



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

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

**REGULACIÓN DE BIOMARCADORES DE
INFLAMACIÓN Y DAÑO RENAL EN RATAS
DIABÉTICAS POR EL CONSUMO DE FRIJOL
PROCESADO INDUSTRIALMENTE**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

Q. en A. ANGÉLICA SARAÍ JIMÉNEZ OSORIO

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., DICIEMBRE DE 2009.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

REGULACIÓN DE BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN Y DAÑO RENAL EN RATAS DIABÉTICAS POR EL CONSUMO DE FRIJOL PROCESADO INDUSTRIALMENTE

TESIS

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

Presenta:

Q.A. Angélica Saraí Jiménez Osorio

Dirigido por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

SINODALES

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Presidente

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Secretario

Dr. Luis Miguel Salgado Rodríguez
Vocal

Dr. Horacio Guzmán Maldonado
Suplente

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Suplente

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

Firma
Firma
Firma
Firma
Firma
Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y
Posgrado

RESUMEN

El daño renal en la diabetes se relaciona con un incremento en la secreción de citocinas proinflamatorias, tal como, el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la Interleucina 1 β (IL-1 β), las cuales son activadas por el factor de transcripción NF- κ B e inhibidas por el receptor PPAR γ . Se ha demostrado que el frijol cocido mediante procesos tradicionales disminuye el daño renal en animales diabéticos, sin embargo, no se tiene información sobre las propiedades antidiabéticas de frijoles industrializados. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del consumo de frijol industrializado sobre biomarcadores de inflamación y daño renal en ratas diabéticas. Se trabajó con 3 marcas de frijoles bayos refritos: La Costeña (LC), La Sierra (LS) e Isadora (Isa) de dos lotes diferentes. Los frijoles se secaron y se les determinó la concentración de fenoles y la capacidad antioxidante. Las harinas se incorporaron a dietas suplementadas con frijol (3 y 25%), las cuales se dieron a ratas diabéticas. En suero se determinó: glucosa, perfil lipídico y las concentraciones de TNF- α e IL-1 β . El daño renal, se evaluó cuantificando en orina la concentración de proteína total y en riñón la concentración relativa de NF- κ B, TNF α , ICAM y VCAM. Los resultados muestran que no hay diferencia significativa en el contenido de fenoles totales para las harinas de LC, LS e Isa, sin embargo, las antocianinas se encontraron en mayor concentración en los frijoles LC (40%) los cuales mostraron mayor capacidad antioxidante (10.25 μ M eq. Trolox/g de harina). Se observó disminución de glucosa sanguínea (hasta 40%), colesterol total (45-52 mg/dL vs. 70.29 mg/dL) y triglicéridos (117-159 mg/dL vs. 228 mg/dL) comparados con el control diabético. En cuanto al daño renal, solo se observó disminución de microalbúmina y proteína total en orina para LS y LC (3 y 25%). La expresión de NF- κ B fue regulada principalmente por LC (3%). El segundo lote de frijol no disminuyó niveles de glucosa pero reguló las proteínas proinflamatorias TNF α , ICAM y VCAM, principalmente por LC (3%). Los resultados sugieren que los frijoles enlatados (LS y LC) ejercen su actividad protectora a través de la regulación de la inflamación.

Palabras clave: Diabetes, frijol industrializado, daño renal, citocinas proinflamatorias, NF- κ B, TNF α , ICAM y VCAM

SUMMARY

Renal damage on diabetes is related with the increase in secretion of proinflammatory cytokines, such as, the Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and the Interleukin 1 β (IL-1 β), which are activated by the transcription factor NF- κ B and inhibited by receptor PPAR γ . It has been shown that cooking beans through traditional processes, reduces renal damage in diabetic animals, however, no information is available on antidiabetic properties of industrialized beans. Therefore, the objective of this study was to determine the effect of industrialized bean consumption on inflammation biomarkers and renal damage in diabetic rats. It was worked with 3 brands of refried beans bays: La Costeña (LC), La sierra (LS) and Isadora (Isa) from two different batches. The beans were dried and was determined the concentration of phenols and antioxidant capacity. The bean flour was added to diets supplemented with beans (3 and 25%), those were given to diabetic rats. Glucose, lipid profile and concentrations of TNF- α and IL-1 β , were determined on serum. Renal damage was evaluated by quantifying in the urine the total protein concentration and in the kidney the relative concentration of NF- κ B, TNF α , ICAM and VCAM. The results showed that there is no significant difference in total phenol content for LC, LS and Isa flours, however, anthocyanins were found in greater concentrations in beans LC (40%) those showed higher antioxidant capacity (10, 25 mM eq. Trolox/g flour). There was a reduction of blood glucose (up to 40%), total cholesterol (45-52 mg / dL vs 70.29 mg / dL) and triglycerides (117-159 mg / dL vs 228 mg /dL) compared with diabetic control. Regarding renal damage, only was observed a diminution of microalbumin and total protein in urine for LS and LC (3 and 25%). The expression of NF- κ B was mainly regulated by LC (3%). The second batch of beans did not decrease glucose levels but these regulated the proinflammatory proteins TNF- α , ICAM and VCAM, mainly by LC (3%). The results suggest the canned beans (LS and LC) perform their protective activity through the regulation of inflammation.

Keywords: Diabetes, industrialized beans, renal damage, proinflammatory cytokines, NF- κ B, TNF α , ICAM and VCAM.

DEDICATORIAS

A Dios,

Porque el SEÑOR da la sabiduría;
conocimiento y ciencia brotan de sus labios.
La sabiduría vendrá a tu corazón,
y el conocimiento te endulzará la vida.
La discreción te cuidará y la inteligencia te protegerá.

A mis padres

Porque su amor me inclina día a día a honrarlos con cada uno de mis logros

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante el desarrollo del proyecto.

A mi familia: Papá Richi, mami Isa, Ady, Mary, Javo y mi bebé Darlene quienes nunca han retraído su mano para apoyarme en todos los sentidos, desde un “te extraño” hasta momentos de desvelos apoyándome, Gracias los amo.

A la Dra. Rosalía, por todo lo que me brindó en este tiempo, porque todas sus palabras me motivaron a no rendirme, sino superarme principalmente en circunstancias adversas.

A los miembros de mi comité: Dra. Loarca, Dra. Sandra, Dr. Luis Miguel y Dr. Horacio, por todo su asesoramiento, apoyo, paciencia y tiempo que dedicaron para que culminara el proyecto.

Al personal administrativo: Carmelita, Laurita y Vero por sus atenciones y dirección, ya que son una pieza valiosa en la culminación de los proyectos.

A mis amigos de la maestría: Elisa, Cynthia S., Liliana, Fanny J., Alma, Viridiana, Dulce y Aldrin, por todos los momentos de distracción y sobre todo de verdadera amistad. A mis amigos del laboratorio: Consuelo, Magda, Germán, Ivan, Iraís, Pao, Karla, Flor, Ariadna, Roberto, Alejandro, Viry, a mis hijos: Anita, Yuli y Diego, a quienes no eran del lab pero como si lo fueran: Eli, Fanny, Fátima, Roberto y Rocío. Gracias por los momentos que convivimos juntos, porque de cada uno de ustedes aprendí muchas cosas y me brindaron lo más valioso, su amistad.

A mis amigos de casa: Bety, Marcelo y Viry, porque con ustedes me sentía como en familia y no solo eran mis amigos, eran y seguirán siendo como mis hermanos en quienes puedo confiar.

