes con dos repeticiones cada uno. Letras diferentes indican diferencia significativa, Prueba de Tukey.

Campos-Vega (2009) demostró el efecto benéfico de los AGCC al observar que el 64% de las células HT-29 sobrevivieron después del tratamiento con estos compuestos, lo que sugiere un papel importante de los mismos en la inhibición de la sobrevivencia de esta línea celular. Las diferencias en las concentraciones de los AGCC entre los dos estudios pueden deberse al tipo y cantidad de compuestos fermentables (fibra dietética y compuestos fenólicos) propios de cada variedad de frijol común, así como la características de la microflora fermentativa utilizada en cada estudio, la cual también influye en el tipo y concentración de compuestos quimioprotectores (Cummings *et al.*, 2001; Wichienchot *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2006; Mallillin *et al.*, 2008).

Cabe mencionar que como parte de la caracterización parcial del EFFND también se cuantificó el contenido de proteínas por el método de Bradford, obteniendo una concentración de 110.87 $\mu\text{g/mL}$. Le Leu y colaboradores (2007) demostraron que algunos de los productos de la degradación colónica de las

proteínas tuvieron actividad quimioprotectora tras suministrar una dieta a base de proteínas de papa a ratas de la cepa Sprague Dawley, observando un incremento en la producción de AGCC y una menor incidencia de neoplasias en el colon, lo que sugiere que aunque la mayoría de los productos de la degradación colónica de las proteínas da a lugar a compuestos tóxicos (amoníaco, fenoles, índoles y aminas) (Hughes *et al.*, 2000), existe una fracción con la capacidad de promover la formación de compuestos quimioprotectores en el colon, probablemente péptidos bioactivos.

Estos resultados nos permiten sugerir que, además de los tres AGCC evaluados en este estudio, probablemente existe la participación de otros compuestos bioactivos presentes en el EFFND, tales como biopéptidos, compuestos fenólicos y otros ácidos grasos derivados de la fermentación con actividad biológica (Beyer-Sehlmeyer *et al.*, 2003; Veeriah *et al.*, 2007; Ooi *et al.*, 2010).

8.8 Efecto citotóxico del EFFND y AGCC en células HT-29

Para determinar si la inhibición de la sobrevivencia de las células HT-29 fue inducida por la acción necrótica del EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀ (mezcla sintética de ácido acético, propiónico y butírico equivalente a la concentración encontrada en la EFFND-CL₅₀), se midió la toxicidad de los mismos por la liberación de la LDH de las células tratadas. Esta enzima es estrictamente citoplasmática, por lo que su presencia en el medio de cultivo representa una medida del rompimiento de la membrana plasmática, reflejando una muerte celular inducida por necrosis.

En la figura 13 se muestra el efecto de los tratamientos evaluados (EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀) en términos del porcentaje de citotoxicidad por actividad de la LDH liberada en el medio de cultivo de las células HT-29.

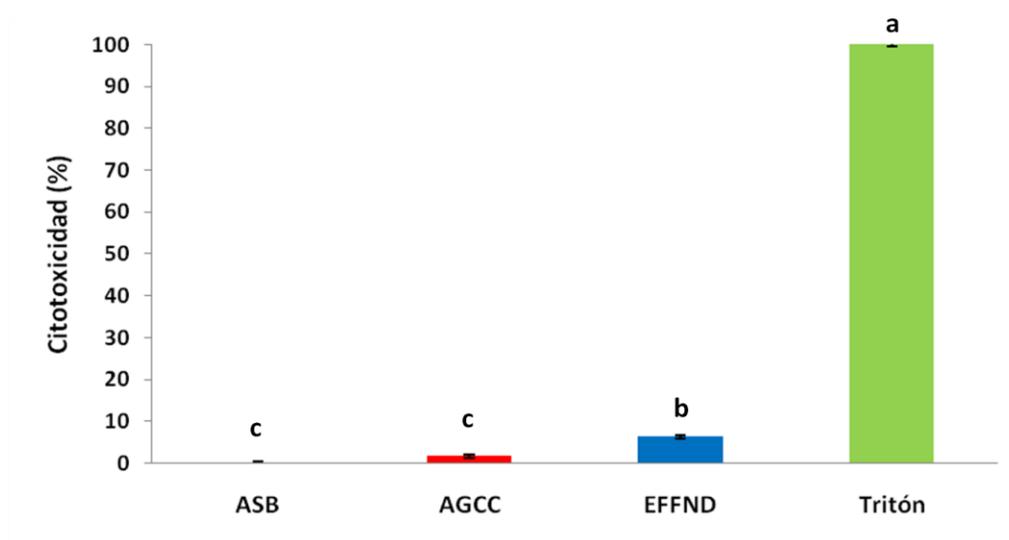


Figura 13. Comparación del efecto citotóxico de los tratamientos EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀ en las células HT-29.

Los resultados representan la media \pm error estándar de dos experimentos con dos repeticiones cada uno. Letras diferentes indican diferencia significativa $\alpha=0.05$, prueba de Tukey.

ASB= albúmina sérica bovina

Se puede observar que el tratamiento EFFND-CL₅₀ provocó una mayor liberación de LDH al medio de cultivo en comparación con el tratamiento de AGCC-CL₅₀, probablemente debido a algunos compuestos citotóxicos generados durante la fermentación de la FND. Se ha reportado que algunos productos de la fermentación de las proteínas y compuestos fenólicos, como es el caso de algunos AGCC, pueden causar daño celular directa o indirectamente (Cummings y Macfarlane, 1991). No obstante, ambos tratamientos fueron significativamente menos citotóxicos que el control de Tritón 1%, representando un porcentaje bajo si se les compara con valores reportados para diversos compuestos quimioprotectores (Dommels *et al.*, 2003; Riganti *et al.*, 2008; Jo *et al.*, 2011). Estos resultados sugieren que tanto el tratamiento con el EFFND, como la mezcla sintética de AGCC, no son citotóxicos ya que no inducen la muerte celular por necrosis.

8.9 Efecto del EFFND sobre la fragmentación del ADN en células HT-29

La muerte celular genéticamente programada puede identificarse por varios métodos, entre los que se encuentra la técnica de TUNEL, con la que se puede observar la fragmentación del ADN como manchas marrones (Figura 14A). Para confirmar la inhibición de la sobrevivencia, las células HT-29 fueron tratadas con EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀. Se observó un pequeño porcentaje de TUNEL-positividad en el control (células no tratadas) presentando diferencia significativa respecto a las células sometidas a los tratamientos (Figura 14B). Por el contrario, las células tratadas con EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀ no mostraron diferencia significativa entre ellas respecto al número de células apoptóticas (39.9 % y 34 %, respectivamente). Estos resultados sugieren que el efecto apoptótico del EFFND se debe principalmente al efecto ejercido por los AGCC presentes en el EFFND. La fragmentación del ADN por parte de compuestos quimioprotectores se ha informado por otros autores (Juan *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2007). Estos resultados confirman estudios *in vivo* previos en nuestro laboratorio realizados con la misma variedad de frijol común (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008) y sugieren que la presencia de compuestos fenólicos, especialmente de taninos condensados, no es un pre-requisito para la inducción de apoptosis.

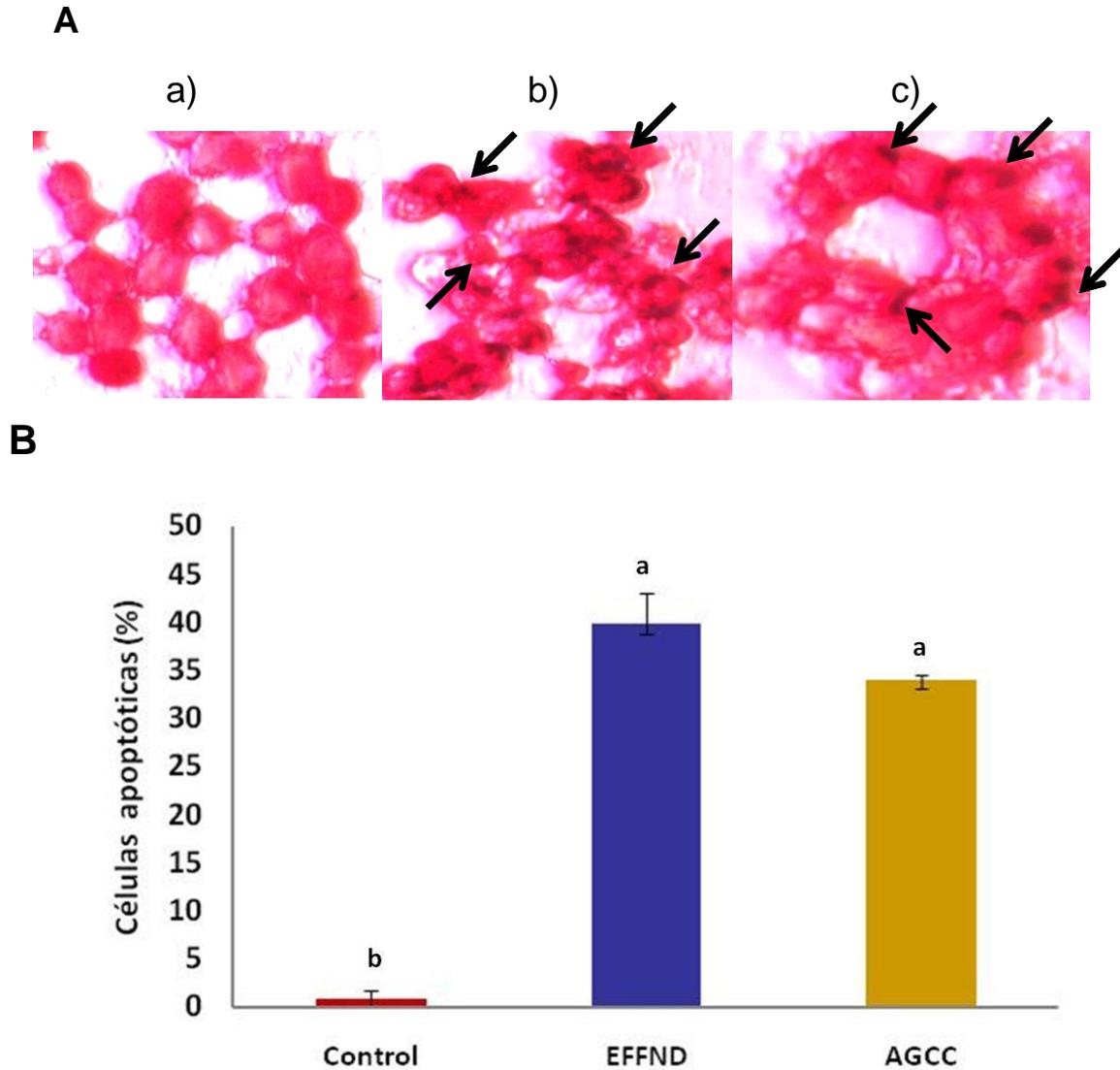


Figura 14. Efecto de los tratamientos EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀ en la fragmentación del ADN en células HT-29.

Los resultados se expresan como el porcentaje de células apoptóticas \pm error estándar.

A. Células apoptóticas identificadas como ADN fragmentado por la técnica TUNEL, visualizado como manchas marrones (indicadas con flecha). A) Control (HT-29 sin tratamiento), b) Células tratadas con EFFND-CL₅₀, c) Células tratadas con AGCC-CL₅₀

B. Células apoptóticas (%).

Los resultados representan la media \pm error estándar de dos experimentos con dos repeticiones cada uno. Letras diferentes por muestra indican diferencia significativa $\alpha=0.05$, prueba de Tukey.

8.10 Análisis de la regulación de la expresión transcripcional en las células HT-29 después de los tratamientos EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀

Se realizaron arreglos de PCR para observar el perfil de la modulación de la expresión transcripcional de 84 genes relacionados con la vía de p53 (TP53) en células HT-29 tratadas (EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀) y no tratadas (control). Los resultados se presentan como la regulación de genes ≥ 2.0 veces (inducidos o inhibidos) entre las células tratadas con EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀ y las células control (Cuadros 8 y 9) de acuerdo con el análisis de los datos obtenidos en el software del fabricante (SABiosciences). Sin embargo, también se consideraron algunos genes regulados <2 veces, ya que sus niveles de RNAm pueden ser funcionalmente relevantes (Iacomino *et al.*, 2001). Finalmente, se integraron, para fines prácticos, algunos de los genes regulados por ambos tratamientos dentro de mecanismos de acción sugeridos (Figuras 15 y 16).

Cuadro 8. Genes regulados positivamente (≥ 2 veces) con los tratamientos EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀ en comparación con las células HT-29 no tratadas.

Símbolo	Función biológica	Nivel de regulación	
		EFFND	AGCC
<i>Apoptosis</i>			
APAF1	Inducción de apoptosis	108.38	3.24
BID	Inducción de apoptosis	32.00	19.12
CASP2	Inducción de apoptosis	1.07	3.47
CASP9	Inducción de apoptosis	12.73	3.88
EI24	Inducción de apoptosis	8.57	--
FASLG	Inducción de apoptosis	2.13	4.55
TNF	Inducción de apoptosis, proliferación celular, inflamación	3.63	--
TNFRSF10B	Inducción de apoptosis	8.46	3.11
GML	Inducción de apoptosis	2.27	1.64
<i>Regulación del ciclo celular</i>			
ATR	Regulación negativa del ciclo celular, reparación de ADN	4.63	3.15
BAI1	Inhibición de angiogénesis y crecimiento celular	--	6.90
CCNE2	Punto de control del ciclo celular	7.94	--
CCNG2	Regulación negativa del ciclo celular y proliferación	3.86	5.30
CHEK2	Punto de control del ciclo celular	1.64	3.52
E2F3	Regulación del ciclo celular	--	3.20
GADD45A	Arresto del ciclo celular, reparación de ADN	1.18	1.42
NF1	Regulación negativa del ciclo celular	4.66	--
PCBP4	Regulación negativa del ciclo celular, inducción de apoptosis	--	2.23
RB1	Punto de control del ciclo celular	3.36	2.26
RPRM	Regulación negativa del ciclo celular	3.58	7.00
SESN1	Regulación negativa del ciclo celular	12.38	28.18
SIRT1	Regulación negativa del ciclo, inducción de apoptosis celular	29.86	14.19
TSC1	Regulación negativa del ciclo celular	1.78	10.32

<i>Proliferación celular</i>			
IL6	Inducción de la inflamación y proliferación celular	2.14	2.69
KRAS	Proliferación celular	2.81	3.96
MDM4	Regulación negativa de la proliferación celular	6.06	3.55
KAT2B	Inhibición del crecimiento celular	3.12	12.79
PPM1D	Crecimiento celular y anti-apoptosis	4.44	--
PRKCA	Proliferación celular	6.36	4.65
TNFRSF10D	Anti-apoptosis, sobrevivencia celular	1.82	4.49
<i>Reparación del ADN</i>			
MLH1	Reparación de ADN	2.06	3.31
MSH2	Reparación de ADN	2.57	2.31

Los resultados se normalizaron con respecto a genes control, los valores representan el grado de regulación de los ARNm en células HT-29 tratadas respecto al control. P = 0.05 comparado con el control. – No aplica.

Cuadro 9. Genes regulados negativamente (≥ 2 veces) con los tratamientos EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀ en comparación con las células HT-29 no tratadas

Símbolo	Función biológica	Nivel de regulación	
		EFFND	AGCC
<i>Regulación de la apoptosis</i>			
BAX	Inducción de apoptosis	-2.36	-1.57
BCL2	Anti-apoptosis	-1.25	-1.37
BCL2A1	Anti-apoptosis	-5.54	-1.44
BIRC5	Anti-apoptosis	-24.42	--
CRADD	Inducción de apoptosis	-4.26	-2.12
ESR1	Inducción de apoptosis, inhibición de la proliferación	-12.04	-11.82
FADD	Inducción de apoptosis	-2.11	-1.54
LRDD	Inducción de apoptosis	-2.23	-1.56
TP53AIP1	Inducción de apoptosis	-4.82	-1.88
TP63	Inducción de apoptosis	-1.02	-3.93
TRAF2	Anti-apoptosis	-2.85	-1.63
<i>Regulación del ciclo celular</i>			
BTG2	Regulación negativa del ciclo celular y de la proliferación	-2.14	-1.39
CCNB2	Punto de control del ciclo celular	-1.49	-1.07
CCNH	Control de la transcripción y ciclo celular	-1.69	-4.45
CDC2	Regulación del ciclo celular	-3.16	-9.15
CDK4	Arresto del ciclo celular	-1.19	-1.07
CDKN2A	Arresto del ciclo celular	-3.81	--
CHEK1	Punto de control del ciclo celular	-10.48	-1.04
E2F1	Regulación del ciclo celular, apoptosis	-5.54	-5.40
E2F3	Regulación del ciclo celular	-3.25	--
IFNB1	Regulación negativa del ciclo celular	-3.18	-2.35

IGF1R	Regulación del ciclo celular	-2.16	--
MYOD1	Regulación negativa del ciclo celular, diferenciación	-2.50	-1.16
NF1	Regulación negativa del ciclo celular	--	-3.69
SESN2	Regulación negativa del ciclo celular	-3.23	-2.13
TADA3L	Regulación negativa del ciclo celular, inducción de apoptosis	-2.68	-1.54
TP53	Regulación negativa del ciclo celular, inducción de apoptosis,	-84.45	-42.62
TP73	Regulación negativa del ciclo celular, inducción de apoptosis	-10.27	-2.63
WT1	Regulación negativa del ciclo celular	-6.63	-1.79
<i>Proliferación celular</i>			
CDC25A	Control de la proliferación	-14.12	-5.25
CDC25C	Control de la proliferación	-6.32	--
EGR1	Otros genes relacionados con el crecimiento, proliferación y diferenciación	--	-2.30
HK2	Proliferación celular	-2.79	-3.17
MYC	Proliferación celular	-5.54	-2.65
NFKB1	Proliferación celular, anti-apoptosis, inflamación	-25.11	-12.41
PRC1	Proliferación celular	-4.63	-1.05
MDM2	Regulación negativa de la proliferación, inducción de apoptosis	-24.42	-30.55
STAT1	Regulación de la proliferación y apoptosis	-3.39	-2.61
<i>Crecimiento celular y reparación de ADN</i>			
BRCA1	Gen supresor de tumores, reparación de ADN	-20.11	-8.19
BRCA2	Gen supresor de tumores, reparación de ADN	-6.41	-5.25
DNMT1	Regulación de la metilación de citocinas, reparación de ADN	-17.39	-32.30
PPM1D	Crecimiento celular y anti-apoptosis	--	-2.09
XRCC5	Reparación de ADN	-2.23	-4.67

Los resultados se normalizaron con respecto a genes control, los valores representan el grado de regulación de los ARNm en células HT-29 tratadas respecto al control. P = 0.05 comparado con el control. -- No aplica.

Un tumor puede progresar por defectos en moléculas que regulan el ciclo celular, como P53 y otras del control de la progresión del ciclo celular, a menos que todos los daños del ADN hayan sido reparados. Sin embargo, la mutación de p53 (TP53) en células HT-29 provoca que se pierda su función, situación asociada con la inmortalización *in vitro* e *in vivo* en el desarrollo de cáncer (Peralta-Zaragoza *et al.*, 1997). Rodrigues y colaboradores (1990) demostraron que las células HT-29 tienen mutaciones como resultado de la desaminación de una citosina metilada en la región CpG del gen p53 (codón 273), por lo que las células HT-29 sobreproducen mutantes de p53. Interesantemente, este gen presentó la mayor regulación negativa tanto por el tratamiento con el EFFND como por los AGCC (-84.45 y -42.62, respectivamente. Cuadro 9). Un efecto similar fue observado por Campos-Vega y colaboradores (2010) después del tratamiento con el extracto de la fermentación de polisacáridos de frijol común cultivar Bayo Madero en células HT-29, sugiriendo que la modulación de la expresión del gen p53 mutado como un mecanismo por parte de compuestos no digeribles en el frijol común sobre dicha línea celular.

La sobrevivencia celular en la progresión del cáncer se apoya en varios mecanismos, tales como la proliferación, la falta de apoptosis, diferenciación y la reparación del ADN. La progresión del ciclo celular se estimula por la actividad de varias CDKs (quinasas dependientes de ciclinas), que pueden ser controladas por las ciclinas y sus inhibidores CKIs (CDK de serotonina), entre otros mecanismos. El buen funcionamiento del proceso del ciclo celular requiere de cambios en los complejos de enzimas, como las que se forman entre dos proteínas: las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas (CDK). Las cinasas son enzimas que fosforilan las proteínas, un acontecimiento importante en la regulación del ciclo celular. Los complejos CDK-ciclina conducen a las células de una fase del ciclo celular a otra. Por lo tanto, la dinámica del ciclo dependerá de las formas activas o inactivas de los complejos CDK-ciclina, además del control de los inhibidores de ciclinas (CKI) (Sherr, 1993).

Durante la transición de la fase G1 a S, diferentes sustratos pueden ser objetivo de los complejos CDK-ciclina, como el supresor de tumores Rb, que está asociado con el factor de transcripción E2F. Cuando la proteína codificada por este gen (pRb) se fosforila, el E2F se libera durante la fase G1 para participar en la transcripción de varios genes implicados en el progreso del ciclo celular (Peralta-Zaragoza *et al.*, 1997). Varios estudios han demostrado que la Rb también actúa como un regulador de la diferenciación y el desarrollo. Además, el complejo E2F-Rb reprime activamente la transcripción de los promotores que contienen los sitios E2F. El ensamblaje del complejo represor (Rb-E2F) sobre los promotores es fundamental para la inhibición del crecimiento mediada por Rb (Zhang and Dean, 2001). En este estudio, el gen RB fue inducido (3.36 y 2.26 veces por el EFFND y SCFA, respectivamente. Cuadro 8), mientras que E2F fue inhibido por ambos tratamientos (-5.54 y -5.40 veces por el EFFND y la mezcla de AGCC, respectivamente. Cuadro 9), sugiriendo su participación en la restricción del ciclo celular.

Cuando la ciclina D se asocia con la CDK4, se activa este complejo y es responsable de la primera fosforilación de Rb en la fase G1 (Coqueret, 2002). Otra regulación de este complejo se lleva a cabo por los inhibidores de CDK, como la citocina TGF-beta, el cual inhibe el crecimiento mediante el arresto del ciclo celular, como resultado de la inhibición de la CDK4 por el incremento de su nivel de fosforilación de la tirosina. La fosforilación de la tirosina y la inactivación de CDK4/6 en células epiteliales mamarias resultan de la acción represora de los factores de crecimiento sobre la expresión de fosfatasa CDC25A (Lavarone y Massagué, 1997). En este estudio, la CDK4 fue inhibida en su expresión (-1,19 y -1,07 veces. Cuadro 9) tanto por el EFFND como por los AGCC, lo que sugiere un posible arresto del ciclo celular en G1-S fase.

La fosforilación y desfosforilación de las proteínas CDK son otros mecanismos de regulación para la progresión del ciclo celular. La CDC25 elimina los fosfatos inhibidores de los residuos específicos de tirosina y treonina en el

dominio de unión del ATP de las proteínas CDK, por lo tanto, inhibe la activación de estas quinasas. La sobreexpresión de CDC25A juega un papel fundamental en el establecimiento de fenotipos transformados, por lo general se caracteriza por la progresión del ciclo celular sin restricciones y/o la muerte celular suprimida. La expresión de CDC25A también podría afectar la capacidad de respuesta de las células de cáncer al estrés oxidativo y/o genotóxico causados por terapias contra el cáncer (Zou *et al.*, 2001).

A medida que las células se aproximan a la fase-M, la fosfatasa CDC25A se activa y por lo tanto activa a CDC2 (CDK1). En animales, la CDC2 se asocia con las ciclinas tipo A y B. El complejo CDC2-Ciclina B es capaz de establecer una retroalimentación que conduzca a las células de modo eficiente a la mitosis (Mailand *et al.*, 2002). Este complejo debe entrar al núcleo para que la CDC2 se fosforile en la treonina 161 por una cinasa y de este modo se active (Fesquet *et al.*, 1993; Poon *et al.*, 1993; Draetta y Eckstein, 1997). Por otro lado, la fosforilación inhibitoria de tal complejo es contrarrestada por la CDC25, ya que desfosforila la tirosina 15 y treonina 14 de la CDC2 entre las fases G2/M (Draetta y Eckstein, 1997) En este estudio la CDC25A (-14.12 y -5.25 veces, Cuadro 9) y CDC2 (-3.16 y -9.15 veces, Cuadro 9) se regularon negativamente con el EFFND y los AGCC, lo que sugiere que ambos tratamientos pueden haber inducido el arresto del ciclo celular, tanto en la fase G1-S como en la G2-Mitosis.

Ambos tratamientos también regularon negativamente otros genes (Cuadro 9) relacionados con la proliferación, como el factor de transcripción de citocinas STAT1 (-3.39 y -2.61 veces), PRC1 (-4.63 y -1.05 veces) el cual codifica para una proteína del ciclo celular que juega un papel importante durante la citocinesis (Li *et al.*, 2004), así como la hexocinasa II (HK2) (-2.79 y -3.17 veces), que participa en la glucólisis, un proceso esencial para mantener la proliferación celular (Katabi *et al.*, 1999). Una modulación similar se observó cuando las células HT-29 fueron tratadas con un extracto de la fermentación de polisacáridos del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero (Campos-Vega *et al.*, 2010), lo que

demuestra el efecto inhibitor de la progresión del ciclo celular por los compuestos derivados de la fermentación del frijol común.

La SIRT1 pertenece a un grupo de proteínas con actividad deacetilasa dependiente de NAD⁺ y que puede estimularse por los polifenoles en células HT-29 (de Boer *et al.*, 2006) y en células HeLa (Howitz *et al.*, 2003). Ya que esta deacetilasa puede inhibir la actividad de NFκB, puede considerarse también como anti-proliferativa (Yeung *et al.*, 2004, Saunders y Verdin 2007, Kabra *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que la SIRT1 inhibe el crecimiento del cáncer de colon en modelos de ratón (Firestein *et al.*, 2008). La expresión de este gen fue inducido tanto por el EFFND como por la mezcla de AGCC (29.86 y 14.19 veces, respectivamente. Cuadro 8), lo que implica que la regulación de este gen puede ser un mecanismo mediante el cual se inhibe la sobrevivencia de la células HT-29.

La muerte celular genéticamente programada (apoptosis) puede ser activada por varias moléculas, como el TNF-α (factor de necrosis tumoral alfa), una citocina proinflamatoria multifuncional considerada como agente anticáncer, el cual juega un papel importante en varios procesos fisiológicos y patológicos a través de la regulación del crecimiento, diferenciación y apoptosis (Basile *et al.*, 2003). La línea celular HT-29 es un modelo común de diferenciación de células epiteliales y cáncer colorrectal, y su muerte se analiza frecuentemente en el campo del TNF como un sistema de ensayo (Wilson y Browning 2002; Basile *et al.*, 2003). La proteína codificada por este gen actúa mediante su unión a receptores de superficie de las células epiteliales. Por ejemplo, el TNFR1 (TNF receptor-1) expresado en todos los tejidos humanos es el principal receptor de señalización de TNF-α, cuando se une al TNF-α, esta molécula forma un trímero y recluta una proteína adaptadora, TRADD, iniciando la cascada de caspasas que resulta en la apoptosis (Tartaglia *et al.*, 1993). Este receptor fue regulado positivamente después de los tratamientos EFFND y AGCC (8.46 y 3.11 veces,

Cuadro 8), lo que permite sugerir una de las vías por las que las células de adenocarcinoma de colon pueden desencadenar la muerte celular.

FASLG (regulado 2.13 y 4.55 veces por el EFFND y la mezcla de AGCC, respectivamente. Cuadro 8) es una glicoproteína (ligando) transmembranal que se expresa las células de cáncer de colon (incluyendo HT-29), y que también puede inducir la apoptosis mediante la unión a su receptor de membrana Fas (perteneciente a la familia TNFR) (Moller *et al.*, 1994). Algunos compuestos, como el butirato de sodio, sensibiliza a las células cancerígenas (incluyendo HT-29) a la apoptosis mediada por Fas independiente de P53 (Bonnotte *et al.*, 1998, Chopin *et al.*, 2002), lo que sugiere esta vía como un mecanismo en la inducción extrínseca de la apoptosis para ambos tratamientos.

Sin embargo, la apoptosis también puede llevarse a cabo a través de la vía mitocondrial por varias moléculas pro-apoptóticas, tales como BID (positivamente regulado 32 y 19.12 veces por el EFFND y la mezcla sintética de AGCC, Cuadro 8). Esto modifica la mitocondria mediante la interacción con Bak y estimula la apertura de la membrana mitocondrial, liberando el citocromo-C para que éste se una con APAF-1 y formen el complejo llamado apoptosoma, necesario para la activación de la caspasa-9 (CASP9) y, de esta manera, activar las caspasas ejecutoras que conducen a la apoptosis (Henderson *et al.*, 2003). APAF-1 (el gen mayormente regulado por el EFFND, 108.38 veces) es un regulador clave de la apoptosis mitocondrial, cuya expresión transcripcional se pierde o se reduce en las células de adenocarcinoma de colon, lo que implica un mal pronóstico, incluyendo una pobre diferenciación, la invasión del tumor y metástasis (Paik *et al.*, 2007). Por lo que las terapias conducidas a estimular la expresión de este gen son altamente deseables. En este estudio, tanto APAF-1 como la CASP9 fueron regulados positivamente (108.38 y 3.24, 12.73 y 3.38 veces) por los tratamientos EFFND y AGCC, respectivamente (Cuadro 8), lo que sugiere su papel en la inducción de la apoptosis a través de la vía intrínseca.

Otro gen implicado en la inducción de la apoptosis y el arresto del ciclo celular es E124, también conocido como PIG8. Se trata de un gen de respuesta al daño en el ADN que se encuentra en el cromosoma 11q23 humano en una región frecuentemente alterada en varios tumores y que suprime el crecimiento celular mediante la inducción de muerte celular por apoptosis (Gu *et al.*, 2000). Aunque este gen se considera generalmente regulado por P53, en este estudio fue inducido 8.57 veces después del tratamiento con el EFFND en las células HT29 (con P53 mutado) (Cuadro 8). Burns y colaboradores (2001) encontraron que bajo una estimulación apoptótica, los niveles de ARNm del E124 no dependieron de la presencia de P53 en muestra de bazo de ratones, por lo que probablemente este último no juega un papel clave en la apoptosis, lo cual permite sugerir que en las células HT-29 es posible inducir la muerte apoptótica independiente de P53.

Por el contrario, la apoptosis puede ser inhibida por genes anti-apoptóticos, como BCL2A1 (inhibido 5.54 y 1.44 veces después de los tratamientos con el EFFND y AGCC, respectivamente. Cuadro 9), el cual bloquea la cascada de caspasas mediante la interacción con BAX. Además, la expresión de BCL2A1 puede inducirse por NFkB a través de un sitio de unión a éste para activarse (Chen *et al.*, 2004). Patingre y colaboradores (2005) informaron que BCL2A1 también puede inhibir la muerte celular por autofagia mediante la unión a Beclin-1. Por otro lado, se ha demostrado que BCL2A1 puede inhibirse en células HT-29 tras el tratamiento con compuestos antitumorales que se encuentran en los productos alimenticios (Palozza *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2004).

El complejo TNF- α y TRADD (no determinado en este estudio) también pueden unirse a TRAF2, para transmitir la señal de TNF- α a través de NFkB (ampliamente conocido por promover la progresión del cáncer). La proteína codificada por este último es un importante regulador del destino celular por la muerte celular programada y control de la proliferación, y es fundamental en la tumorigénesis (Basile *et al.*, 2003). Además, NFkB puede ser activado por la exposición de células a las citocinas inflamatorias, factores de crecimiento,

radicales libres, entre otros estímulos. La inhibición completa y persistente de NFkB se ha vinculado directamente a la apoptosis y al crecimiento celular retardado (Hinz *et al.*, 1999). Tanto el EFFND- CL₅₀ como AGCC- CL₅₀ (Cuadro 9) regularon negativamente a TRAF2 (-2.85 y -1.63) y NFkB (-25.11 y -12.41), lo que implica que ambos genes pueden estar implicados en la inhibición de la proliferación de células HT-29. El proceso de apoptosis puede ser inhibido por otras moléculas llamadas IAP (proteína inhibidora de la apoptosis), tales como BIRC5 (también conocido como survivina), que fue inhibido (-24.42 veces) después del tratamiento con el EFFND (Cuadro 9) y se ha demostrado que se puede regular negativamente en células HT-29 en respuesta al butirato (Daly *et al.*, 2005).