A Álvaro Meneses, por todo su amor y apoyo en todos los aspectos, gracias por siempre estar ahí, en momentos de estrés y en momentos de felicidad, por hacerme esta carga más ligera y por amarme como me amas, Te amo.

A todos aquellos quienes me tendieron la mano durante este periodo, porque solos no llegamos hasta donde estamos, el esfuerzo es propio, pero el logro es gracias a todos ustedes.
Sinceramente Gracias.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUDROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Diabetes mellitus	3
2.1.1. Definición	3
2.1.2. Prevalencia	3
2.1.3. Clasificación de diabetes mellitus	4
2.1.3.1. Diabetes mellitus tipo 1	4
2.1.3.2. Diabetes mellitus tipo 2	5
2.1.3.3. Complicaciones de la diabetes mellitus	5
2.2. Diabetes y estrés oxidativo	6
2.3. Inflamación y diabetes	7
2.3.1. Citocinas proinflamatorias	7
2.3.2. Inflamación y las complicaciones de la diabetes	9
2.3.2.1. Diabetes, inflamación y enfermedad cardiovascular	10
2.3.2.2. Inflamación y nefropatía diabética	11
2.3.2.3. Estrategias para el tratamiento de la diabetes	13
2.4. Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) y su relación con diabetes	14
2.4.1. Generalidades	14
2.4.2. Industrialización del frijol.	15
2.4.3. Cambios durante el tratamiento térmico	16
2.4.4. Efecto antidiabético del frijol	17

III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	21
5.1. Objetivo general	21
5.2. Objetivos particulares	21
VI. Materiales y métodos	22
6.1 Materiales	22
6.1.1. Material Químico	22
6.1.2. Material Biológico	23
6.2. Preparación de la harina de frijol comercial	23
6.3. Cuantificación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante	23
6.3.1. Preparación del extracto	23
6.3.2. Fenoles totales	24
6.3.3. Taninos Condensados	24
6.3.4. Antocianinas	25
6.3.5. Capacidad antioxidante	26
6.4. Estudios in vivo	26
6.4.1. Grupos de estudio	26
6.4.2. Inducción de diabetes a las ratas en estudio	27
6.4.3. Determinación de glucosa	28
6.4.4. Sacrificio y obtención de muestras	28
6.4.5. Determinación de perfil lipídico	28
6.5. Evaluación del estado inflamatorio y renal en ratas diabéticas	29
6.5.1. Determinación de marcadores bioquímicos en orina	30
6.5.2. Determinación de citocinas proinflamatorias en suero	30
6.5.3. Determinación de NFκB total, IκB α y PPARγ en riñón	31
6.5.4. Expresión de VCAM, ICAM y TNF-α en riñón por RT-PCR	32
6.5.4.1. Aislamiento del RNA	32

6.5.4.2. Transcripción y amplificación	32
6.6. Análisis de Datos	34
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	35
7.1. Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los frijoles procesados	35
7.2. Regulación de biomarcadores de diabetes por el consumo de frijol procesado industrialmente	39
7.2.1. Niveles de glucosa sérica	39
7.2.2. Peso corporal	42
7.2.3. Consumo de alimento y agua	44
7.2.4. Perfil lipídico	47
7.3. Regulación de biomarcadores de daño renal e inflamación	50
7.3.1. Marcadores bioquímicos en orina	50
7.3.2. Citocinas proinflamatorias en suero	53
7.3.3. Cuantificación de NF- κ B, I κ B α y PPAR γ en riñón	57
7.4. Regulación de biomarcadores de diabetes por el consumo de frijol procesado industrialmente proveniente de un segundo lote	62
7.4.1. Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante	62
7.4.2. Parámetros bioquímicos de diabetes: glucosa, peso y perfil lipídico	64
7.4.3. Parámetros bioquímicos de daño renal en orina	66
7.4.4. Parámetros bioquímicos de inflamación	68
7.4.4.1. Cuantificación de TNF- α en suero	68
7.4.4.2. Expresión de VCAM-1, ICAM-1 y TNF- α en riñón	69
VIII. CONCLUSIONES	72
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Pag.
1. Tipo de complicaciones presentes en la diabetes	6
2. Citocinas proinflamatorias características en diabetes mellitus y sus efectos en determinados órganos	8
3. Estadios de la nefropatía diabética	12
4. Marcadores de inflamación predictorios de complicaciones en la diabetes	13
5. Grupos de experimentación con ratas para el estudio <i>in vivo</i>	27
6. Oligonucleótidos para la amplificación por PCR	34
7. Concentraciones de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las harinas y liofilizado de frijoles procesados industrialmente	36
8. Perfil de lípidos en suero de ratas diabéticas alimentadas durante cuatro semanas con frijol procesado industrialmente	48
9. Parámetros bioquímicos en la orina de ratas diabéticas alimentadas durante cuatro semanas con frijol procesado industrialmente	51
10. Concentraciones séricas de citocinas proinflamatorias de ratas diabéticas alimentadas durante cuatro semanas con frijol procesado industrialmente	55
11. Concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las harinas de frijol procesado	63
12. Concentración de glucosa sérica, peso y perfil lipídico de las ratas alimentadas con frijol procesado	65
13. Parámetros bioquímicos de daño renal en las ratas alimentadas con frijol procesado.	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Pag.
1. Cascada de señalización para la regulación intracelular de NF- κ B.	10
2. Concentración de glucosa sanguínea (mg/dL) en las ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada con frijol procesado	40
3. Peso corporal semanal en ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada con frijol procesado industrialmente.	43
4. Consumo semanal de alimento de las ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada con frijol procesado industrialmente.	45
5. Consumo semanal de agua de las ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con frijol procesado industrialmente.	46
6. Expresión de IKB- α en el riñón de las ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con frijol procesado industrialmente.	58
7. Expresión de NF- κ B total en el riñón de las ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con frijol procesado industrialmente.	59
8. Expresión de PPAR γ total en el riñón de las ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con frijol procesado industrialmente.	61
9. Concentraciones de TNF α en el suero de las ratas diabéticas alimentadas con frijol procesado.	69
10. Expresión de VACM-1, ICAM-1 Y TNF- α en el riñón de las ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con frijol procesado	70

I. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónico degenerativa que en las últimas décadas ha mostrado un incremento progresivo de su incidencia y prevalencia en todo el mundo, especialmente en el continente Americano. En México representa un problema de salud pública que afecta a todas las clases sociales, principalmente a la población de bajos recursos económicos asentada en las áreas urbanas. Actualmente, se sabe que la diabetes es la principal causa de muerte en México y ocupa el noveno lugar de incidencia a nivel mundial, según la Organización Mundial de la salud.

El incremento constante en la incidencia de la diabetes en la población mexicana, sobre todo a partir de 1985, se ha asociado a tasas crecientes de muerte directa e indirecta. Las complicaciones crónicas de la diabetes como la nefropatía diabética, la insuficiencia cardiaca, la enfermedad vascular cerebral y la hipertensión no controlada, son las principales causas de morbimortalidad y afectan principalmente a pacientes con diabetes tipo 2. Dichas complicaciones son originadas por un incremento del estrés oxidativo del organismo, producido por los altos niveles de glucosa.

Debido a la problemática de esta patología, se han incrementado los estudios para identificar nuevas terapias de control y aún más, la prevención de la enfermedad resulta la mejor solución para esta situación, ante esto, se ha resaltado la fuerte influencia de la dieta, el estilo de vida y la predisposición genética, las cuales son las principales causas que conllevan a padecer la diabetes.

En México, se utilizan algunos alimentos para el control de esta patología, entre los cuales podemos destacar al frijol. Recientes investigaciones señalan a esta leguminosa como una buena opción en la alimentación para mantener y reducir los niveles séricos de glucosa y colesterol, así mismo, su consumo disminuye las complicaciones relacionadas con la enfermedad. Este último efecto podría estar relacionado con los compuestos fenólicos, entre otros, los cuales

presentan una alta actividad antioxidante y podrían disminuir el estado de inflamación.

A pesar de los beneficios que presenta esta leguminosa, su consumo ha disminuido considerablemente, debido, a la creciente tecnología y al cambio de estilo de vida, lo cual a su vez, ha generado que la población se incline a consumir frijoles comerciales procesados, los cuales son de fácil y rápida preparación. Pero surge la interrogante acerca del efecto que los procesos tecnológicos ejercen sobre el potencial nutracéutico del fríjol. Por lo que, en este trabajo se planteó determinar la actividad antidiabética de tres marcas de frijol procesado tecnológicamente de mayor consumo en México.

II. ANTECEDENTES

2.1. Diabetes mellitus

2.1.1. Definición

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, es decir, por un incremento persistente en los niveles basales de glucosa en la sangre ≥ 126 (mg/dl o 7.0 mmol/l), como consecuencia de defectos en la secreción, producción o en la acción de la insulina (The Expert Comite, 2003).

En base a su etiopatogenia se ha establecido un mecanismo dual por un lado, un estado sostenido de resistencia a la insulina, y por otro, una disfunción secretora de las células beta pancreáticas de tendencia progresiva, crónica e irreversible (Palma, 2007).

2.1.2. Prevalencia

La Organización Mundial de la Salud calcula que existen 140 millones de pacientes diabéticos en el mundo; considera también que habrá 220 millones de enfermos para el año 2010, y que los países en vías de desarrollo, serán los principales afectados (Rodríguez y col., 2003).

En el Instituto Mexicano del Seguro Social, la diabetes mellitus es una de las principales causas de consulta externa y desde hace varias décadas ocupa los primeros lugares en las estadísticas de mortalidad general, con una tendencia ascendente en los últimos 20 años, especialmente en los estados del norte de la república (Hernández y col., 2004).

La prevalencia de DM en México es de las más altas en el mundo, ocupando el noveno lugar a nivel mundial (FMD, 2009). La población en México que padece esta enfermedad fluctúa entre los 6.5 y los 10 millones y afecta a

individuos en edad productiva, ya que más de 50 % de los pacientes registrados en la Secretaría de Salud tiene entre 35 y 60 años de edad (Hernández y col., 2004).

2.1.3. Clasificación de diabetes mellitus

La diabetes se clasifica de acuerdo al cuadro clínico que presenta el paciente, el cual hace posible identificar y diferenciar el tipo de diabetes, el estado y su tratamiento. La OMS clasificó a la diabetes en 2 tipos: diabetes mellitus insulino – dependiente (DMID) o tipo 1, y diabetes no insulino – dependiente (DMNID) o tipo 2 (The Expert Committe, 2003).

2.1.3.1. Diabetes mellitus tipo 1

Esta forma de diabetes se genera por la destrucción autoinmune de las células β del páncreas mediada por linfocitos T activados (Bach, 1994). Tras un período preclínico de duración variable, el paciente puede permanecer asintomático, sin embargo, cuando el número de células productoras de insulina llega a un valor crítico el paciente presenta la sintomatología clásica generada por la insulinopenia y la hiperglicemia: poliuria (excreción incrementada de orina), polidipsia (sed excesiva), polifagia (aumento de hambre), pérdida de peso y una tendencia a la cetosis si no se trata con insulina exógena (The Expert Committe, 2003). Aunque en el momento del diagnóstico la presencia de obesidad es un hecho infrecuente, la presencia de la misma no descarta la posibilidad de una DM tipo 1 (Atkinson y MacLaren, 2001).

2.1.3.2. Diabetes mellitus tipo 2

Es la forma de diabetes, anteriormente denominada como diabetes no insulino-dependiente (DMNID), diabetes tipo II, o diabetes del adulto. Es un término usado para los individuos quienes presentan resistencia a la acción de la insulina y, por lo general, deficiencia de insulina. Los niveles séricos de esta hormona pueden ser normales, elevados o incluso bajos.

Se han descrito factores, tanto ambientales como genéticos, para su desarrollo. Entre los factores ambientales de riesgo tenemos la edad, el tipo de alimentación y el estilo de vida. Se presenta normalmente en la edad adulta siendo la obesidad, el sobrepeso, la grasa visceral, el estrés y la predisposición genética los principales factores de riesgo de desarrollar DM tipo 2. La influencia de estos factores en el desarrollo de la enfermedad se ha demostrado claramente, ya que cambios en el estilo de vida retrasa, e incluso previenen, la aparición de la mayoría de las complicaciones asociadas a la diabetes (The Expert Comité, 2003).

2.1.3.3. Complicaciones de la diabetes mellitus

Aunque las típicas manifestaciones clínicas de la DM (polifagia, polidipsia y poliuria, junto con un estado de astenia permanente) son conocidas desde épocas remotas, las consecuencias microvasculares y macrovasculares vinculadas con la diabetes mellitus, han quedado bien establecidas hasta fechas recientes (Cuadro 1).

Las complicaciones macrovasculares son las principales causas de muerte en el paciente diabético (Aguilar-Salinas y col. 2003). Así mismo, la nefropatía, considerada como una complicación microvascular, produce altas tasas de mortalidad y costo para su atención (Palma, 2007).

Cuadro 1. Tipo de complicaciones presentes en la diabetes.

Complicación	Órgano Diana
Microvasculares	Presente en la retina, en los glomérulos y en los nervios periféricos (retinopatía, nefropatía, neuropatía periférica, respectivamente).
Macrovasculares	Asociados con daños ateroscleróticos, al afectar la irrigación en distintos tejidos y órganos provocando infarto al miocardio, apoplejía o amputación de alguna extremidad del paciente.

(Ambriz, 2007).

2.2. Diabetes y estrés oxidativo

Desde 1988, Oberley correlacionó el estrés oxidativo con la diabetes. La mayoría de los autores postulan el papel del estrés oxidativo en el desarrollo de las complicaciones diabéticas debido al daño tisular que producen los radicales libres (Baynes, 1991). De esta manera, se sabe que el estrés oxidativo está implicado en el desarrollo de la nefropatía diabética, y en las complicaciones cardiovasculares (Giugliano y col., 1996). Aun más, algunos autores indican que los radicales libres y por lo tanto el estrés oxidativo, no sólo están relacionados con las complicaciones del diabético, sino también con la misma etiología de la enfermedad (Wolff, 1993).

2.3. Inflamación y diabetes

El estrés oxidativo se ha asociado a procesos inflamatorios en la diabetes. Altas concentraciones séricas de glucosa inducen estrés oxidativo, con la subsecuente formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés) y productos de peroxidación lipídica, los cuales se han propuesto que funcionan como una llave para activar cinasas que promueven la inducción de genes proinflamatorios, como las citocinas (Schmidt y col., 1999).

Las citocinas proinflamatorias, son fuertes predictores para el desarrollo de diabetes tipo 2 y sus complicaciones (Pickup, 2004; Stentz y col., 2004). Un estado inflamatorio induce cambios estructurales y funcionales en diversos órganos y sistemas, de los cuales los más relevantes son: el corazón, los pequeños y grandes vasos arteriales, el riñón, el sistema nervioso central y periférico, y la retina, en todos estos, el endotelio es el órgano diana por excelencia (Palma, 2007).