Por otra parte, la expresión transcripcional de los genes de reparación del ADN, como MSH2 (2.57 y 2.31 veces) y MLH1 (2.06 y 3.31 veces), ATR (4.63 y 3.15 veces), GADD45A (1.18 y 1.42 veces) se indujo tanto por el EFFND como por la mezcla de AGCC, respectivamente (Cuadro 8). Estos resultados son comparables a los reportados previamente para líneas celulares de CCR tratadas con butirato y otros compuestos quimioprotectores (Daly *et al.*, 2005; Campos-Vega *et al.*, 2010). La inducción *in vitro* de genes reparadores del ADN puede servir como base para llevar a cabo estudios *in vivo* a fin de evaluar el efecto quimioprotector de la FND del frijol común en etapas avanzadas del cáncer de colon mediante la regulación positiva de estos genes de reparación del ADN.

Sin embargo, también se encontraron algunos resultados contradictorios en este estudio, tal es el caso de la inducción de la transcripción de algunos genes que promueven la sobrevivencia, tales como CCNE2, CCNG2, E2F3, IL6, KRAS (Cuadro 8), así como la inhibición de genes pro-apoptóticos, como BAX y ESR1 (Cuadro 9). Estos resultados corresponden a situaciones donde la respuesta celular al daño inducido por algunos compuestos o metabolitos activan fisiológicamente la inhibición de la proliferación celular, o bien, tratan de sobreponerse de ésta, entre eventos pro y antiapoptóticos (Iacomino *et al.*, 2001).

Además, en algunos casos se observó la regulación transcripcional con el tratamiento EFFND, no así con la mezcla sintética de AGCC (Cuadros 8 y 9), lo que permite sugerir que las células tratadas con compuestos particulares ejercen un efecto específico sobre la modulación de la expresión génica. Cabe mencionar que el EFFND también contiene compuestos fenólicos y probablemente algunos biopéptidos, lo que sugiere un efecto sinérgico influenciado por el EFFND sobre las células HT-29. Por lo que se sugiere que la composición de la dieta puede influir en la progresión del cáncer colorrectal a través de diversos mecanismos (Potter *et al.*, 1993; Karlsson *et al.*, 2005; Pierart y Rozowsky, 2006; Rodrigo y Riestra, 2007).

8.11 Propuesta del mecanismo de acción molecular para el EFFND y AGCC en células HT-29

En las figuras 15 y 16 se presenta el mecanismo de acción molecular que se sugiere para el EFFND y la mezcla sintética de AGCC en las células HT-29. De acuerdo a los resultados (Cuadros 8 y 9), se puede observar que de manera general, ambos tratamientos modularon de la expresión transcripcional de la mayoría de los genes evaluados, donde el EFFND ejerció un mayor efecto en términos de veces de regulación (positiva y/o negativa).

En la figura 15 se muestra que la inducción transcripcional de los genes RB, GADD45A y ATR; así como la inhibición en la expresión de genes como: NFκB, CDC25A, CDK4, CDC2 (CDK1), CCNB2 (ciclina B), y E2F pueden estar involucrados en el control de la proliferación a través del arresto del ciclo celular entre las fases G1/S y G2/M en las células HT-29.

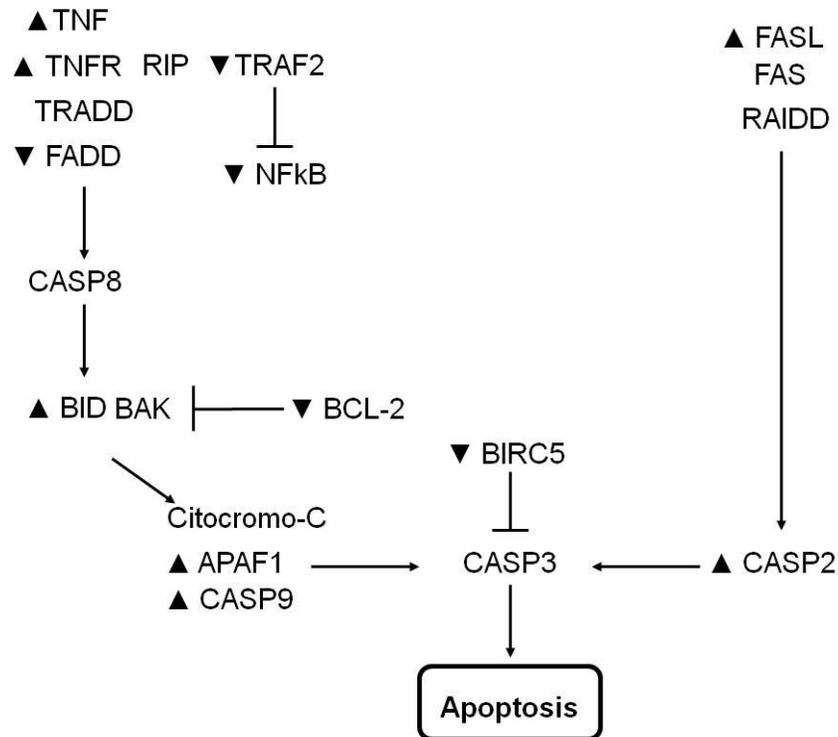


Figura 16. Mecanismo de acción de los tratamientos EFFND-CL₅₀ y AGCC-CL₅₀ en la regulación de genes involucrados en la apoptosis.

Los símbolos indican regulación positiva (▲) o regulación negativa (▼) en la expresión del RNA como derivado del análisis de los arreglos de PCR.

9 CONCLUSIONES

De las tres variedades de frijol común evaluadas, la variedad Negro 8025 presentó mayor contenido de compuestos con potencial nutracéutico, como la fibra dietética total, por lo que fue elegida para la fermentación *in vitro* y evaluar su efecto sobre la sobrevivencia de las células HT-29. Durante el proceso de fermentación *in vitro* la concentración de AGCC en el EFFND proveniente de la fermentación realizada con las heces frescas fue mayor para el ácido acético, seguido del butírico y propiónico. El ácido butírico no se detectó en el EFFND proveniente de las fermentaciones con el inóculo fecal congelado y liofilizado, lo que no hace recomendable el uso de heces en estas últimas condiciones, por lo

anterior se sugiere buscar alternativas que permitan la reactivación de las bacterias en dicha materia fecal.

La inhibición del crecimiento de las células HT-29 por el EFFND fue dependiente de la concentración, con una CL_{50} equivalente a 7.36 mmol, 0.33 y 3.31 mmol de ácido acético, propiónico y butírico, respectivamente.

En conjunto, se demostró que el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025 tiene un efecto inhibitor en la sobrevivencia de células de adenocarcinoma de colon a través del extracto de la fermentación *in vitro* de su fracción no digerible (EFFND). Asimismo, se observó que los AGCC juegan un papel importante en el efecto ejercido por el EFFND en la sobrevivencia de las células HT-29 a través de la inducción de la muerte celular por apoptosis (fragmentación del ADN).

Se sugiere que el mecanismo de acción molecular de los tratamientos evaluados (EFFND y mezcla de AGCC) se efectuó mediante la regulación de genes implicados en la apoptosis (BAX, BCL-2, BID, CASP9, TNF) y la inhibición de la proliferación de células HT-29 (CDC2, CDC25A, E2F, NFKB, RB, TP53). Cabe señalar que la mayoría de los genes determinados en este estudio fueron regulados por el EFFND, y en menor medida, por la mezcla sintética de AGCC, lo que sugiere la participación sinérgica de otros compuestos, probablemente derivados fenólicos de los ácidos grasos y biopéptidos.

Por otra parte, este estudio también provee información que puede servir como base para el estudio *in vivo* de la inducción de genes relacionados con la reparación del ADN (MLH1, MSH2 y GADD45A), la cual puede ser uno de los mecanismos moleculares por los que el EFFND y los AGCC tienen efecto quimioprotector en el cáncer de colon.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamse, S. L., B. L. Pool-Zobel, and G. Rechkemmer, 1999. Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration in isolated rat colon cells. *Carcinogenesis*. 20:629-634.
- Ahn, Y. J., S. Sakanata, M. Kim, T. Dawamura, T. Fujisawa, and T. Mitsuoka. 1993. Effect of green tea extract on growth of intestinal bacteria. *Microb. Ecol. Health Dis.* 6:3-9.
- Anaya J. 2003. Descripción Molecular del TNF- α . *Reumatología*. 2: 112-120.
- Anderson, J. W., and S. R. Bridges. 1984. Short-chain fatty acid fermentation products of plant fiber affect glucose metabolism of isolated rat hepatocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 177: 372-376.
- AOAC. 2002. Official methods of analysis (13a Ed.). Association of Official Analytical Chemist. Washington, D.C.
- Aparicio, F. X., B. L. Manzano, and G. Loarca-Piña. 2005. Comparison of Antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and storage common beans *Phaseolus vulgaris* against aflatoxina B₁. *J. Food Sci.* 70: 73-78.
- Archer, S. Y., J. Johnson, H. J. Kim, Q. Ma, H. Mou, V. Daesety, S. Meng and R. A. Hodin. 2005. The histone deacetylase inhibitor butyrate downregulates cyclin B1 gene expression via a p21/WAF-1-dependent mechanism in human colon cancer cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 289: 696-703.
- Asp, N.G. 1992. Resistant starch. Proceedings from the second plenary meeting of EURESTA. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46:S1-148.
- Asp, N. G., J. M. M. Van Amelsvoort, and J. G. A. J. Hautvast. 1996. Nutritional implications of resistant starch. *Nutr. Res. Rev.* 9:1-31.
- Avivi-Green, C., S. Polak-Charcon, Z. Madar, and B. Schwartz. 2000. Dietary regulation and localization of apoptosis cascade proteins in the colonic crypt. *J. Cell. Biochem.* 77:18-29.
- Baghurst, P. A., K. I. Baghurst, and S. J. Record. 1996. Dietary fiber, non-starch polysaccharides and resistant starch - a review. *Food Aust.* 48:3-35.

- Baker, S. J., A. C. Preisinger, J. M. Jessup, C. Paraskeva, S. Markowitz, J. K. Willson, S. Hamilton, and B. Vogelstein. 1990. *Cancer Res.* 50:7717-7722.
- Balbarrey, H. I., J. C. Picena, C. A. Poy, and E. E. Guibert. 2001. Apoptosis e insuficiencia cardíaca. *Rev. Fed. Arg. Cardiol.* 30:71-77.
- Barry, J. L., L. C. Hoebler, G. T. MacFarlane, S. MacFarlane, S. Mathers, K. A. Reed, P. B. Mortensen, I. Nordgaard, I. R. Rowland, and C. J. Rumney. 1995. Estimation of the fermentability of dietary fiber in vitro: a European interlaboratory study. *Br. J. Nutr.* 74:303-322.
- Basile J. R., A. Eichten, V. Zacny and K. Münger. 2003. NF-KB-Mediated Induction of p21Cip1/Waf1 by Tumor Necrosis Factor A Induces Growth Arrest and Cytoprotection in Normal Human Keratinocytes. *Mol. Cancer Res.* 1:262-270.
- Bauer-Marinovic M., S. Florian, K. Müller-Schmehl, H. Glatt, and G. Jacobasch 2006. Dietary resistant starch type 3 prevents tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine and alters proliferation, apoptosis and differentiation in rat colon. *Carcinogenesis.* 27:1849-1859.
- Baylin, S. B., and J. E. Ohm. 2006. Epigenetic gene silencing in cancer, a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat. Rev. Cancer.* 6: 107-116.
- Bazzano, L., J. He, L. Ogden, C. Loria, S. Vupputuri, L. Myers, and P. Whelthon. 2001. Legume consumption and risk of coronary heart disease in U.S. men and women. *Arch. Intern. Med.* 161: 2573-2578.
- Bednar, G., A. Patil, S. Murray, C. Grieshop, N. Merchen, and G. Fahey. 2001. Starch and fiber fractions in selected foods and feed ingredients affect their small intestine digestibility and fermentability and their large bowel fermentability *in vitro* in a canine modelo. *J. Nutr.* 131:276-286.
- Belenguer, A., S. Duncan, G. Holtrop, S. Anderson, G. Lobley, and H. Flint. 2007. Impact of pH on lactate formation and utilization by human fecal microbial communities. *Appl. Environ. Microb.* 73: 6526-6533.
- Beninger, C. W., and G. L. Hosfield. Flavonoid composition of three genotypes of dry bean (*Phaseolus Vulgaris*) differing in seed coat color. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 1999. 124: 514-518.
- Beninger, C. W., and G. L. Hosfield 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.

- Bermúdez, M., M. Larrosa, J. García, J. C. Espina, F. Tomás, and M. García. 2007. Up-regulation of tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in human colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of a polyphenol-rich chokeberry juice. *J. Nutr. Biochem.* 18: 259-271.
- Bernhaus A., M. Fritzer-Szekeres, M. Grusch, P. Saiko, G. Krupitza, S. Venkateswarlu, G. Trimurtulu, W. Jaeger, T. Szekeres. 2009. Digalloylresveratrol, a new phenolic acid derivative induces apoptosis and cell cycle arrest in human HT-29 colon cancer cells. *Cancer Lett.* 274: 299-304.
- Beyer-Sehlmeyer G., M. Gleib, E. Hartmann, R. Hughes, C. Persin, V. Böhm, I. Rowland, R. Schubert, G. Jahreis, and B. Pool-Zobel. 2003. Butyrate is only one of several growth inhibitors produced during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre sources. *Brit. J. Nutr.* 90:1057-70.
- Bises G., E. Bajna, T. Manhardt, W. Gerdenitsch, and E. Kallay. 2007. Gender-specific modulation of markers for premalignancy by nutritional soy and calcium in the mouse colon. *J. Nutr.* 137:211–215.
- Boatright, K. M. 2003. A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell* 11:529-541.
- Bobe, G., K. G. Barrett, R. A. Mentor-Marcel, U. Saffiotti, M. R. Young, N. H. Colburn, P. S. Albert, M. R. Bennink, E. Lanza. 2008. Dietary cooked navy beans and their fractions attenuate colon carcinogenesis in azoxymethane-induced ob/ob mice. *Nutr. Cancer.* 60:373-381.
- Bodmer, J. L., N. Holler, S. Reynard, P. Vinciguerra, P. Schneider, P. Juo, J. Blenis, and J. Tschopp. 2000. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat. Cell Biol.* 2:241–243.
- Bonnotte B., N. Favre, S. Reveneau, O. Micheau, N. Droin, C. Garrido, A. Fontana, B. Chauffert, E. Solary, and F. Martin. 1998. Cancer cell sensitization to Fas-mediated apoptosis by sodium butyrate. *Cell Death and Differ.* 5:480-487.
- Bourdon, I., B. Olson, R. Backus, B. D. Richter, P. A. Davis, and B. O. Schneeman. 2001. Beans, as a source of dietary fiber, increase cholecystokinin and apolipoprotein B48 response to test meals in men. *J. Nutr.* 131: 1485-1490.
- Bourdon, J.C. 2007. p53 and its isoforms in cancer. *Br. J. Cancer.* 97:277-282.
- Boyer, J. and R. H. Liu. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr. J.* 3:5-19.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bravo, L., P. Siddhuraju, and F. Saura-Calixto. 1998. Effect of various processing methods on the *in vitro* starch digestibility and resistant starch content of Indian pulses. *J. Agric. Food Chem.* 46:4667-4674.
- Bravo, L., P. Siddhuraju, and F. Saura-Calixto. 1999. Composition of underexploited Indian pulses. Comparison with common legumes. *Food Chem.* 64:185-192.
- Brenes, A., B. A. Slominski, R. R. Marquardt, W. Guenter, and A. Viveros. 2003. Effect of Enzyme Addition on the Digestibilities of Cell Wall Polysaccharides and Oligosaccharides from Whole, Dehulled, and Ethanol-Extracted White Lupins in Chickens. *Poult. Sci.* 82:1716–1725.
- Bressani, R., L. Elías, A. Wolzak, A. Hagerman, and L. Butler. 1983. Tannin in common beans: methods of analysis and effects on protein quality. *J. Food. Sci.* 48:1000-1003.
- Brink, M., A. F. de Goeij, M. P. Weijnenberg, G. M. Roemen, M. H. Lentjes, M. M. Pachen, K. M. Smits, A. P. de Bruïne, R. A. Goldbohm, and P. A. van den Brandt, P.A. 2003. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands cohort study. *Carcinogenesis.* 24:703-710.
- Brown, L., B. Rosner, W. W. Willett, and F. M. Sacks. 1999. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:30–42.
- Burns, T., E. Bernhard, and W. el-Deiry. 2001. Tissue specific expression of p53 target genes suggests a key role for KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis *in vivo*. *Oncogene.* 20:4601-4612.
- Campos-Vega, R. 2009. Caracterización parcial de los productos de la fermentación *in vitro* de polisacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su efecto sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Campos-Vega, R., R. Reynoso-Camacho, R. G. Pedraza-Aboytes, J. A. Acosta-Gallegos, S. H. Guzman-Maldonado, O. Paredes-Lopez, B. D. Oomah, and G. Loarca-Piña. 2009. Chemical composition and *in vitro* polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Sci.* 74:59-65.

- Campos-Vega, R., R. G. Guevara-Gonzalez, L. B. Guevara-Olvera, D. Oomah, and G. Loarca-Piña. 2010. Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polysaccharides modulate gene expression in human colon cancer cells (HT-29). *Food Res.* 47:1057-1064.
- Carbonaro, M., G. Grant, M. Cappelloni, and A. Pusztai. 2000. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: antinutritional compounds or storage proteins? *J. Agric. Food Chem.* 48:742-749.
- Cardador-Martinez, A., G. Loarca-Piña, and B. D. Oomah. 2002a. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus Vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50: 6975-6980.
- Cardador-Martínez, A., E. Castaño-Tostado, G. Loarca-Piña. 2002b. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxina B₁. *Food Addit. Contam.* 19:62-69.
- Castellanos, J. Z., S. H. Guzmán, A. Jiménez, C. Mejía, J. J. Muñoz, J. A. Acosta, G. Hoyos, E. López, D. González, R. Salinas, A. J. González, J. A. Muñoz, P. Fernández, and B. Casares. 1997. Preferential habits of Mexican consumers of common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Arch. Latinoam. Nutr.* 27:163-167.
- Castells, A., y J.M. Piqué. 2000. Tumores intestinales. En: Farreras V, Rozman C. *Medicina Interna.* (14a edición). Harcourt, Madrid. 261-272.
- Castillo, M. M., P. V. Ramírez, F. G. Castillo, y S. C. Miranda. 2006. Diversidad Morfológica de Poblaciones Nativas de Frijol Común y Frijol Ayocote del Oriente del Estado de México. *Revista Fitotecnia Mexicana.* 29:111-119.
- Celleno, L., M. V. Tolaini, A. D'Amore, N. V. Perricone, and H. G. Preuss. 2007. A dietary supplement containing standardized *Phaseolus vulgaris* extract influences body composition of overweight men and women. *Int. J. Med. Sci.* 4:45–52.
- Chen G. G., N.C. Liang, J. F. Lee, U.P.F. Chan, S. H. Wang, B. C. S. Leung and K. L. Leung. 2004. Over-expression of Bcl-2 against Pterissemipinnata L-induced apoptosis of human colon cancer cells via a NF-kappa B-related pathway. *Apoptosis.* 9:619-627.
- Chen, Y., H. Chen, C. Hsu, and G. Yen. 2007. Induction of Apoptosis by the *Lactuca indica* L. in Human Leukemia Cell Line and Its Active Components. *J. Agric. Food Chem.* 55:1743-1749.
- Cho, I., S. Gorina, P. Jeffrey, and N. Pavletich. 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor- DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science.* 265:346-355.

- Choi, I. K., Y. H. Kim, J. S. Kim, and J. H. Seo. 2008. PPAR- γ ligand promotes the growth of APC-mutated HT-29 human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Invest. New Drugs*. 26:283-288.
- Chopin, V., R. A. Toillon, N. Jouy and X. Le Bourhis 2002. Sodium butyrate induces P53-independent, Fas-mediated apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Br. J. Pharmacol.* 135: 79-86.
- Cooke, D., M. Schwarz, D. Boocock, P. Winterhalter, and W. P. Steward. 2006. Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the Apc Min mouse model of intestinal carcinogenesis-relationship with tissue anthocyanin levels. *Int. J. Cancer*. 119:2213–2220.
- Coqueret, O. 2002. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*. 299:35-55.
- Cory, S. and J. M. Adams. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2:647-656.
- Costa, N. M., A. G. Low, A. F. Walker, R. W. Owen, and H. N. Englyst. 1994. Effect of baked beans (*Phaseolus vulgaris*) on steroid metabolism and non-starch polysaccharide output of hypercholesterolaemic pigs with or without an ileo-rectal anastomosis. *Br. J. Nutr.* 71: 871–886.
- Cummings, J. H. and G. T. Macfarlane. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.* 70:443-459.
- Cummings, J.H., G. T. Macfarlane, and H. N. Englyst. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:415-420.
- Cunningham, J. M., E. R. Christensen, D. J. Tester, C. Kim, P.C. Roche, and L. J. Burgart. 1998. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* 58: 3455-3460.
- Dabai, F. D., A. F. Walker, I. E. Sambrook, V. A. Welch, R. W. Owen, and S. Abeyasekera. 1996. Comparative effects on blood lipids and faecal steroids of five legume species incorporated into a semi-purified, hypercholesterolaemic rat diet. *Br. J. Nutr.* 75:557–571.
- Dahm, C.C., R. H. Keogh, E. A. Spencer, D. C. Greenwood, T. J. Key, I. S. Fentiman, M. J. Shipley, E. J. Bruner, J. E. Cade, V. J. Burley, G. Mishra, A. M. Stephen, D. Kuh, I. R. White, R. Luben, M. A. H. Lentjes, K. T. Khaw. 2010. Dietary fiber and colorectal cancer risk: A nested case–control study using food diaries. *J. Natl. Cancer Inst.* 102:614-626.

- Daly, K., M. A. Cuff, F. Fung, and S. P. Shirazi-Beechey. 2005. The importance of colonic butyrate transport to the regulation of genes associated with colonic tissue homeostasis. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 733-735.
- de Almeida-Costa, G. E., K.d.S. Queiroz-Monici, S. M. P. Machado Reis, A. Costa de Oliveira. 2006. Chemical composition, dietary fiber and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chem.* 94:327-330.
- de Boer, V., M. C. de Goffau, I. C. W. Arts, P. C. H. Hollman, J. Keijer. 2006. SIRT1 stimulation by polyphenols is affected by their stability and metabolism. *Mech. Ageing Dev.* 127:618–627.
- Delzenne, N., and N. Kolk. 2001. Effects of fructans on lipid metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:456-458.
- Delzenne, N., C. Cherbut, and A. Neyrinck. 2003. Prebiotics: actual and potential effects in inflammatory and malignant colonic diseases. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 6:581–586.
- Déprez, S., C. Brezillon, S. Rabot, C. Philippe, I. Mila, C. P. Lapiere, and A. Scalbert. 2000. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by a human colonic microflora into low molecular weight phenolic acids. *J. Nutr.* 130: 2733-2738.
- Deshpande, S. S. and M. Cheryan. 1983. Changes in phytic acid, tannins and trypsin inhibitory activity on soaking of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Nutr. Rep. Int.* 27:371-377.
- Deshpande, S. S., M. Cheryan. 1985. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. *J. Food Sci.* 50:905–910.
- Díaz-Rubio, M.E., and F. Saura-Calixto. 2007. Dietary fiber in brewed coffee. *J. Agric. Food Chem.* 55: 1999-2003.
- Diez, M., J.M. Enriquez, J. Camuas, A. González, A. Gutierrez, and J. M. Mugerza. 1995. Prediction of recurrence in B-C stages of colorectal cancer by p53 protein nuclear expression in comparison with standard pathological features. *Eur. J. Surg. Oncol.* 21:635-639.
- Diez, M., M. J. Medrano, J. M. Mugerza, P. Ramos, P. Hernandez, and R. Villeta. 2000. Influence of tumor localization on the prognostic value of P53 protein in colorectal adenocarcinomas. *AntiCancer Res.* 20:3907-12.

- Diez-Alonso, M., J. Pérez Piqueras, y A. Martín Duce. 2001. Marcadores tumorales de valor pronóstico en adenocarcinomas de colon y recto. *Gastroenterología Int.* 2:207-221.
- Divisi, D., S. Di Tommaso, S. Salvemini, M. Garramone, and R. Crisci. 2006. Diet and cancer. *Acta Biomed.* 77:118-123.
- Dommels, Y. E., M. M. Haring, N. G. Keestra, G.M. Alink, P.J. van Bladeren, and B. van Ommen. 2003. The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE2 synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines. *Carcinogenesis.* 24:385-392.
- Draetta, G., and J. Eckstein. 1997. Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1332:53-63.
- el-Deiry, W., T. Tokino, V. Velculescu, D. Levy, R. Parsons, J. Trent, D. Lin, W. Mercer, K. Kinzler, and B. Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 75: 817-825.
- Emenaker, N. J., and M. D. Basson. 2001. Short chain fatty acids differentially modulate cellular phenotype and c-myc protein levels in primary human nonmalignant and malignant colonocytes. *Dig. Dis. Sci.* 46:96-105.
- Englyst, H. N., S. M. Kingman, and J. H. Cummings. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46:33-50.
- Escudero, E. A., y P. S. González. 2006. La fibra dietética. *Nutr. Hosp.* 21:61-72.
- Fearon, E. R., and B. Vogelstein. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.
- Feregrino-Perez, A. A., L. C. Berumen, G. Garcia-Alcocer, R. G. Guevara-Gonzalez, M. Ramos-Gomez, R. Reynoso-Camacho, J. A. Acosta-Gallegos, G. Loarca-Piña. 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.
- Ferguson, L. R., R. R. Chavan, and P. J. Harris. 2001. Changing concepts of dietary fiber: implications for carcinogenesis. *Nutr. Cancer.* 39:155-169.
- Fesquet, D., J. C. Labbe, J. Derancourt, J. P. Capony, S. Galas, F. Girard, T. Lorca, J. Shuttleworth, M. Doree, J. C. Cavadore. 1993. The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *EMBO J.* 12:3111-3121.

- Financiera Rural. 2009. Monografía frijol. <http://www.financierarural.gob.mx>
- Firestein, R., G. Blander, S. Michan, P. Oberdoerffer, S. Ogino, J. Campbell, A. Bhimavarapu, S. Luikenhuis, R. de Cabo, C. Fuchs. W. C. Hahn, L. P. Guarente, D. A. Sinclair. 2008. The SIRT1 Deacetylase Suppresses Intestinal Tumorigenesis and Colon Cancer Growth. PLoS ONE 3(4): e2020. doi:10.1371/journal.pone.0002020
- Franke, A. A., L. J. Custer, R. V. Cooney, Y. Tanaka, and M. Xu. 2002. Inhibition of colonic aberrant crypt formation by the dietary flavonoids (+)-catechin and hesperidin. Adv. Exp. Med. Biol. 505:123-133.
- Fu, H., Shi, Y. Q. and S. J. Mo. 2004. Effect of short-chain fatty acids on the proliferation and differentiation of the human colonic adenocarcinoma cell line Caco-2. Chin. J. Dig. Dis. 5:115–117
- García-Peris, P., I. Bretón-Lesmes, C. de la Cuerda-Compes, y M. Cambolor-Álvarez. 2002. Metabolismo colónico de la fibra. Nutr. Hosp. 17:11-16.
- Gartel, A., M. Serfas, and A. Tyner. 1996. P21-negative regulator of the cell cycle. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 213:138-149.
- Gibbs B., and I. Alli. 1998. Characterization of a purified alpha-amylase inhibitor from white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). Food Res. Int. 31:217-225.
- Gibson, G. R., A. Willems, S. Reading, and M. D. Collins. 1996. Fermentation of non-digestible oligosaccharides by human colonic bacteria. Proc. Nutr. Soc. 55:899-912.
- Glade, M. J. 1999. Food nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Nutrition. 15:523-526.
- González de Mejía, E., E. Castaño-Tostado, and G. Loarca-Piña. 1999. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 441:1-9.
- Goñi, I., M. Gudiel-Urbano, L. Bravo, and F. Saura-Calixto 2001. Dietary modulation of bacterial fermentative capacity by edible seaweeds in rats. J. Agric. Food Chem. 49:2663-2668.
- Goñi, I., N. Martin, and F. Saura-Calixto. 2005. In vitro digestibility and intestinal fermentation of grape seed and peel. Food Chem. 90:281–286.

- Granito, M., M. Champ, A. David, C. Bonnet, and M. Guerra. 2001. Identification of gas-producing components in different varieties of *Phaseolus vulgaris* by *in vitro* fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 81:543-550.
- Granito, M., M. Champ, M. Guerra, and J. Frias. 2003. Effect of natural and controlled fermentation on flatus-producing compounds of beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Sci. Food Agric.* 83: 1004-1009.
- Griffith, T. S., W. A. Chin, G. C. Jackson, D. H. Lynch, and M. Z. Kubin. 1998. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J. Immunol.*, 161: 2833–2840.
- Gu, Z., C. Flemington, T. Chittenden, and G. Zambetti. 2000. *ei24*, a p53 Response Gene Involved in Growth Suppression and Apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 20: 233–241.
- Gudiel-Urbano, M. and I. Goñi. 2002. Effect of edible seaweeds (*Undaria pinnatifida* and *Porphyra tenera*) on the metabolic activities of intestinal microflora in rats. *Nutr Res.* 22:323-331.
- Guillon, F., and M. M. Champ. 2002. Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *Br. J. Nutr.* 88:293-306.
- Guzmán-Maldonado, S. H., and O. Paredes-López. 1999. Biotechnology for the improvement of nutritional quality of food crop plants. In: *Molecular Biotechnology for Plant Food Production*; Paredes-López, O., (Ed.). Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster, PA.
- Han, I. H. and B. K. Baik. 2006. Oligosaccharide content and composition of legumes and their reduction by soaking, cooking, ultrasound, and high hydrostatic pressure. *Cereal Chem.* 83:428–433.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57-70.
- Hangen, L., and M. R. Bennink. 2002. Consumption of Black Beans and Navy Beans (*Phaseolus vulgaris*) Reduced Azoxymethane-Induced Colon Cancer in Rats. *Nutr.Can.* 44:60–65.
- Haupt, S., M. Berger, Z. Goldberg, and Y. Haupt. 2003. Apoptosis: the p53 network. *J. Cell Sci.* 116:4077–4085.
- He, L., X. Li, H. S. Luo, H. Rong, and J. Cai. 2007. Possible mechanism for the regulation of glucose on proliferation, inhibition and apoptosis of colon cancer cells induced by sodium butyrate. *World J. Gastroenterol.* 13:4015-18.

- Henderson, C., M. Mizzau, G. Paroni, R. Maestro, C. Schneider, and C. Brancolini. 2003. Role of caspases, Bid, and p53 in the apoptotic response triggered by histone deacetylase inhibitors trichostatin-A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *J. Biol. Chem.* 278:12579-12589.
- Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407:770–776.
- Higgins, J. A., D. R. Higbee, W. T. Donahoo, I. L. Brown, M. L. Bell, and D. H. Bessesen. 2004. Resistant starch consumption promotes lipid oxidation. *Nutr. Metab.* 1:8-19.
- Hinz, M., D. Krappmann, A. Eichten, A. Heder, C. Scheidereit, and M. Strauss. 1999. NF- κ B Function in Growth Control: Regulation of Cyclin D1 Expression and G0/G1-to-S-Phase Transition. *Mol. Cell Biol.* 19:2690-2698.
- Holtug, K., M. R. Clausen, H. Hove, J. Christiansen, and P. B. Mortensen. 1992. The colon in carbohydrate malabsorption: Short-chain fatty acids, pH, and osmotic diarrhea. *Scand. J. Gastroenterol.* 27:545-552.
- Hossain, Z., H. Kurihara, M. Hosokawa, and M. Takahashi. 2005. Butyrate-induced growth inhibition and differentiation in CaCo-2 cells with hybrid liposomes. *J. Oleo. Sci.* 54:281-288.
- Hove, H., and P. B. Mortensen. 1995. Colonic lactate metabolism and D-lactate acidosis. *Dig. Dis. Sci.* 40:320-330.
- Howitz, K. T., K. J. Bitterman, H. Y. Cohen, D. W. Lamming, S. Lavu, J. G. Wood, R. E. Zipkin, P. Chung, A. Kisielewski, L. L. Zhang, B. Scherer, and D. A. Sinclair. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 425:191–196.
- Hsu, H., H. B. Shu, M. G. Pan, and D. V. Goeddel. 1996. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell.* 84:299-308.
- Hughes, R., E. A. M. Magee, S. Bingham. 2000. Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 1: 51-58.
- Iacomino, G., M. F. Tecce, C. Grimaldi, M. Tosto, and G. L. Russo. 2001. Transcriptional response of a human colon adenocarcinoma cell line to sodium butyrate. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 285:1280-1289.