2.3.1. Citocinas proinflamatorias

Las citocinas son moléculas de bajo peso molecular, normalmente entre 15-30 kDa. Aunque en general son producidas por monocitos, macrófagos y neutrófilos, determinadas citocinas pueden también ser secretadas por otros tipos celulares, tal como, el tejido adiposo, células endoteliales y fibroblastos. En general, son moléculas que poseen una vida media muy corta y actúan a muy bajas concentraciones del orden de picogramos.

Las citocinas ejercen un efecto autocrino cuando se unen a receptores presentes en la propia célula productora. También pueden tener un efecto paracrino, actuando sobre diferentes tipos celulares que se encuentran en su vecindad, o bien, pueden liberarse a la circulación sanguínea o linfática, ejerciendo su efecto en otros órganos y tejidos, actuando así como las hormonas, de forma endocrina. Dos importantes características funcionales de las citocinas son su

pleiotropismo, de tal manera que una misma citocina es capaz de ejercer efectos biológicos diferentes al actuar sobre distintos tipos celulares, y su redundancia, es decir, que varias citocinas pueden contribuir al desarrollo de la misma función en un determinado tipo celular (Aguzzi y Heikenwalder, 2005).

Las citocinas con actividad proinflamatoria incluyen las producidas por los monocitos y macrófagos activados durante las respuestas inmunes innatas. Las principales citocinas que participan en los acontecimientos celulares y moleculares asociados con los fenómenos inflamatorios son la interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α por sus siglas en inglés) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Citocinas proinflamatorias características en diabetes mellitus y sus efectos en determinados órganos.

Citocina	Secretada por	Efectos
IL-1	Monocitos, macrófagos, células endoteliales y epiteliales	Induce liberación de histamina, genera vasodilatación y aumento de permeabilidad vascular. Induce en hígado la producción de proteínas de la fase aguda.
IL-6	Monocitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T.	Inducen proteínas de fase aguda (fibrinógeno).
TNF- α	Monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos y mastocitos.	Induce expresión de moléculas de adhesión. En el sistema vascular induce inflamación. En hígado promueve la producción de proteínas de fase aguda.

(Pickup, 2004; Routsalainen y col., 2006).

2.3.2. Inflamación y las complicaciones de la diabetes

La hiperglicemia es la responsable de múltiples complicaciones micro y macrovasculares a través de cuatro rutas bioquímicas las cuales incluyen la ruta del poliol, la vía de las hexosaminas, los AGEs y la activación de proteína cinasa C (PKC) (Díaz-Flores y col., 2004). La unión de los AGEs a su receptor (RAGE) expresado en células endoteliales o células musculares lisas de la pared vascular y a nivel renal, resulta en diferentes acciones, incluyendo la liberación de citocinas como TNF- α y la sobreexpresión de diversos genes como el factor nuclear kappa-B (NF- κ B) (Wautier y col., 2001; Cases y col., 2003).

NF- κ B es una proteína dimérica que activa la expresión de muchos genes involucrados en procesos inflamatorios. En células no estimuladas, NF- κ B se encuentra retenido en el citoplasma por la interacción con su inhibidor I κ B (Ghosh y col., 1998). En respuesta a varios estímulos, como las citocinas proinflamatorias, las especies reactivas de oxígeno y la hiperglicemia, I κ B es fosforilado por el complejo de cinasas de I κ B, denominadas IKK, dirigiendo a la ubiquitinización y una subsecuente degradación de I κ B, lo que permite que NF- κ B se transloque al núcleo (Kwok y col., 2001), uniéndose a elementos específicos (sitios κ B) y activando la transcripción de genes (Figura 1) (May y Ghosh, 1997). Entre los genes, se encuentran aquellos que expresan moléculas de adhesión como ICAM-1 (molécula de adhesión intracelular) y VCAM-1 (molécula de adhesión vascular), citocinas, RAGES, etc. (Guijarro y col., 1997).

Por otro lado, la actividad de NF- κ B puede verse disminuida por la acción del PPAR γ , el cual se expresa principalmente en el tejido adiposo, riñón y en los vasos sanguíneos e interfiere con el factor de transcripción NF κ B inhibiendo su translocación al núcleo y su actividad (Stienstra y col., 2007). También evita la diferenciación de células mesangiales, inhibiendo la liberación de la citocina TNF α y disminuyendo así el estado inflamatorio (Guan y Breyer, 2001).

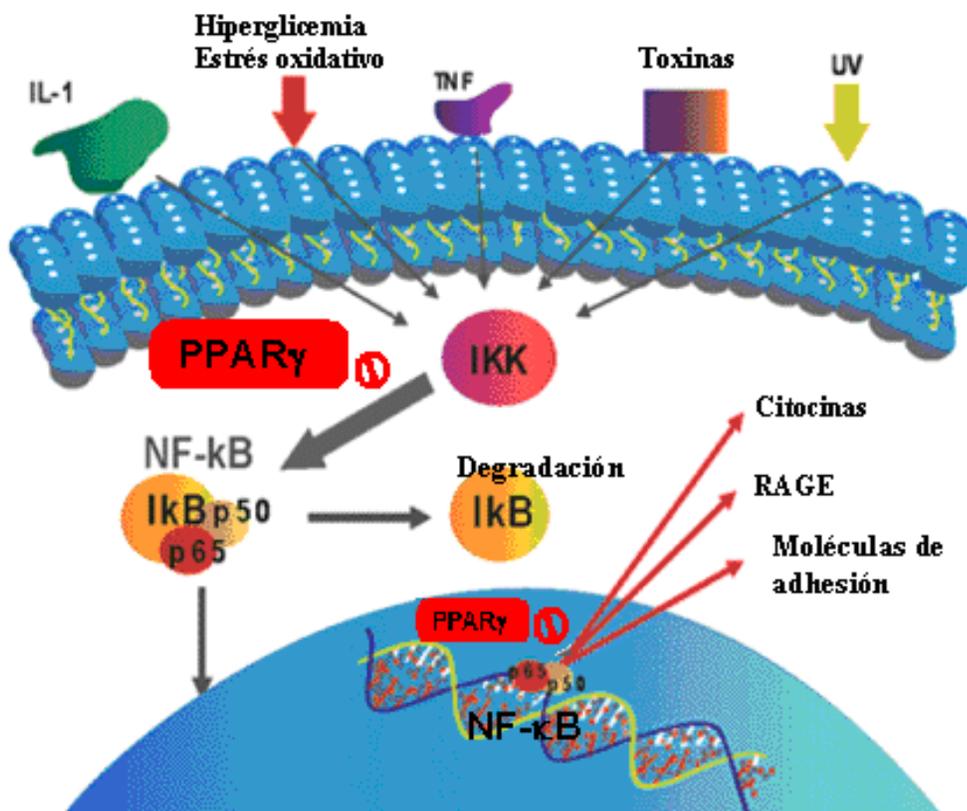


Figura 1. Cascada de señalización para la regulación intracelular de NF-κB (Alves y col., 2008).

2.3.2.1. Diabetes, inflamación y enfermedad cardiovascular

La dislipidemia es un factor importante en el desarrollo de aterosclerosis, y se caracteriza por un incremento de las concentraciones de triglicéridos en sangre, descenso de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y un aumento de lipoproteínas de baja densidad (LDL) densas y de tamaño reducido. Durante la diabetes, existe una incapacidad para almacenar ácidos grasos, aumentando su flujo del torrente sanguíneo al hígado, con el subsiguiente incremento en la formación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). La hidrólisis mediada por la lipoproteinlipasa y lipasa hepática genera partículas de LDL pequeñas y densas, las cuales son más susceptibles al estrés oxidativo y poseen una mayor capacidad de filtración en la pared arterial.