- Ilyas, M. T. 1996. Genetic pathways in colorectal cancer. *Histopathology*. 28:389-399.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2008. Colorectal Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/colorectal.asp>
- Inan, M. S., R. J. Rasoulpour, L. Yin, A. Hubbard, D. W. Rosenberg, and C. Giardina. 2000. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF- κ B activity in human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*. 118:724-734.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadísticas, Geografía e Informática. 2008. Estadísticas vitales.
- Iniestra, J. G., F. P. Ibarra, J. I. Gallegos, N. G. Rocha, and R. L. González. 2005. Antinutritional factors and antioxidant activity in improved Varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia*. 39: 603-610.
- Islam, F. M. A., J. Rengifo, R. J. Redden, K. E. Basford, and S. E. Beebe. 2003. Association between seed coat polyphenolics (tannins) and disease resistance in common bean. *Plant Foods Hum. Nutr.* 58:285-297.
- Iavarone, A., and J. Massagué. 1997. Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF- β in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature*. 387:417-422.
- Jacinto, C. H., H. S. Hernández, H. R. Aspiroz, and J. A. Acosta. 2002. Characterization of a common bean population of inbred lines regarding cooking quality and some nutritional components. *Agrociencia*. 36: 451-459.
- Jacinto, F.V., and M. Esteller. 2007. Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer. *Mutagenesis*. 22:247-253.
- Jambunathan, R., H. L. Blain, K. S. Dhindsa, L. A. Hussein, K. Kogure, L. Li-Juan, and M. M. Youssef. 1994. Diversifying use of cool season food legumes through processing. In: *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes*. Muehlbauer, F. J. and W. J. Kaiser (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Janicke, B., G. Önning, S. M. Oredsson. 2005. Differential effects of ferulic acid and *p*-coumaric acid on S phase distribution and length of S phase in the human colonic cell line Caco-2. *J. Agric. Food Chem.* 53:6658–6665.
- Jänne, P.A., and R.J. Mayer. 2000. Chemoprevention of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 342:1960-1968.

- Jayaprakasam, B. L., M. Vanisree, Y. Zhang, D. L. Dewitt, M. G. Nair. 2006. Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.* 54:5375–5381
- Jemal, A., T. Murray, E. Ward. 2005. Cancer statistics 2005. *CA Cancer J. Clin.* 55: 10–30.
- Jenkins, D.J.A., M.J. Thorne, K. Camelon. 1982. Effect of processing in digestibility and the blood glucose response: study of lentils. *Am. J. Clin. Nutr.* 36:1093-1101.
- Jo, K.J., J. M. Lee, S. C. Lee, and H. R. Park. 2011. Anticancer activity of persimmon (*Diospyros kaki* L.) calyx extracts on human cancer cells *J. Med. Plant. Res.* 5:2546-2550.
- Jones, P. A., and S. B. Baylin. 2007. The epigenomics of cancer. *Cell.* 128: 683-692.
- Jordán, J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM.* 22:100-106.
- Juan, M. E., U. Wenzel, V. Ruiz-Gutierrez, H. Daniel, J. M. Planas. 2006. Olive fruit extracts inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *J. Nutr.* 136:2553–57.
- Kabagambe, E., A. Baylin, E. Ruiz-Narvarez, X. Siles, and H. Campos. 2005. Decreased Consumption of Dried Mature Beans Is Positively Associated with Urbanization and Nonfatal Acute Myocardial Infarction. *J. Nutr.* 135: 1770–1775.
- Kabra, N., Z. Li, L. Chen, B. Li, X. Zhang, C. Wang, T. Yeatman, D. Coppola, and J. Chen. 2009. Sirt1 Is an Inhibitor of Proliferation and Tumor Formation in Colon Cancer. *J. Biol. Chem.* 284:18210–18217.
- Kahle, K., M. Kraus, W. Scheppach, M. Ackermann, F. Ridder, and E. Richling. 2006. Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Mol. Nutr. Food Res.* 50: 418-423.
- Kanduc, D., A. Mittelman, R. Serpico, E. Sinigaglia, A. A. Sinha, and C. Natale. 2002. Cell death: Apoptosis versus necrosis (review). *Int. J. Oncol.* 21:165-170.
- Karlsson, P., U. Huss, A. Jenner, B. Halliwell, L. Bohlin, and Rafter J. 2005. Human Fecal Water Inhibits COX-2 in Colonic HT-29 Cells: Role of Phenolic Compounds. *J. Nutr.* 135:2343-2349.

- Karppinen, S. 2003. Dietary fibre components of rye bran and their fermentation in vitro, VTT Publications 500:3-34.
- Katabi, M., H. Chan, S. Karp, and G. Batist. 1999. Hexokinase type II: a novel tumor-specific promoter for gene-targeted therapy differentially expressed and regulated in human cancer cells. *Hum Gen Ther.* 10: 155-164.
- Kawabata, K., T. Yamamoto, A. Hara, M. Shimizu, and Y. Yamada. 2000. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Lett.* 157:15–21.
- Kawaii, S., Y. Tomono, E. Katase, K. Ogawa, and M. Yano. 1999. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 896-899.
- Kerwin, S. M. 2004. Soy saponins and the anticancer effects of soybeans and soy-based foods. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* 4:263–272.
- Kestell, P., L. Zhao, S. Zhu, P. J. Harris, L. R. Ferguson. 1999. Studies on the mechanism of cancer protection by wheat bran: effects on the absorption, metabolism and excretion of the food carcinogen 2-amino-3-methylimidazo [4,5-*f*] quinoline (IQ). *Carcinogenesis.* 20:2253-2260.
- Laird, P.W. 2005. Cancer epigenetics. *Hum. Mol. Genet.* 14:65-76.
- Lampe, J. W. 1999. Health effects of vegetables and fruits: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70:174-490.
- Lanza, E., T.J. Hartman, and P.S. Albert. 2006. High dry bean intake and reduced risk of advanced colorectal adenoma recurrence among participants in the polyp prevention trial. *J Nutr.* 136:1896 -903.
- Le Leu, R.K., I. L. Brown, Y. Hu, T. Morita, A. Esterman, and G. P. Young. 2007. Effect of dietary resistant starch and protein on colonic fermentation and intestinal tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis.* 28:240-245.
- Lea, M.A., V. M. Randolph, and S. K. Hodge, 1999. Induction of histone acetylation and growth regulation in erythroleukemia cells by 4-phenylbutyrate and structural analogs. *Anticancer Res.* 19:1971-1976.
- Lewis, J. D. 2000. Prevention and treatment of colorectal cancer: Pay now or pay later. *Ann. Intern. Med.* 133: 647-649.
- Li, C., M. Lin, and J. Liu. 2004. Identification of PRC1 as the p53 target gene uncovers a novel function of p53 in the regulation of cytokinesis. *Oncogene.* 23:9336–9347.

- Li, C. J., and T. H. Elsasser. 2005. Butyrate-induced apoptosis and cell cycle arrest in bovine kidney epithelial cells: Involvement of caspase and proteasome pathways. *J. Anim. Sci.* 83:89–97.
- Li, X., H. S. Luo, S. C. Paul, T. Tang, and G. J. Yuan. 2006. Downregulation of the expression of GLUT1 plays a role in apoptosis induced by sodium butyrate in HT-29 cell line. *Int. J. Mol. Sci.* 7:59-70.
- Lim, D. Y., Y. Jeong, A. L. Tyner, and J. H. Y. Park. 2007. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292:66–75.
- Liu, R. H. 2003. Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 517-520.
- Liu, R. H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr.* 134:3479- 3485.
- Lodish, H., A. Berk, S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. E. Darnell. 2003. *Biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Paramericana. México, D.F.
- Lomanto, L. D., O. L. Ortiz, C. O. Bretón, A. L. Gómez, y V. M. Mesa. 2003. El ciclo celular. *MedUNAB.* 6:21-29.
- MacLachlan, T. K. and W. S. el-Deiry. 2002. Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:9492-9497.
- Mallillin, A. C., T.P. Trinidad, R. Raterta, K. Dagbay, and A. S. Loyola. 2008. Dietary fiber and fermentability characteristics of root crops and legumes. *Br. J. Nutr.* 100:485-488.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 1:222-231.
- Mailand, N., A. V. Podtelejnikov, A. Groth, M. Mann, J. Bartek, and J. Lukas. 2002. Regulation of G2/M events by Cdc25A phosphatase through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J.* 21:5921-5929.
- Mateu de Antonio, X. 2004. *La fibra en la alimentación*. Farmacia Hospitalaria. Hospital del Mar. Barcelona. Edikamed S.L. Barcelona.
- Melito, C., and Tovar, J. 1995. Cell walls limit in vitro protein digestibility in processed legumes. *Food Chem.* 53:305-307.

- Moller, P., K. Koretz, F. Leithauser, S. Brüderlein, C. Henne, A. Quentmeier, and P. H. Krammer. 1994. Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int. J. Cancer*. 57: 371-377.
- Moscow, J. A. and K. H. Cowan, 2007. Biology of cancer. In: Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Medicine. (23rd Ed.). Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier.
- Munjal, U., M. Gleib, B. Pool-Zobel, and D. Scharlau. 2009. Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis. *Brit. J. Nutr.* 102:663-671.
- Muñoz-Saldaña, R. 2010. Frijol, rica fuente de proteínas. *Biodiversitas*. 89:7-11.
- Mutoh, M., M. Takahashi, K. Fukuda, Y. Matsushima-Hibiya, and H. Mutoh. 2000. Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure. *Carcinogenesis*. 21:959-963.
- Muzquiz, M., C. Burbano, G. Ayet, M. Pedrosa, and C. Cuadrado. 1999. The investigation of antinutritional factors in *Phaseolus vulgaris*. Environmental and varietal differences. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 3:210-216.
- National Cancer Institute. 2003. Prevention of Colorectal Cancer. Health <http://www.nci.nih.gov>
- Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry. 2003. Life and death decisions. *Science*. 299:214-215.
- Ooi, C. C., N. M. Good, D. B. Williams, T. Lewanowitsch, L. J. Cosgrove, T. J. Lockett, R. J. Head. 2010. Efficacy of butyrate analogues in HT-29 cancer cells. *Clin. Exper. Pharm. Physiol.* 37:482-489.
- Oomah, B. D., A. Cardador-Martinez, G. Loarca-Piña. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L), *J. Sci. Food Agric.* 85:935-942.
- Osorio-Díaz, P., L.A. Bello-Pérez, E. Agama-Acevedo, A. Vergar-Torres, J. Tovar, and O. Paredes-López, 2002. In vitro digestibility and resistant starch content of some industrialized commercial beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Food Chem.* 78:333-337.
- Osorio-Díaz, P., L. A. Bello-Pérez, S. Sáyago-Ayerdi, M.P. Benítez-Reyes, J. Tovar, O. Paredes-López. 2003. Effect of processing and storage time on *in vitro* digestibility and resistant starch content of two bean (*Phaseolus vulgaris* L) varieties, *J. Sci. Food Agric.* 83:1283-1288.

- Paik, S. S., K. S. Jang, Y. S. Song, S. H. Jang, K. W. Min, H. X. Han, W. Na, K. H. Lee, D. Choi, and S. J. Jang. 2007. Reduced Expression of Apaf-1 in Colorectal Adenocarcinoma Correlates with Tumor Progression and Aggressive Phenotype. *Ann. Surg. Oncol.* 14:3453–3459.
- Palozza, P., S. Serini, N. Maggiano, M. Angelini, A. Boninsegna, F. Di Nicuolo, F. Ranelletti, and G. Calviello. 2002. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines by B-carotene through down-regulation of cyclin A and Bcl-2 family proteins. *Carcinogenesis*. 23:11-18.
- Paredes-López, O., y M. E. Valverde. 2006. Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. *Cinvestav*. 25:65-73.
- Park, B. H. and B. Vogelstein, 2003. Tumor-Suppressor Genes. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Chapter 7. Hamilton (ON). BC Decker.
- Park, O. J., N. E. Kang, M. J. Chang, and W. K. Kim. 2004. Resistant starch supplementation influences blood lipid concentrations and glucose control in overweight subjects. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 50:93-99.
- Parone, P., M. Priault, D. James, S. F. Nothwehr, and J. C. Martinou. 2003. Apoptosis: Bombarding the mitochondria. *Essays Biochem.* 39:41–51.
- Pattingre, S., A. Tassa, X. Qu, R. Garuti, X. Huan-Liang, N. Mizushima, M. Packer, M. Schneider, and B. Levine. 2005. Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell*. 122:927–939.
- Peralta-Zaragoza, O., M. Bahena-Román, and V. Madrid-Marina. 1997. Regulación del ciclo celular y desarrollo del cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Publica Mex.* 39:451-462.
- Pérez-Herrera, P., G. E. Esquivel, R. S. Rosales, y J.A. Acosta. 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. *Arch. Latinoam. Nutr.* 52:172-180.
- Pierart, C. Z., and J. N. Rozowsky. 2006. Papel de la nutrición en el cáncer gastrointestinal. 2006. *Rev. Chil. Nutr.* 33:8-13.
- Pierre, F., P. Perrin, M. Champ, F. Bornet, and K. Mefiah. 1997. Short-chain fructooligosaccharides reduce the occurrence of colon tumors and develop gut-associated lymphoid tissue in *Min* mice. *Cancer Res.* 57:225–228.
- Pool-Zobel, B. L. 2005. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *Br. J. Nutr.* 93:73-90.

- Poon, R. Y., K. Yamashita, J. P. Adamczewski, T. Hunt, J. Shuttleworth. 1993. The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *EMBO J.* 12:3123-3132.
- Potter, J. D., M. L. Slattery, R. M. Bostick, and S. M. Gapstur. 1993. Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol. Rev.* 15:499-545.
- Rashid, A., L. Shen, J. S. Morris, J. P. Issa, and S. R. Hamilton. 2001. CpG island methylation in colorectal adenomas. *Am J Pathol.* 159:1129-1135.
- Rechner, A. R., M. A. Smith, G. Kuhnle, G. R. Gibson, E. S. Debnam, K. S. Srani, K. P. Moore, and C. A. Rice-Evans. 2004. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic. Biol. Med.* 36:212-225.
- Reyes-Moreno, C., and O. Paredes-López. 1993. Hard-to-cook phenomenon in common beans, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33:227-286.
- Riganti, C., S. Doublier, C. Costamagna, E. Aldieri, G. Pescarmona, D. Ghigo, and A. Bosia. 2008. Activation of nuclear factor- κ B pathway by simvastatin and RhoA silencing increases doxorubicin cytotoxicity in human colon cancer HT29 cells. *Mol. Pharmacol.* 74:476-484.
- Rodrigo, L., y S. Riestra. 2007. Dieta y cáncer de colon *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 99: 183-189.
- Rodrigues, N. R., A. Rowan, M. E. Smith, I. B. Kerr, W. F. Bodmer, J. V. Gannon, D. P. Lane. 1990. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:7555-7559.
- Rodríguez, L. C., y X. R. Fernández. 2003. Los frijoles (*Phaseolus vulgaris*): su aporte a la dieta costarricense. *Acta Med. Costarricense.* 45:120-125.
- Romani, A., P. Vignolini, C. Galardi, N. Nulinacci, S. Benedettelli, and D. Heimler. 2004. Germplasm characterization of Zolfino landraces (*Phaseolus Vulgaris* L.) by flavonoid content. *J. Agric. Food Chem.* 52:3838-3842.
- Rombeau, J. L. and S. A. Kriple. 1990. Metabolic and intestinal effects of short-chain fatty acids. *JPEN.* 14:181-185.
- Romero, P. E. 1993. El frijol y la alimentación. En: Cuauhtémoc González Pacheco y Felipe Torres Torres (Coord), Los retos de la soberanía alimentaria en México. Tomo I, Instituto de Investigaciones Económicas, UNAM–Juan Pablos, México.

- Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, 2001. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis* 22:1675–1680.
- Rouet-Benzineb, P., T. Aparicio, S. Guilmeau, C. Pouzet, V. Descatoire and M. Buyse. 2004. Leptin counteracts sodium butyrate-induced apoptosis in human colon cancer HT-29 cells via NF- κ B signaling. *J. Biol. Chem.* 279: 16495–16502.
- Ruefli, A. A., M. J. Ausserlechner, D. Bernhard, V. R. Sutton, K. M. Tainton, R. Kofler, M. J. Smyth, and R. W. Johnstone. 2001. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 10833-10838.
- Ruemmele, F.M., Schwartz, S., Seidman, E.G., Dionne, S., Levy, E., Lentze, M.J. 2003. Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut*. 52: 94-100.
- Ryden, P. and J. A. Robertson. 1995. The effect of fibre source and fermentation on the apparent hydrophobic binding properties of wheat bran preparations for the mutagen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) *Carcinogenesis*. 16:209-216.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura y Recursos Pesqueros y de Alimentación. 2000. Situación actual y perspectiva de la producción de frijol en México 1990-2000.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura y Recursos Pesqueros y de Alimentación, 2003, Cadena Producción-Consumo de Frijol.
- Salinas-Moreno, Y., L. Rojas-Herrera, E. Sosa-Montes, P. Pérez-Herrera. 2005. Anthocyanin composition in black bean varieties grown in Mexico. *Agrociencia*. 39:385-394.
- Santimone, M., R. Koukiekolo, Y. Moreau, V. Le Berre, P. Rouge, G. Marchis-Mouren, V. Desseaux. 2004. Porcine pancreatic alpha- amylase inhibition by the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor (Alpha-AII) and structural changes in the alpha- amylase inhibitor complex. *Biochim. Biophys. Acta*. 1696:181-190.
- Saunders, L. R., and E. Verdin. 2007. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*. 26:5489-5504.
- Saura-Calixto, F., I. Goñi, L. Bravo, and E. Mañas. 1993. Resistant starch in foods: modified method for dietary fiber residues. *J. Food Sci.* 58:642-643.

- Saura-Calixto, F., I. Goñi, C. Martín, y R. Ferrer. 2003. Fibra dietética en cerveza: contenido, composición y evaluación nutricional. *Cerveza y Malta*. 158:51-60.
- Serrano, J., and I. Goñi. 2004. Role of black bean *Phaseolus vulgaris* on the nutritional status of Guatemalan population. *Arch. Latinoam. Nutr.* 54:36-44.
- Schneeman, B. O. 1998. Dietary fiber and gastrointestinal function. *Nutr. Res.* 18: 625–632.
- Schneeman, B. O. 1999. Building scientific consensus: the importance of dietary fiber. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:1.
- Schröder, O., S. Turak, S. Daniel, T. Gaschott, and J. Stein. 2005. Upregulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase by butyrate in Caco-2 cells. *World J. Gastroenterol.* 11:7136-7141.
- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2010. Monografía del Frijol. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>
- Sengupta, S., J. G. Muir, and P. R. Gibson. 2006. Does butyrate protect from colorectal cancer? *J Gastroen Hepatol* 21:209–218.
- Sherr, C. J. Mammalian G1 cyclins. 1993. *Cell*. 73:1059-1065.
- Shi, J., K. Arunasalam, D. Yeung, Y. Kakuda, G. Mittal. 2004. Saponins from edible legumes: chemistry, processing, and health benefits. *J. Med. Food*. 7:67-78.
- Shields, J. M., K. Pruitt, A. McFall, A. Shaub, and C. J. Der, 2000. Understanding ras: “it ain't over 'til it's over”. *Trends Cell. Biol.* 10:147-154.
- Shutler, S. M., G. M. Bircher, J. A. Tredger, L. M. Morgan, A. F. Walker, and A. G. Low. 1989. The effect of daily baked beans (*Phaseolus vulgaris*) consumption on the plasma lipid levels of young normo-cholesterolemic men. *Br. J. Nutr.* 61:257–265.
- Soussi, T., K. Dehouche, and C. Beroud. 2000. P53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum. Mutat.* 15:105-113.
- Soussi, T. and C. Beroud, 2001. Assessing p53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer.* 1:233-240.
- Szylił, O., and C. Andrieux. 1993. Physiological and pathophysiological effects of carbohydrate fermentation. *World Rev. Nutr. Diet.* 74:88-122.

- Takayama, T., K. Miyanishi, T. Hayashi, Y. Sato, and Y. Niitsu. 2006. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J. Gastroenterol.* 41:185-192.
- Tang, X., Y. J. Sun, E. Half, M. T. Kuo, F. Sinicrope. 2002. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 62:4903-4908.
- Tartaglia, L. A., T. M. Ayres, G. H. Wong, and D. V. Goeddel. 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell.* 74:845-853.
- Theodoratou, E., J. Kyle, R. Cetnarskyj, R. Cetnarskyj, S. M. Farrington, A. Tenesa, R. Barnetson, M. Porteous, M. Dunlop, and H. Campbell. 2007. Dietary flavonoids and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16:684-93.
- Titgemeyer, E. C., L. D. Bourquin, G. C. Fahey, and K. A. Garleb. 1991. Fermentability of various fiber sources by human fecal bacteria *in vitro*. *Am. J. Clin. Nutr.* 5:1418-1424.
- Topping, D. L., and P. M. Clifton. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function (roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides). *Physiol Rev.* 81:1031-1064.
- Tovar, J., I. M. Björck, and N. G. Asp. 1992a. Incomplete digestion of legume starches in rats: a study of precooked flours containing retrograded and physically inaccessible starch fractions. *J. Nutr.* 122:1500-1507.
- Tovar, J., Y. Granfeldt, and I. M. Björck. 1992b. Effect of processing on blood glucose and insulin responses to starch in legumes. *J. Agric. Food Chem.* 40:1846-1851.
- Tovar, J. and C. Melito. 1996. Steam-cooking and dry heating produce resistant starch in legumes. *J. Agric. Food Chem.* 44:2642-2645.
- Trugo, L.C., C. M. Donangelo, N. M. F. Trugo, K. E. Bach Knudsen. 2000. Effect of heat treatment on nutritional quality of germinated legume seeds. *J. Agric. Food Chem.* 48:2082-2086.
- Udani, J., M. Hardy, D. C. Madsen. 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.
- Velasco, Z.I., A. Rascon, and J. Tovar. 1997. Enzymic availability of starch in cooked black beans (*Phaseolus vulgaris* L) and cowpeas (*Vigna* spp.). *J. Agric. Food Chem.* 45:1548-1551.

- Velculescu, V., and W. el-Deiry. 1996. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin. Chem.* 42:858-868.
- Veeriah, S., T. Kautenburger, N. Habermann, J. Sauer, H. Dietrich, F. Will, and B. L. Pool-Zobel. 2006. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol. Carcinog.* 45:164-174.
- Veeriah, S., T. Hofmann, M. Gleis, H. Dietrich, F. Will, P. Schreier, B. Knaup, and B. L. Pool-Zobel. 2007. Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29). *J. Agric. Food. Chem.* 55: 2892-2900.
- von Bernhardt, R. 2004. Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis?. *Rev. Chil. Neuro-Psiquiatr.* 42: 281-292.
- Vucenik, E., and A. M. Shamsuddin. 2003. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic. *J Nutr* 133:3778–3784.
- Wächtershäuser, A., B. Akoglu, and J. Stein. 2001. HMG-CoA reductase inhibitor mevastatin enhances the growth inhibitory effect of butyrate in the colorectal carcinoma cell line CaCo-2. *Carcinogenesis.* 22:1061-1067
- Waldecker, M., T. Kautenburger, H. Daumann, C. Busch, D. Schrenk. 2008. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J. Nutr. Biochem.* 19:587-593.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10:45–65.
- Wenzel, U., S. Kuntz, M. D. Brendel, and H. Daniel. 2000. Dietary flavones is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 60: 3823-3831.
- Wichienchot, S., P. Prasertsan, T. Hongpattarakere, G. R. Gibson and R. A. Rastall. 2006. In vitro three-stage continuous fermentation of gluco-oligosaccharides produced by *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 by the human colonic microflora. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 7:13-18.
- Willett, W. C. 2002. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science.* 296:695-698.

- Wilson, C. A., and J. L. Browning. 2002. Death of HT29 adenocarcinoma cells induced by TNF family receptor activation is caspase-independent and displays features of both apoptosis and necrosis. *Cell Death and Diff.* 9: 1321-1333.
- Wisker, E., M. Daniel, G. Rave, and W. Feldheim. 2000. Short-chain fatty acids produced in vitro from fibre residues obtained from mixed diets containing different breads and in human faeces during the ingestion of the diets. *Br. J. Nutr.* 84:31-37.
- Wong, J., R. de Souza, C. Kendall, A. Emam, and D. Jenkins. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* 40: 235–243.
- World Health Organization (WHO). Mortality and burden of disease. 2008. http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death_2008/en/index.html
- Wolin, M. J., and T. L. Miller. 1983. Interactions of microbial populations in cellulose fermentations. *Fed. Proc.* 42:109-113.
- Worthington, R. E., 1972. Varietal differences and seasonal effects on fatty acid composition and stability of oil from 82 peanut genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 20: 727-730.
- Wu, C. H., Y. W. Shih, C. H. Chang, T. T. Ou, C. C. Huang, J. D. Hsu, and C. J. Wang. 2010. EP4 upregulation of Ras signaling and feedback regulation of Ras in human colon tissues and cancer cells. *Arch. Toxicol.* 84:731-740.
- Würsch, P., S. Del Vedovo, and B. Koellreuter. 1986. Cell structure and starch nature as key determinants of the digestion rate of starch in legumes. *Am. J. Clin. Nutr.* 43:25-29.
- Yamada, Y., S. Hosoya, S. Nishimura, T. Tanaka, Y. Kajimoto, A. Nishimura, and O. Kajimoto. 2005. Effect of bread containing resistant starch on postprandial blood glucose levels in humans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:559-66.
- Yeung, F., J. E. Hoberg, C. S. Ramsey, M. D. Keller and D. R. Jones. 2004. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 23:2369–2380.
- Yi, W., C. C. Akoh, J. Fischer, and G. Krewer. 2006. Effects of phenolic compounds in blueberries and muscadine grapes on HepG2 cell viability and apoptosis. *Food. Res. Int.* 39:628-638.

- Zhang, S., and D. Dean. 2001. Rb-mediated chromatin structure regulation and transcriptional repression. *Oncogene*. 20:3134-3138.
- Zou, X., T. Tsutsui, D. Ray, J. Blomquist, H. Flchijo, D. S. Ucker, H. Kiyokawa. 2001. The cell cycle-regulatory CDC25A phosphatase inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol. Cell Biol.* 21:4818-4828.

11 ANEXOS

La figura 17 ilustra la curva de calibración de (+)-catequina para la cuantificación de taninos condensados en las muestras de frijol, FND y el EFFND. La ecuación que se obtuvo fue: $y = 0.3652x + 0.0085$ con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.9937$

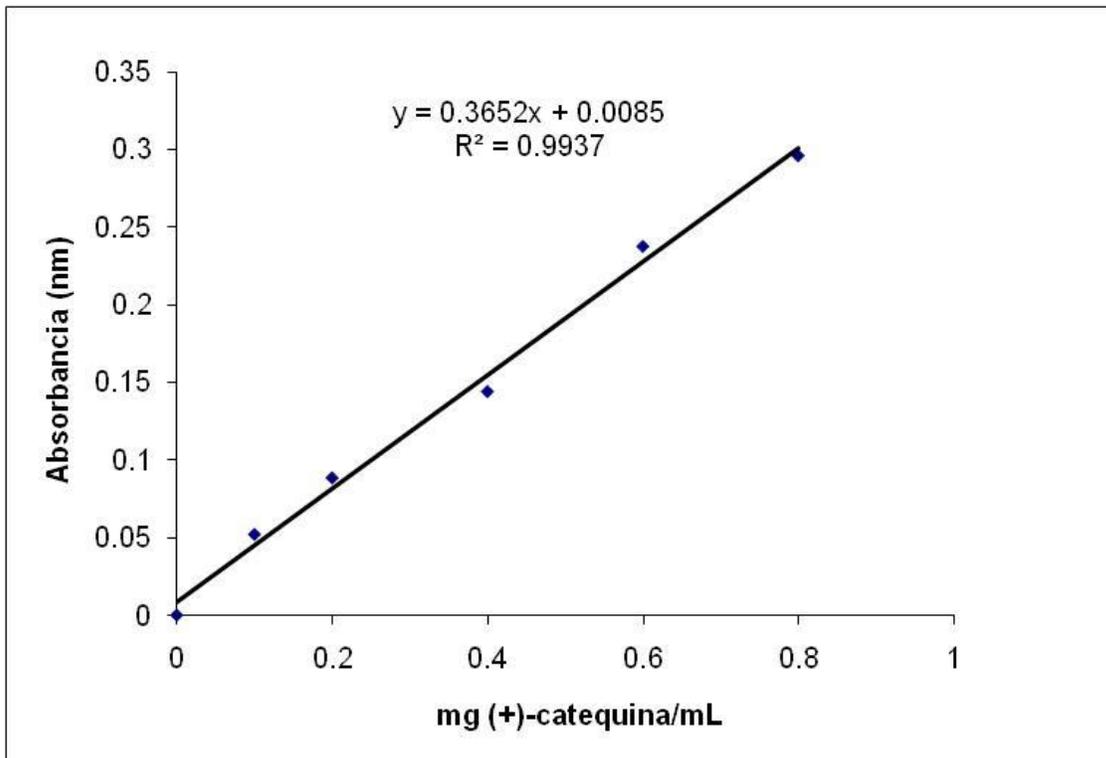


Figura 17. Curva de calibración de mg (+)-catequina. Cada punto representa el promedio \pm error estándar de 2 experimentos independientes con tres repeticiones cada uno.

La figura 18 muestra la curva de calibración de rutina para la cuantificación de flavonoides totales en las muestras de frijol, FND y el EFFND. La ecuación que se obtuvo fue: $y = 0.0032x + 0.0026$ con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.9989$

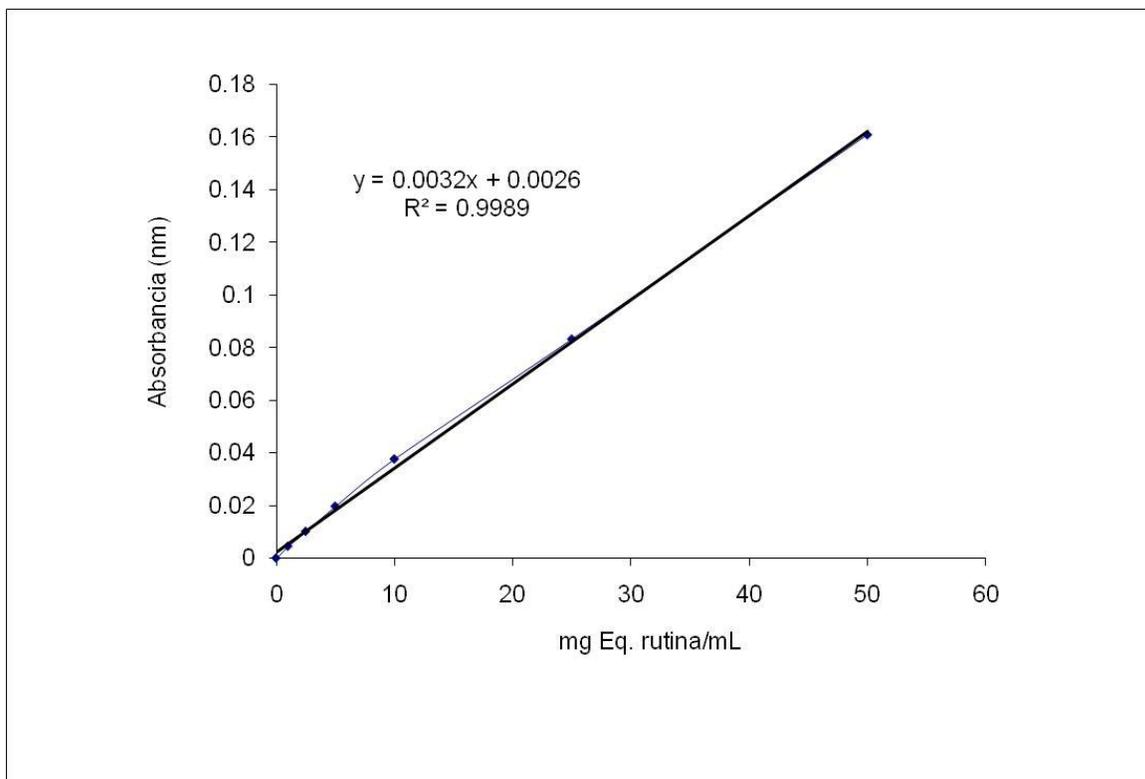
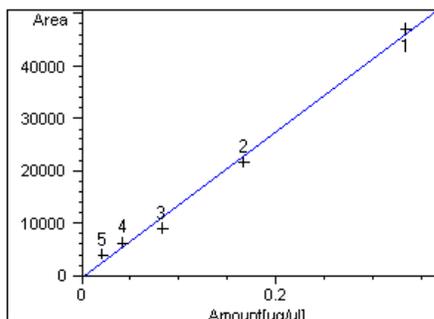


Figura 18. Curva de calibración de mg de rutina. Cada punto representa el promedio \pm error estándar de 2 experimentos independientes con tres repeticiones cada uno.

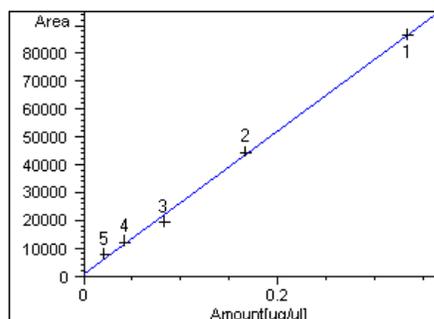
Las figuras 19A, 19B y 19C ilustran las curvas de calibración para la rafinosa, estaquiosa y verbascosa, respectivamente para la cuantificación de oligosacáridos en las muestras de frijol crudo, cocido y en la FND.