Por otro lado, las moléculas de adhesión tales como VCAM e ICAM, atraen monocitos y maduran a macrófagos dentro de la arteria e internalizan las LDL oxidadas transformándose en células espumosas, las cuales producen más radicales libres y liberan nuevas citocinas para la atracción de macrófagos y células musculares lisas (Sánchez-Recalde y Kaski, 2001; González-Maqueda, 2007; Palma, 2007). Estos procesos son claves en el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis (Golovchenko y col, 2000; Calvo, 2007).

2.3.2.2. Inflamación y nefropatía diabética

La nefropatía diabética es una complicación que afecta severamente a los pacientes que presentan glicemia crónica mal controlada y se caracteriza por una progresión en el deterioro de la función renal, que lleva al paciente a diálisis renal o incluso al trasplante (Gross y col., 2005). Se trata de una enfermedad progresiva, identificada por 5 estadios evolutivos (Cuadro 3).

Estudios en pacientes diabéticos, demuestran que la elevación de niveles circulantes de citocinas, como TNF- α e IL-6, se correlaciona con la progresión de la nefropatía (Gómez-Fernández y col., 2004; Esposito y col., 2002), debido a que diversos elementos celulares a nivel renal (células endoteliales, mesangiales, glomerulares y tubulares) tienen capacidad para producir la proteína TNF- α , la cual estimula la expresión de moléculas de adhesión (selectina E, VCAM, ICAM) y el subsecuente desarrollo de actividad procoagulante, alterando así la permeabilidad glomerular a la albúmina (Navarro, 2003).

Cuadro 3. Estadios de la nefropatía diabética.

Estadio	Criterios de diagnóstico
Estadio I.	Hiperfiltración renal, sin hipertensión arterial ni otras alteraciones urinarias. No hay evidencias de lesiones histológicas en el glomérulo o en estructuras vasculares.
Estadio II.	Persistencia de la hiperfiltración renal junto a microalbuminuria transitoria.
Estadio III o nefropatía incipiente.	Definida por microalbúmina persistente >30 mg/día (20 mg/min) y <300 mg/día (200 mg/min), filtrado glomerular normal o elevado e hipertensión arterial (40 % de los casos). Este estadio identifica a los pacientes con riesgo de desarrollar nefropatía diabética.
Estadio IV o nefropatía clínica.	Proteinuria persistentemente elevada >300 mg/día (200 mg/min) asociada a disminución progresiva del filtrado glomerular que se ha estimado en 10-12 ml/min por mes y con hipertensión arterial en el 85 % de los pacientes.
Estadio V o de IR terminal	Proteinuria nefrótica e hipertensión arterial crónica, se produce tras 25-30 años de evolución de la diabetes.

(Mogensen y col., 1993).

En base a lo anterior, se han definido determinados marcadores del proceso inflamatorio relacionados con alteraciones cardiovasculares y daño renal (Cuadro 4). Sin embargo, se debe ser muy crítico y analítico a la hora de interpretar los resultados, ya que una molécula, como las citocinas, principalmente, puede encontrarse en diferentes órganos y predecir diferentes complicaciones.

Cuadro 4. Marcadores de inflamación predictorios de complicaciones durante la diabetes.

Marcador	Órgano/tejido	Predice:
TNF- α	Suero	Resistencia a insulina, lesión renal y predisposición a enfermedad coronaria
	Tejido adiposo	Obesidad y resistencia a insulina
	Orina	Hipertrofia renal, microalbúminuria y proteinuria
IL-1	Célula mensajal	Lesión renal, permeabilidad endotelial, glomeruloesclerosis
IL-6	Plasma	Progresión y severidad de enfermedad coronaria y nefropatía diabética
	Tejido adiposo	Obesidad y resistencia a insulina
	Células glomerulares y orina	Nefropatía diabética
ICAM1 y VCAM	Plasma	Predice aterosclerosis e infarto al miocardio
	Glomérulo	Glomerulosclerosis, lesión renal, proteinuria

(Sassy-Pringet y col., 2000; Navarro, 2003; Carrillo y Bear, 2004; Gómez-Fernández, y col., 2004; Rekeneire y col., 2006; Ruotsalainen y col., 2006).

2.3.2.3. Estrategias para el tratamiento de la diabetes

Se sabe que el primer y principal blanco terapéutico en el paciente diabético es el control glicémico a través de la administración de antidiabéticos orales o de la insulina (pacientes con DM tipo 1), así como de una alimentación

adecuada (Romagnoli, 2007). Con respecto a la dieta, esta debe ir orientada hacia el mantenimiento de un peso aceptable y de niveles óptimos de glucosa, lípidos y presión arterial. La proporción de nutrientes no debe ser distinta a la recomendada en la población general, sólo evitando los azúcares solubles y sus derivados por su rápida absorción que eleva la glucemia post-prandial (Alfaro y col., 2000).

Dentro de la dieta, se ha demostrado que algunos alimentos, como la soya, frutos de la especie *Opuntia* (nopal), el maíz y actualmente el frijol, se encuentran entre las más recomendadas para el control glicémico (Garibay y San Martín, 2006; Trejo-Gonzalez y col., 2006).

2.4. Frijol (*Phaseolus vulgaris*) y su relación con diabetes

2.4.1. Generalidades

El frijol es uno de los cultivos de mayor importancia en el país, ubicándose en segundo lugar, por la superficie destinada. Su mayor importancia radica en el papel que juega para la economía de los productores como fuente vital de proteínas para los diferentes estratos de la población mexicana.

Sin embargo, los mexicanos han disminuido el consumo de frijoles. En el año 2002 se consumían 13.2 kilos de frijol por mexicano, en la actualidad solo se consume 10.9 kilos. Contrariamente, se ha identificado la existencia de un mercado de consumo en crecimiento acelerado para el frijol procesado debido a los cambios en el estilo de vida, hábitos alimenticios y la participación de la mujer en la vida productora.. La importancia que ha tenido la industria enlatadora del frijol, cuya calidad, precio y conveniencia (por generar un producto casi listo para consumirse) están haciendo de ésta una opción importante para el consumo de esta leguminosa.

Se estima que en la producción de frijol, la participación de éste en la industrialización de los productos para el mercado va del 1 al 50%, el cual se destina para la elaboración de harina de frijol y el frijol enlatado; aproximadamente un 30% se destina al frijol envasado y el 65% se vende a granel (C.A.N. s.a.). Estudios actuales reportan que 72.5% de los consumidores mexicanos, prefieren el frijol a grano y un 20.62% industrializado (Rodríguez y col., 2008).

En el país existen varias empresas procesadoras del frijol, tales como; La Sierra, La Costeña, Isadora, Nestlé (Maggi, Rancherita), Campbell`s, Hérdez (Doña María, Hormel) y La Chata. Su producción se concentra fundamentalmente en las zonas centro y norte del país, quedando la del sureste como una región únicamente de comercialización sin transformar.

2.4.2. Industrialización del frijol.

En general, el proceso de enlatado se lleva a cabo a través de 11 pasos: lavado, remojo, preparado, llenado, agotamiento (eliminación de aire), cierre, esterilización, enfriado, etiquetado, cuarentena y empaçado, los cuales pueden variar dependiendo de la empresa enlatadora.