A



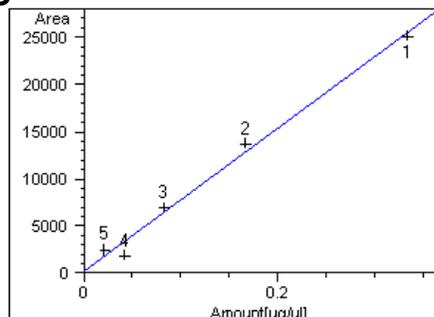
Rafinosa at exp. RT: 5.672
 RID1 A, Refractive Index Signal
 Correlation: 0.99668
 Residual Std. Dev.: 1589.41527
 Formula: $y = mx + b$
 m: 139014.68938
 b: -297.28041
 x: Amount[ug/ul]
 y: Area

B



Estaquiosa at exp. RT: 6.525
 RID1 A, Refractive Index Signal
 Correlation: 0.99901
 Residual Std. Dev.: 1604.03415
 Formula: $y = mx + b$
 m: 257217.50839
 b: 834.97661
 x: Amount[ug/ul]
 y: Area

C



Verbascosa at exp. RT: 7.550
 RID1 A, Refractive Index Signal
 Correlation: 0.99585
 Residual Std. Dev.: 972.86183
 Formula: $y = mx + b$
 m: 76017.61913
 b: 186.71229
 x: Amount[ug/ul]
 y: Area

Figura 19. Curva de calibración A) Rafinosa, B) Estaquiosa y C) Verbascosa, respectivamente. Cada punto representa el promedio \pm error estándar de 2 experimentos independientes con tres repeticiones cada uno.

La figura 20 ilustra la curva de calibración de ácido acético, propiónico y butírico para la cuantificación de los AGCC el EFFND. La ecuación que se obtuvo para cada uno fue: $y = 6.3773x + 6.9768$ con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.9971$ para el ácido acético; $y = 4.9366x + 2.6879$ con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.9977$ para el ácido propiónico; $y = 2.6292x + 0.3890$ con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.9978$ para el ácido butírico.

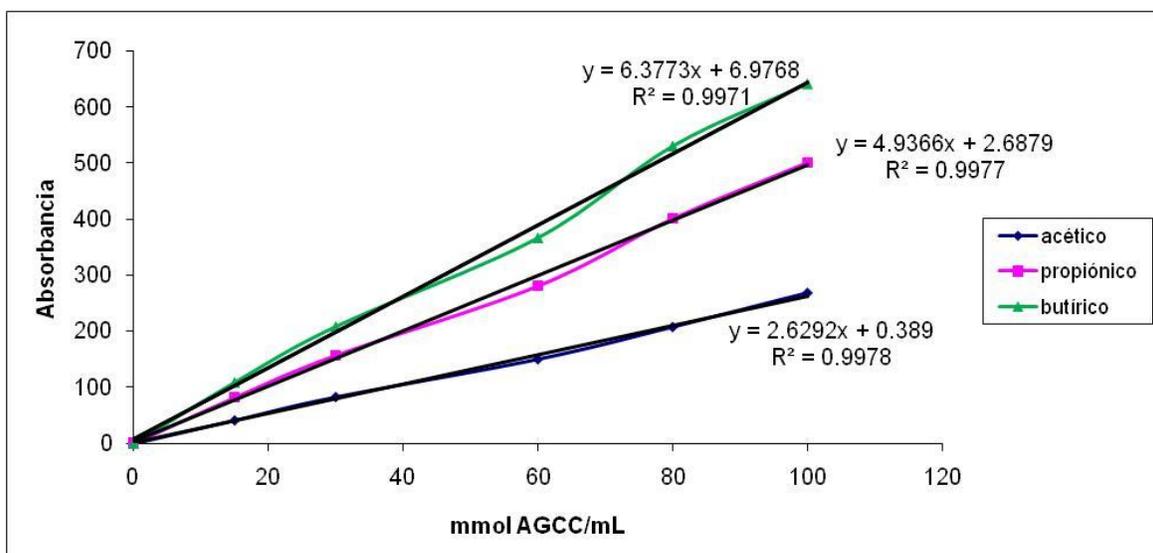


Figura 20. Curva de calibración de mg ácido acético, propiónico y butírico, respectivamente. Cada punto representa el promedio \pm error estándar de 2 experimentos independientes con tres repeticiones cada uno.

La figura 21 muestra la curva de calibración de albúmina sérica bovina (ASB) para la cuantificación de proteínas en el EFFND. La ecuación que se obtuvo fue: $y = 0.0008x + 0.0133$ con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.9955$

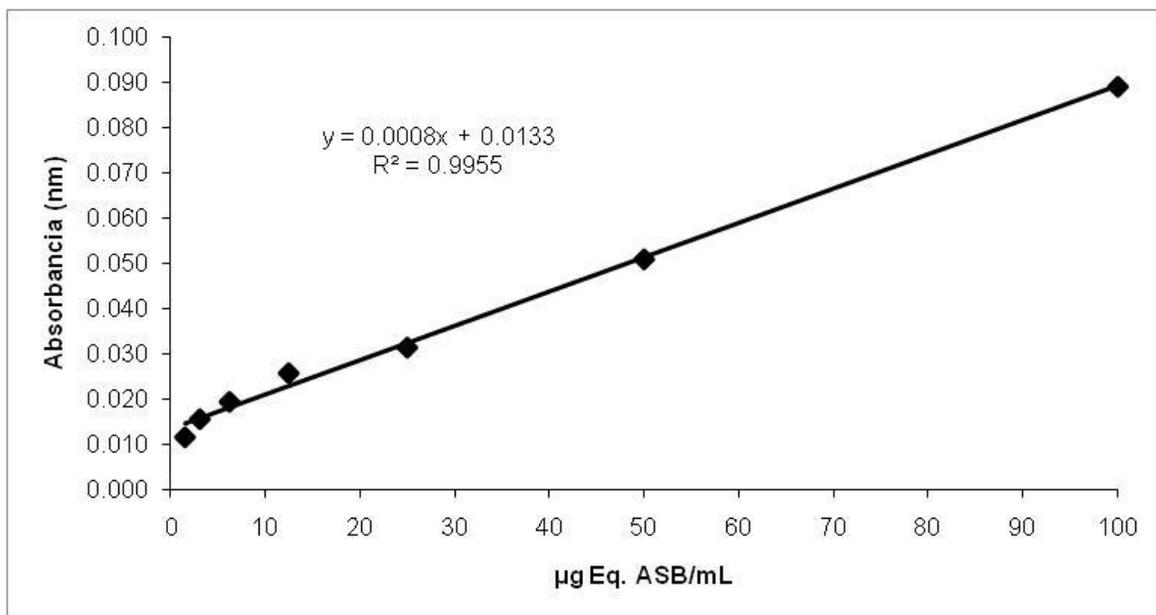


Figura 21. Curva de calibración de µg de ASB. Cada punto representa el promedio \pm error estándar de 2 experimentos independientes con tres repeticiones cada uno.

La figura 22 ilustra un gel de agarosa representativo del ARN que se extrajo de las células HT-29 control (B), tratadas con EFFND-CL₅₀ (C), y células HT-29 tratadas con AGCC-CL₅₀ (D), respectivamente.

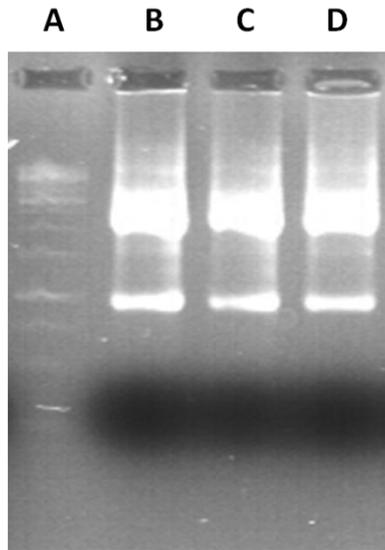


Figura 22. Perfil electroforético del ARN extraído de las células HT-29. A: marcador molecular, B: células HT-29 control (sin tratamiento), C: células HT-29 tratadas con EFFND-CL₅₀ y, D: células HT-29 tratadas con AGCC-CL₅₀.

La figura 23 ilustra un gel de agarosa correspondiente al ADNc de las células HT-29 control a los 15, 25, 30, 25, 40, 45 ciclos de PCR, respectivamente.

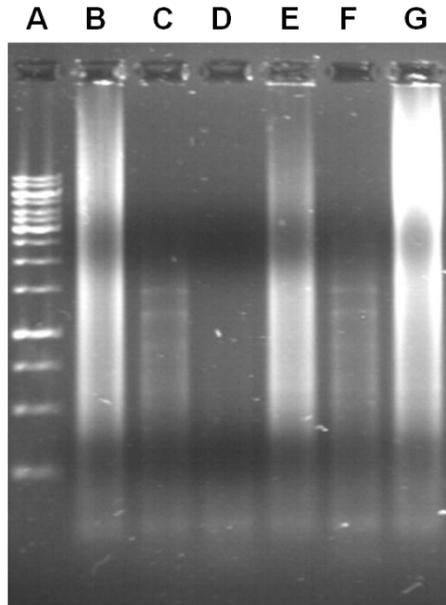


Figura 23. Optimización de ciclos de PCR para el ADNc de las células HT-29 control (sin tratamiento). A: marcador molecular, B-G: 15, 25, 30, 35, 40 y 45 ciclos.

La figura 24 ilustra un gel de agarosa correspondiente al ADNc de las células HT-29 tratadas con EFFND-CL₅₀ a los 15, 25, 30, 25, 40, 45 ciclos de PCR, respectivamente.

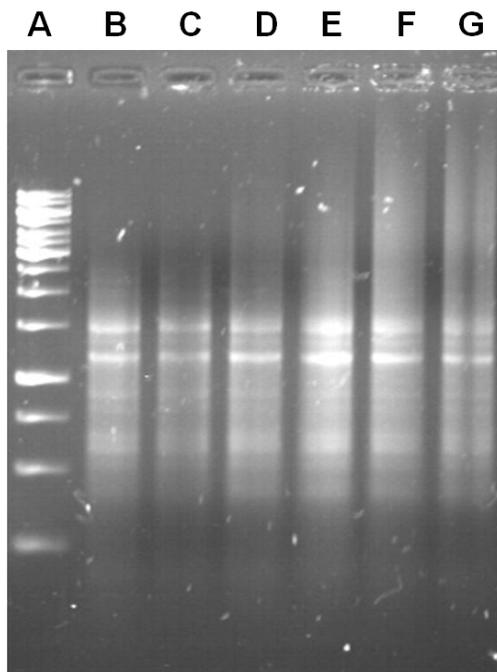


Figura 24. Optimización de ciclos de PCR para el ADNc de las células HT-29 tratadas con EFFND-CL₅₀. A: marcador molecular, B-G: 15, 25, 30, 35, 40 y 45 ciclos, respectivamente.

La figura 25 ilustra un gel de agarosa correspondiente al ADNc de las células HT-29 tratadas con AGCC-CL₅₀ a los 15, 25, 30, 35, 40, 45 ciclos de PCR, respectivamente.

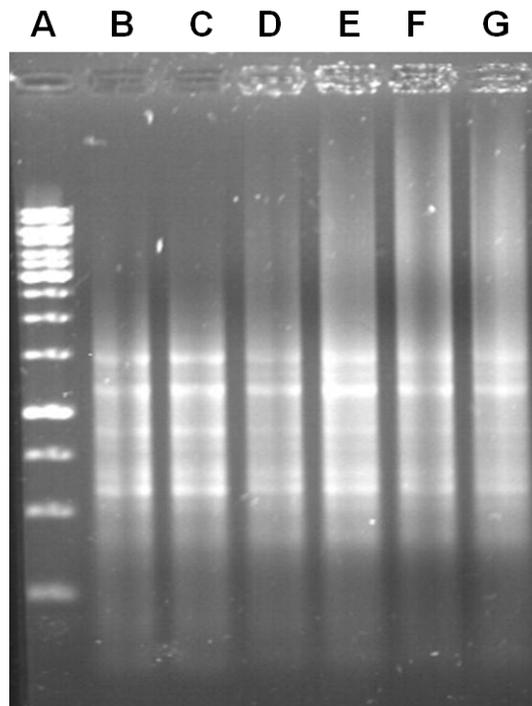


Figura 25. Optimización de ciclos de PCR para el ADNc de las células HT-29 tratadas con AGCC-CL₅₀. A: marcador molecular, B-G: 15, 25, 30, 35, 40 y 45 ciclos, respectivamente.

En la figura 26 se muestra la comparación en las secuencias reguladas positivamente (rojo) y negativamente (verde) en las células HT-29 tratadas con EFFND-CL₅₀ al menos 2 veces respecto al control (células sin tratamiento).

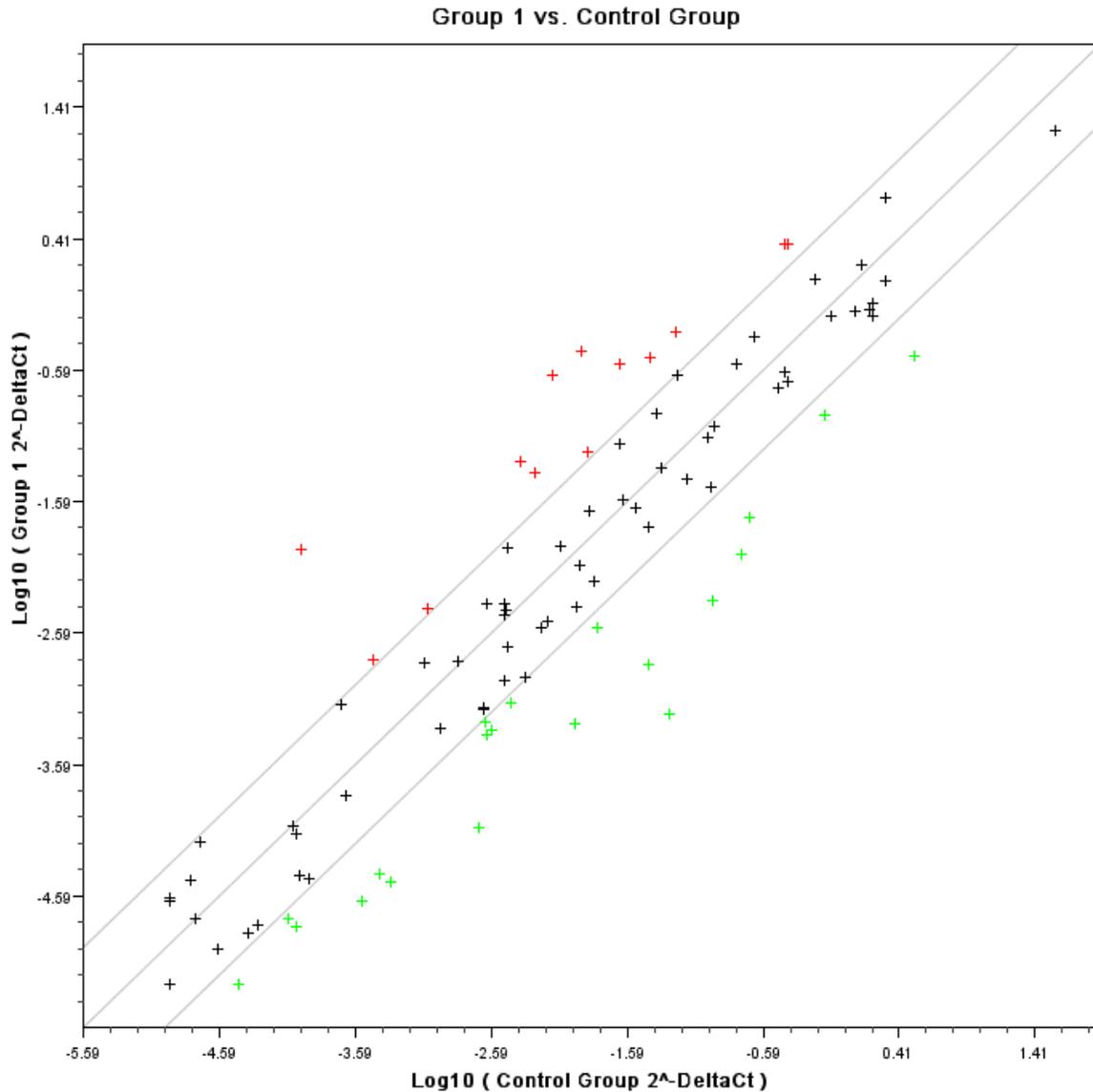


Figura 26. Grafica de dispersión de los genes que fueron regulados al menos 2 veces positiva (rojo) y negativamente (verde) en las células HT-29 tratadas con EFFND-CL₅₀ respecto al control.