Con el fin de eliminar impurezas, se procede a un lavado y remojo del frijol en agua o salmuera para disminuir el tiempo de cocción; en seguida se realiza una cocción ligera en donde se incorporan condimentos (sal, cebolla, ajo, grasa, etc.) y una vez preparados los frijoles se realiza el llenado de la lata o envase y se procede a el agotamiento utilizando una corriente de vapor con lo que se evitan reacciones posteriores que pudieran afectar el aroma o el sabor del alimento; se realiza el cierre o engargolado y se dispone a la esterilización en autoclave o también llamado tratamiento térmico a condiciones propias de tiempo y temperatura para la variedad de frijol que se utilice siendo ésta una etapa crítica del proceso. Inmediatamente se enfrían las latas a 4^o C, se etiquetan y se

monitorean reacciones indeseables durante 40 días. Finalmente son empaquetadas y comercializadas (María-Llamas, 2009).

2.4.3. Cambios durante el tratamiento térmico

El tratamiento térmico aplicado a productos enlatados, se efectúa para inhibir o disminuir la población microbiana e inactivar enzimas que deterioran el producto (Luechapattanaporn y col., 2004). La condición de proceso tiempo-temperatura es un factor decisivo aplicado de acuerdo al tiempo de vida útil esperado para el producto, sin embargo el calentamiento también causa cambios en características fisicoquímicas, biológicas y por lo tanto, nutritivas de los alimentos (Farid y Ghani., 2004).

Con respecto a frijoles procesados se ha reportado que la cocción incrementa la digestibilidad de la proteína hasta en un 10% y mejora la biodisponibilidad de los nutrientes (Jacinto y Campos, 1993). Además, se ha demostrado que las leguminosas procesadas contienen cantidades significativas de almidón resistente en comparación con los cereales, tubérculos y frutas inmaduras, independientemente del procesamiento (Jenkins y col., 1982; Tovar y Melito, 1996, Velasco y col., 1997).

En el caso de capacidad antioxidante, Rocha-Guzman y col., (2007) y por otro lado Xu y Chang, (2008), encontraron que, si bien la cantidad total de compuestos fenólicos presentes en frijol cocido a presión era menor, comparada con frijoles crudos, la capacidad antioxidante se incrementaba en algunos cultivares dependiendo de las condiciones de preparación y cocción.

Otro aspecto importante es la cantidad de lípidos en los frijoles, ya que puede formar complejos almidón-lípidos durante el cocimiento, un fenómeno que disminuye la susceptibilidad del almidón al ataque enzimático (Björck y col., 1994), evitando así la elevación de glucosa post –prandial.

2.4.4. Efecto antidiabético del frijol

En la actualidad los estudios referentes al frijol son de suma importancia debido a sus propiedades benéficas. Los principales componentes del grano son: carbohidratos (55-65%), proteínas (16-30%), fibra (3-8%), lípidos (1-5%) y minerales (3-5%) (Rodiño, 2000). Dentro del contenido de proteínas del frijol se destaca la abundancia de lisina y poco contenido de aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) (Bello, 2006). Adicional a estos compuestos, se sabe que la testa del frijol tiene gran cantidad de flavonoides con poder antioxidante, posee elevada cantidad de calcio, hierro y vitaminas tales como la tiamina y ácido fólico (Rodríguez y col., 2003).

Los compuestos fenólicos del frijol, que tienen propiedades antioxidantes (Peterson y Dwyer, 1998), se relacionan con una disminución del riesgo de enfermedades como síndromes coronarios e inflamaciones (Bravo y col., 1998). Además, por su elevado contenido de fibra, los frijoles contribuyen a disminuir la tasa de colesterol y mantener los niveles séricos de glucosa. En este sentido, se ha demostrado que en animales diabéticos, el frijol controla la pérdida de peso corporal, regula la hiperglicemia, manteniendo cierto control en la producción de glucosa endógena y disminuye la hiperlipidemia (García, 2006; Cerovic y col., 2006; Celleno y col., 2007; Rodgers y col., 2007). Así mismo, un extracto de la vaina de frijol *Phaseolus vulgaris*, cosechado en la India, disminuyó la formación de radicales hidropéroxidos e incremento la producción hepática y renal de enzimas antioxidantes, dichos efectos se atribuyeron al contenido de fenoles y capacidad antioxidante del frijol (Venkateswaran y Pari, 2002). Por otro lado, Lomas (2008), demostró que las variedades de frijol Pinto Durango y Negro 8025, además de su efecto hipoglucemiante, disminuyen los marcadores bioquímicos de daño renal y niveles séricos de la citocina TNF- α .

En base a lo anterior se demuestra que el frijol presenta propiedades antidiabéticas importantes. Sin embargo, no existen trabajos que reporten el consumo de frijoles procesados y su efecto sobre el control de la diabetes, por lo que en este trabajo se propone determinar el efecto del consumo de frijol

procesado tecnológicamente sobre la regulación de marcadores relacionados con la diabetes y sus complicaciones.

III. JUSTIFICACIÓN

La diabetes es de gran relevancia para nuestro país, ya que ocupa los primeros lugares de mortalidad, así mismo, esta patología resulta muy costosa para el sector salud, ya que sus complicaciones requieren de tratamientos especiales, principalmente las enfermedades relacionadas con el riñón y las cardiovasculares.

La nefropatía diabética y las enfermedades cardiovasculares tienen en común el estrés oxidativo, el cual es generado por una falta de control de los niveles de glucosa en sangre de los pacientes diabéticos, esto conlleva a la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α e interleucinas. La señalización de estas proteínas genera la expresión de moléculas de adhesión como ICAM y VCAM en riñón y en el endotelio, generando el daño renal. Debido a lo anterior, uno de los principales enfoques en el control del paciente diabético es llevar una dieta que incluya alimentos con propiedades hipoglucemiantes y antioxidantes.

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es una leguminosa que presenta propiedades nutrimentales y nutracéuticas importantes. Diversos estudios con frijol crudo y cocido, demuestran que la ingesta de esta leguminosa podría mejorar algunos parámetros relacionados con la diabetes. Sin embargo, su consumo mediante preparación tradicional ha disminuido debido a cambios en el estilo de vida, principalmente por adquisición de nuevos hábitos alimenticios, situación que conlleva a la necesidad de adquirir alimentos de rápida y fácil preparación. Ante esta situación, se ha incrementado la demanda de frijoles procesados tecnológicamente.

Sin embargo, surge la interrogante acerca del efecto de los frijoles comerciales sobre el control de la diabetes.

IV. HIPÓTESIS

Los frijoles procesados tecnológicamente son capaces de producir efectos hipoglucemiantes y antioxidantes en un modelo animal de diabetes.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar los efectos del consumo de frijol procesado industrialmente sobre el control de parámetros bioquímicos de inflamación y de daño renal, en un modelo animal de diabetes.

5.2. Objetivos particulares

- Cuantificar la concentración de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante *in vitro* de los diferentes frijoles en estudio.
- Determinar el efecto del consumo diario de frijol de diferentes lotes sobre los niveles de glucosa, peso corporal y perfil lipídico de ratas diabéticas.
- Evaluar el efecto del consumo de frijol industrializado de diferentes lotes sobre biomarcadores de diabetes y daño renal
- Evaluar la protección del frijol procesado sobre la progresión de daño renal en ratas diabéticas y su relación con citocinas proinflamatorias séricas.
- Determinar la regulación del factor de transcripción NF- κ B en el riñón de los animales experimentales.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1. Material Químico

El reactivo de Folin-Ciocalteu, el ácido gálico, la vainillina, (+)-catequina y estreptozotocina, fueron adquiridos de Sigma Chemical (USA). El NaCl, Na₂CO₃, HCl, Tris-HCl, la sacarosa, el etanol, metanol, eter etílico, KCl, NaHPO₄ y KH₂PO₄, fueron marca J.T. Baker. El ABTS y el Trolox, fueron adquiridos marca MP biomedical.

Las tiras reactivas para la determinación de glucosa en suero, así como el glucómetro se adquirieron marca ACCUTREND. Las tiras reactivas para el examen general de orina, Multistix 10SG y las tiras reactivas para la determinación de microalbúmina en orina, Clinitek, se adquirieron marca Bayer. Los Kits para la determinación de triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL en suero, fueron marca Randox Laboratories.

La acrilamida, bis-acrilamida, tris, SDS, TEMED, persulfato de amonio, mercaptoetanol, glicina, glicerol, leche bloqueadora y el bromuro de etidio se adquirieron Bio Rad. El kit de quimioluminiscencia fue adquirido marca Roche. Los anticuerpos empleados para la detección de NF-κB, Iκ-Bα, PPARγ y Actina, fueron de la marca Santa Cruz, Las soluciones de revelado y placas fotográficas marca Kodak. El kit de ELISA para la cuantificación de IL-6, IL-1β y TNF-α, DNAlader, y DNAsa fueron marca Invitrogen

Para el análisis de RT-PCR, se utilizó un Kit Rneasy para extracción de RNA por columna, marca QIAGEN y un kit de RT-PCR One Step marca Invitrogen.

6.1.2. Material Biológico

Se utilizaron ratas Wistar macho de 280 a 320 g de peso corporal. Los animales se obtuvieron del bioterio del CINVESTAV-Mexico.

6.2. Preparación de la harina de frijol comercial

Para el estudio se utilizaron frijoles bayos refritos comerciales de la marca La Costeña (LC), La Sierra (LS) en su presentación como enlatados, e Isadora (Isa) en su presentación empacado al vacío, productos de las marcas de mayor consumo en el mercado.

Los frijoles comerciales se obtuvieron del centro comercial y se secaron a 60° C por 26 horas, en una estufa marca Fisher Scientific. Posteriormente, se trituraron en una licuadora marca Black&Decker de 10 potencias para obtener las harinas, las cuales se incorporaron a la dieta de los animales.

6.3. Cuantificación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

Se realizó la determinación de fenoles totales, taninos condensados, antocianinas y capacidad antioxidante de los frijoles utilizados antes y después del secado a 60° C, por lo que se liofilizaron 100 g de frijol de cada marca y se les realizaron las determinaciones correspondientes.

6.3.1. Preparación del extracto

Para la cuantificación de compuestos fenólicos y la determinación de la capacidad antioxidante, se realizó con metanol (Cardador-Martínez y col. 2002) de la siguiente manera. Se pesó 1 g de harina de frijol y se aforó a 10 mL con metanol. Se protegió de la luz, se selló con papel parafilm y se mantuvo en agitación durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 5000 x g durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se mantuvo en frasco ambar para

las determinaciones correspondientes, utilizando el mismo extracto para la determinación de fenoles totales, taninos condensados y capacidad antioxidante,

6.3.2. Fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó usando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999). Este método se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotungstico y ácido fosfomolibdico que se reduce por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La coloración azul producida absorbe a una longitud de onda de 760 nm.

Para la cuantificación de fenoles totales, se tomó una alícuota (40 μ l) del sobrenadante obtenido de la extracción y se llevó a un volumen total de 500 μ l, posteriormente se mezcló con 250 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N) y después se adicionaron 1250 μ l de Na₂CO₃ (20 %) y se dejó reposar en obscuridad por 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se leyó la absorbancia a 760 nm. La cuantificación se realizó interpolando los resultados en una curva estándar de ácido gálico (0 a 20 μ g). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de harina (mg equivalentes ac. gálico/g de harina).

6.3.3. Taninos Condensados

La cuantificación se realizó de acuerdo al método de la vainillina, descrito por Desphande y Cheyran (1987), modificado a microplaca. De cada extracto metanólico se tomaron 50 μ l y se mezclaron con 250 μ l de la solución de vainillina al 1%: HCl 8% (relación 1:1 v/v) en un pozo de microplaca. Como blanco se

utilizó 50 µl de sobrenadante y 250 µl de HCl al 4%. Se midió la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro (Termo, Multiskan Ascent). La concentración final se calculó interpolando los datos en una curva de (+)-catequina (0.2 mg/ml). Los taninos condensados se expresaron como mg equivalente de (+)-catequina/g de harina.

6.3.4. Antocianinas

La extracción y cuantificación de antocianinas se llevó a cabo por el método de Abdel-Aal y Hucl (1999). Se agregaron 10 ml de etanol acidificado (etanol en HCl 1N, 85:15 v/v) a 1 g de harina de frijol. La solución se ajustó a pH 1 con HCl 0.1 N y se centrifugó a 27,200 g durante 15 minutos, recuperando el sobrenadante. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-visible a 535 nm y la concentración de antocianinas totales en la muestra (mg/g) se calculó como 3-glucósido de cianidina, según la siguiente fórmula:

$$C = (A/\varepsilon) \times (V/1000) \times PM \times (1/g \text{ de muestra}) \times 10^6$$

Donde:

C.- Concentración de antocianinas totales (mg/Kg),

A.- Lectura de la absorbancia,

ε .- Coeficiente de absortividad molar de 3-glucósido de cianidina (25 965 cm⁻¹ M⁻¹),

V.- Volumen total del extracto

PM.- Peso molecular de la cianidina 3-glucósido (449 g/mol).

6.3.5. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante *in vitro* se determinó por el método descrito por Arts y col. (2003), por medio del ensayo de ABTS. Para producir el radical, el ABTS (2,2'-azinosbis-(2-aminodinopropano-HCl)) se mezcló 12 horas antes de su uso con persulfato de potasio 2.5 mM en solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS) 0.2 M, pH 7.4. La solución de ABTS con persulfato de amonio fue diluida con una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 hasta obtener una absorbancia final de 0.7 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm. Al obtener la absorbancia adecuada, se mezcló la muestra con solución de ABTS* en una relación de 1:100 (1 μ l de extracto metanólico en 99 μ l de ABTS*) y se midió la absorbancia de la muestra a los 6 minutos de transcurrida la reacción y a la misma longitud de onda. Para obtener los equivalentes de trolox (μ M eq. De trolox/g de harina), se realizó una curva estándar de trolox preparado con etanol (0-800 μ M). El blanco consistió de 10 μ l de metanol en 990 μ l de ABTS*. La concentración de equivalentes de trolox se calculó mediante la relación lineal de la disminución de la absorbancia en una relación molar.

6.4. Estudios *in vivo*

6.4.1. Grupos de estudio

Para la experimentación *in vivo*, se formaron 7 grupos (Cuadro 5), un grupo control diabético alimentado con dieta base y los grupos tratados con frijol comercial al 3 y 25% para cada marca, representando así, un consumo per cápita promedio de frijol en zona urbana y un consumo alto de zona rural, respectivamente. Se incorporó el frijol a la dieta de los animales y estos fueron tratados durante 5 semanas y al final del tiempo del tratamiento se sacrificaron. Cada semana se registró el consumo de alimento, peso corporal y la ganancia/pérdida de peso, así como, la sobrevivencia de los grupos de estudio.