Imagen proporcionada por el software de análisis de los datos SABiosciences (<http://sabioscience.com/pcr/arrayanalysis.php>).

La figura 27 ilustra los genes regulados positivamente en las células HT-29 tratadas con EFFND-CL₅₀ al menos 2 veces respecto al control (células sin tratamiento).

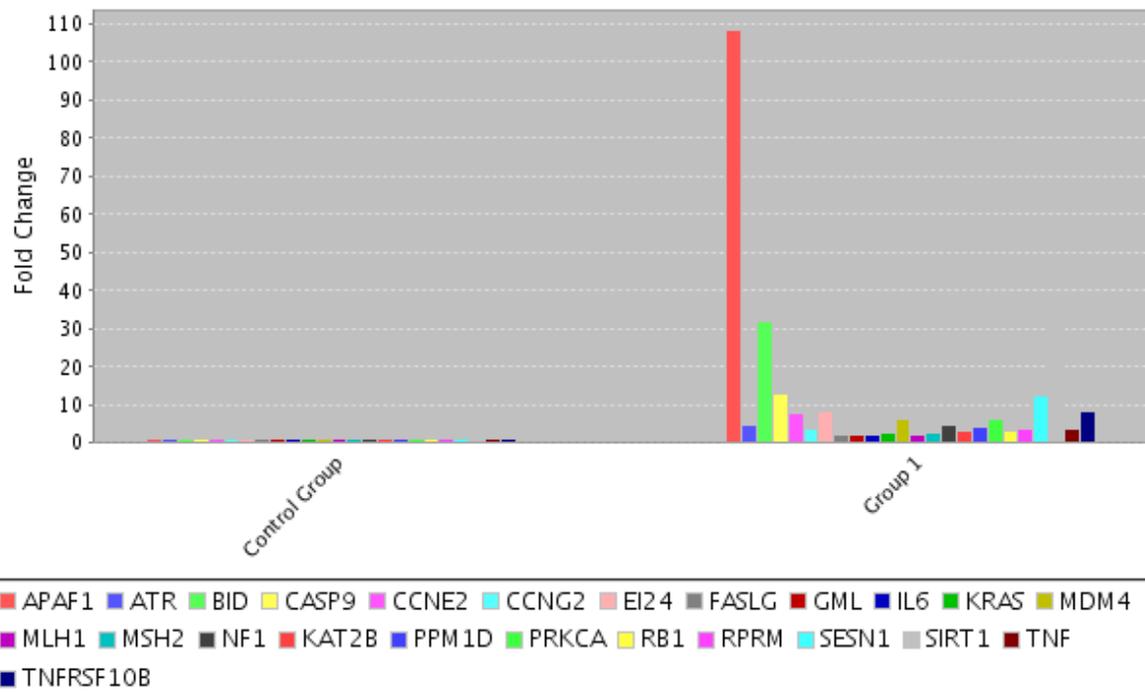


Figura 27. Genes regulados positivamente en las en las células HT-29 tratadas con EFFND-CL₅₀ al menos 2 veces respecto al control.

Imagen proporcionada por el software de análisis de los datos SABiosciences (<http://sabioscience.com/pcr/arrayanalysis.php>).

La figura 28 ilustra los genes regulados negativamente en las células HT-29 tratadas con EFFND-CL₅₀ al menos 2 veces respecto al control (células sin tratamiento).

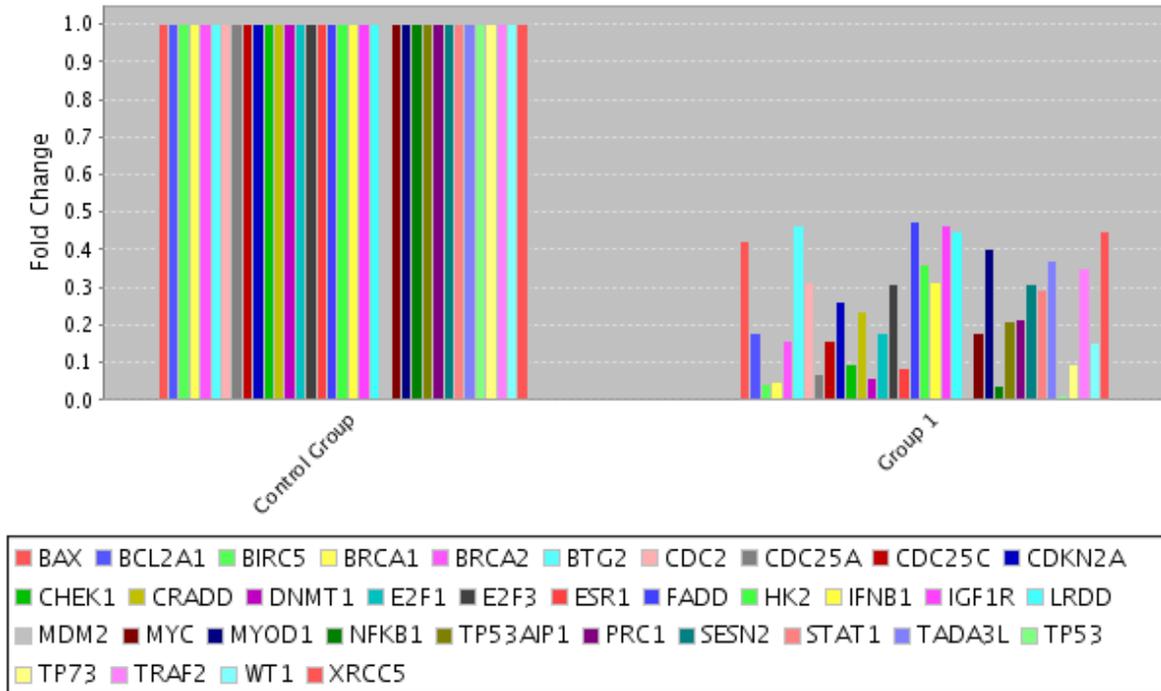


Figura 28. Genes regulados negativamente en las en las células HT-29 tratadas con EFFND-CL₅₀ al menos 2 veces respecto al control.

Imagen proporcionada por el software de análisis de los datos SABiosciences (<http://sabioscience.com/pcr/arrayanalysis.php>).

En la figura 29 se muestra la comparación en las secuencias reguladas positivamente (rojo) y negativamente (verde) en las células HT-29 tratadas con AGCC-CL₅₀ al menos 2 veces respecto al control (células sin tratamiento).

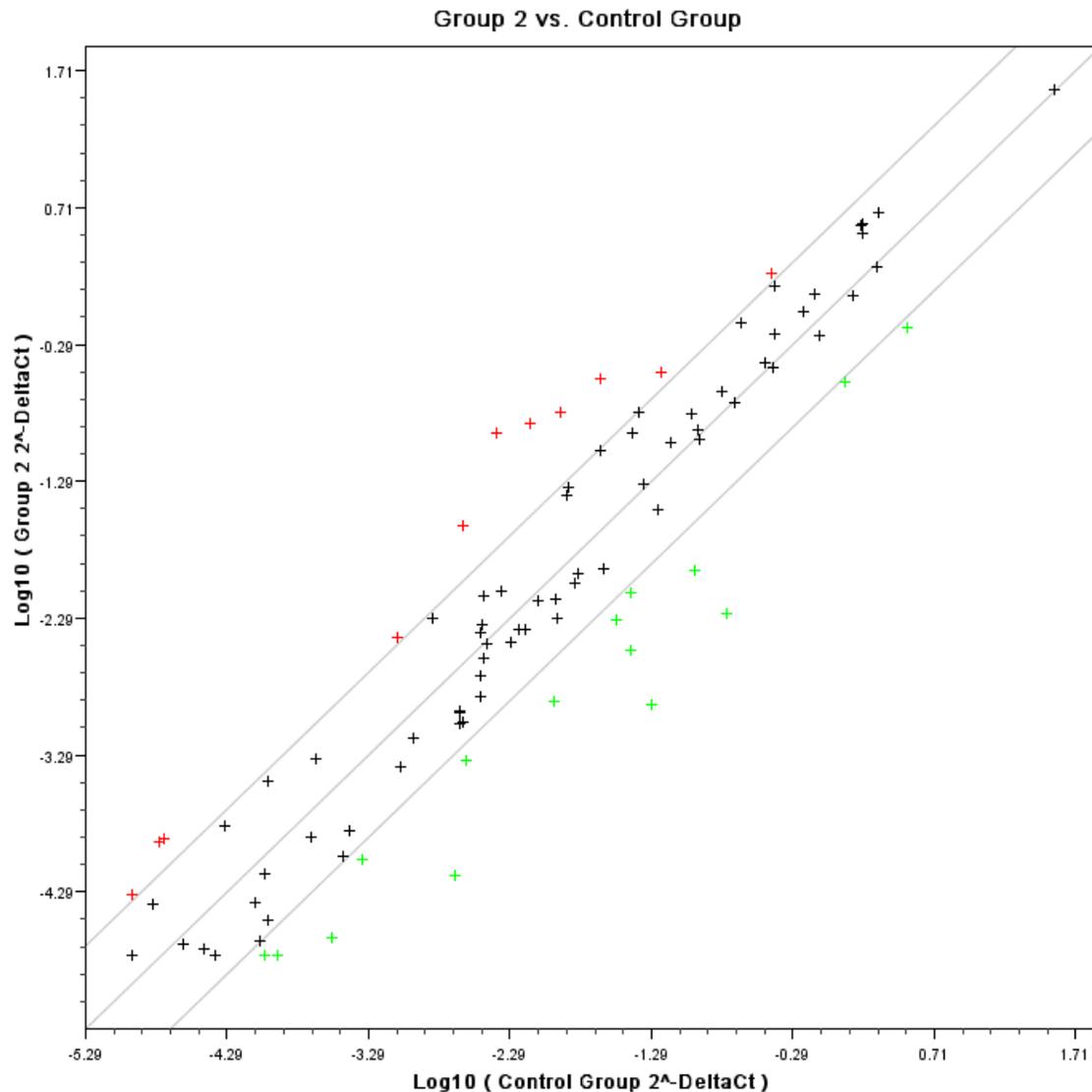


Figura 29. Grafica de dispersión de los genes que fueron regulados al menos 2 veces positiva (rojo) y negativamente (verde) en las células HT-29 tratadas con AGCC-CL₅₀ respecto al control.

Imagen proporcionada por el software de análisis de los datos SABiosciences (<http://sabioscience.com/pcr/arrayanalysis.php>).

La figura 30 ilustra los genes regulados positivamente en las células HT-29 tratadas con AGCC-CL₅₀ al menos 2 veces respecto al control (células sin tratamiento).

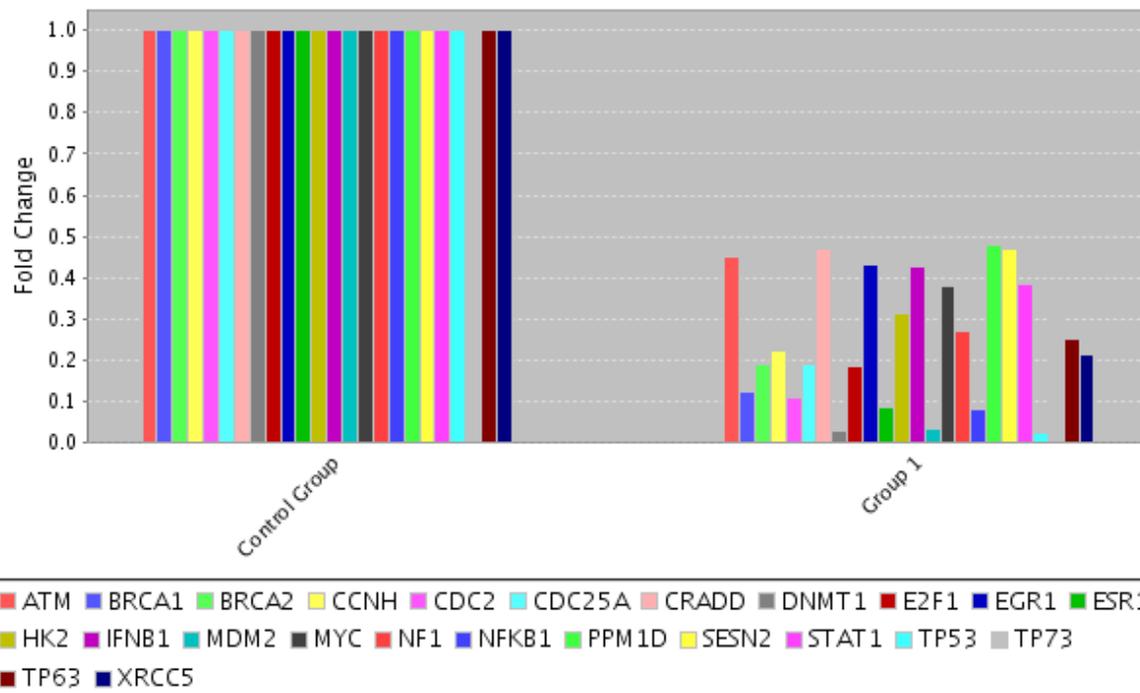


Figura 30. Genes regulados positivamente en las en las células HT-29 tratadas con AGCC-CL₅₀ al menos 2 veces respecto al control.

Imagen proporcionada por el software de análisis de los datos SABiosciences (<http://sabioscience.com/pcr/arrayanalysis.php>).

La figura 31 ilustra los genes regulados negativamente en las células HT-29 tratadas con AGCC-CL₅₀ al menos 2 veces respecto al control (células sin tratamiento).

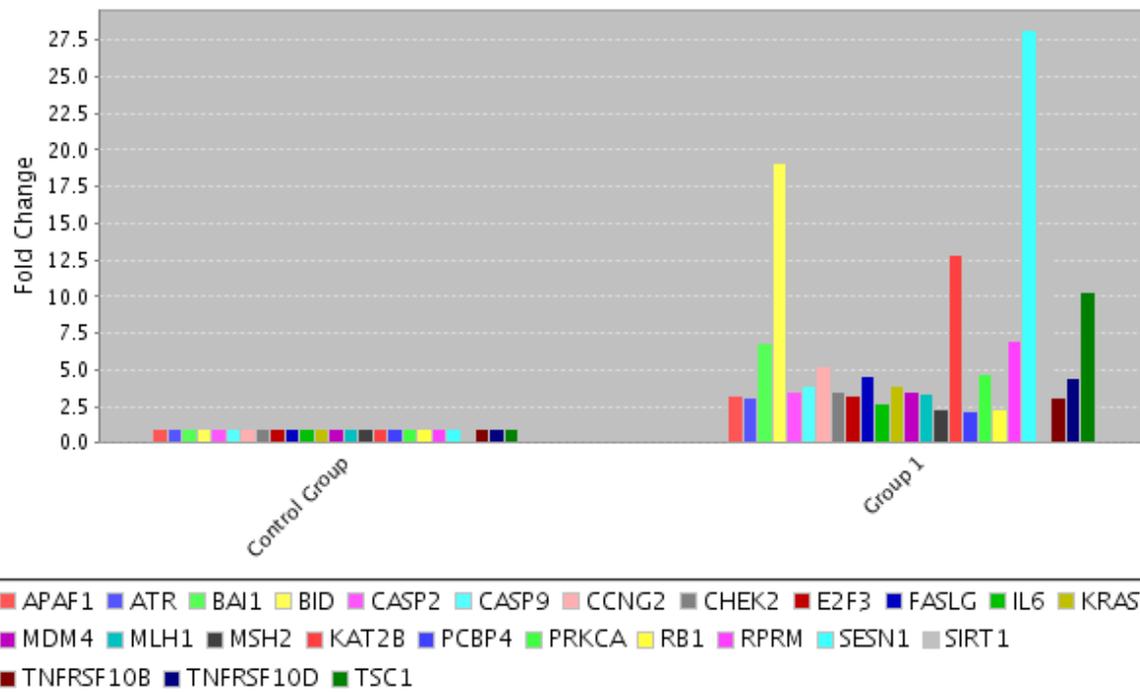


Figura 31. Genes regulados negativamente en las en las células HT-29 tratadas con AGCC-CL₅₀ al menos 2 veces respecto al control.

Imagen proporcionada por el software de análisis de los datos SABiosciences (<http://sabioscience.com/pcr/arrayanalysis.php>).