Cuadro 5. Grupos de experimentación con ratas para el estudio *in vivo*

Tratamiento	Porcentaje*	n
Control Diabético (CD)	-	7
La Costeña	3 %	7
La Sierra	3 %	7
Isadora	3 %	7
La Costeña	25 %	7
La Sierra	25 %	7
Isadora	25 %	7

* Indica el porcentaje de frijol adicionado a la dieta base de los animales

6.4.2. Inducción de diabetes a las ratas en estudio

Para la inducción, los animales permanecieron en ayuno durante 15 horas y posteriormente se indujo la diabetes inyectando, por vía intraperitoneal, una dosis única de estroptozotocina (STZ) de 55 mg/Kg de peso corporal, disuelta en una solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH 4.5. Se determinaron los niveles de glucosa en ayuno de los animales en estudio al transcurrir cinco días después de la inyección de STZ. Aquellos que presentaron niveles de glucosa mayores a 240 mg/dl, fueron considerados dentro del grupo experimental.

6.4.3. Determinación de glucosa

El nivel de glucosa (mg/dL) se cuantificó en la sangre obtenida de la vena caudal de los animales (localizada en el extremo de la cola del animal), con un mínimo de 8 horas en ayuno. Para ello, se utilizó un glucómetro de la marca ROCHE, cuya sensibilidad va de 20-600 mg/dL de glucosa y tiras reactivas de la marca Accutrend.

La medición se lleva a cabo a través de bioamperometría, la cual mide la corriente generada al convertir la glucosa de la muestra de sangre (colocada sobre la tira) en gluconolactona por la enzima deshidrogenasa.

6.4.4. Sacrificio y obtención de muestras

Al final de las 4 semanas de estudio, se sacrificaron las ratas por medio de anestesia con éter etílico. Ya anestesiada cada rata, se tomaron muestras de sangre por medio de punción cardiaca y se cortó la arteria principal. Posteriormente se extrajo el hígado y riñones, los cuales fueron pesados e inmediatamente congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -70° C hasta su utilización.

6.4.5. Determinación de perfil lipídico

La sangre obtenida por punción cardiaca después del sacrificio se centrifugó inmediatamente para obtener el suero. La determinación del perfil lipídico se realizó por medio de un kit enzimático comercial, para la cuantificación específica de triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL, bajo los siguientes fundamentos:

a) Los triglicéridos presentes en la muestra de sangre reaccionan con una lipasa para formar glicerol. El glicerol, convertido a glicerol 3 - fosfato por la

enzima glicerol cinasa, reacciona con la enzima glicerol fosfato oxidasa para formar fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con la enzima con 4-aminoantipirina/p-clorofenol y a través de la enzima peroxidasa se lleva a cabo la formación de un compuesto de color rojo intenso llamado quinoeimina, el cual se lee espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm.

b) El colesterol se determina con el indicador quinoneimina, el cual se forma a partir de peróxido de hidrógeno y 4-amino-antipirina en presencia de fenol y peroxidasa. Los ésteres de colesterol presentes en la muestra reaccionan con la enzima colesterol esterasa para liberar colesterol, que al reaccionar de nuevo con esta enzima produce colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno, a partir del cual se obtiene el indicador antes mencionado, que se lee a una longitud de onda de 546 nm.

c) Las lipoproteínas de baja densidad (LDL y VLDL) y las fracciones de quilomicrones precipitan cuantitativamente al añadir ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio. Después de centrifugar, la concentración de colesterol se determinó la fracción HDL que quedó en el sobrenadante. Por lo que esta determinación se basa en el mismo principio que la determinación enzimática de colesterol.

Finalmente, la concentración de LDL se determinó por medio de la fórmula de Friedewald, descrita por Rijks en 1995.

6.5. Evaluación del estado inflamatorio y renal en ratas diabéticas

Para evaluar el daño renal, se realizaron determinaciones de parámetros bioquímicos en la orina de los animales, después del sacrificio. Tales parámetros constan de la determinación de glucosa, proteína, creatinina y microalbúmina en orina. Para evaluar el estado inflamatorio, se determinó la concentración de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ en suero, la cantidad relativa de NF-kB total, $\text{PPAR}\gamma$, $\text{IKB}\alpha$ y la expresión de VCAM-1 , ICAM-1 y $\text{TNF}\alpha$ en riñón.

6.5.1. Determinación de marcadores bioquímicos en orina

Los animales se separaron en jaulas individuales sin alimento y con acceso libre a agua. La orina se recolectó en un lapso de 12 horas, previas al sacrificio, para estudios bioquímicos. Para la determinación de glucosa, creatinina y proteínas, se emplearon tiras reactivas Multistix 10SG. La lectura de los parámetros se realizó en un analizador Clinitek.

Para la detección de microalbúmina y creatinina se utilizaron tiras reactivas Microalbumin cuya lectura se realizó en el mismo equipo.

6.5.2. Determinación de citocinas proinflamatorias en suero

Con el fin de determinar el estado inflamatorio en las ratas diabéticas, se determinaron los niveles séricos de las muestras obtenidas por punción cardiaca durante el sacrificio de las ratas, las cuales fueron centrifugadas durante 10 min a 2500 g y el sobrenadante se almacenó a -70°C hasta su posterior análisis.

Para la determinación de los niveles séricos de $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e IL- 1β se utilizó el kit comercial Invitrogen, según los procedimientos indicados por los fabricantes. En síntesis, el método consistió en una determinación cuantitativa por ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) tipo "sandwich".

Se adicionó la muestra de suero dentro de los pozos de la microplaca, los cuales contenían adheridos el anticuerpo específico para la proteína de interés, y posteriormente se agregó el segundo anticuerpo biotinilado. Así, durante la primera incubación, el antígeno de $\text{TNF}\alpha$ o IL- 1β se unió al anticuerpo inmovilizado en un solo sitio y al anticuerpo biotinilado. Posteriormente, se removió el 2º anticuerpo con una serie de lavados con solución amortiguadora comercial (provista por el kit) y se añadió la enzima peroxidasa de estreptavidina para que se uniera al anticuerpo biotinilado y así completar el cuarto miembro del sándwich. Se incubó 30 min a temperatura ambiente y se lavó nuevamente con solución

amortiguadora comercial para remover la enzima que no se unió. Finalmente, se añadió el sustrato, el cual actúa bajo la unión con la enzima para producir color. La intensidad del producto colorido se determinó a 450 nm y es proporcional a la concentración de la proteína de interés, interpolando los resultados en una curva de calibración estándar.

6.5.3. Determinación de NFκB total, IκB α y PPARγ en riñón

Estas determinaciones se llevaron a cabo utilizando la técnica molecular de Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal de conejo para el factor de transcripción NFκB p65, un anticuerpo policlonal de cabra para IκB α y un anticuerpo mononuclear de ratón para el factor de transcripción PPARγ. Todos los anticuerpos fueron de la marca Santa Cruz Biotechnology.

Las muestras de riñón se homogenizaron con solución amortiguadora de extracción, manteniéndose en agitación durante 45 minutos a 4° C. Después se centrifugaron a 100,000 g durante 60 minutos a 4° C. Se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante obtenido por el método de Lowry (1951). Posteriormente, se llevó a cabo la digestión de las muestras y se realizó una electroforesis SDS-PAGE para la separación de las proteínas presentes en las muestras. Al terminar la electroforesis, se realizó una transferencia semiseca, empleando una membrana de PVDF (polivinildenofluoruro). Finalmente se realizó el inmuno blot. Las membranas se incubaron con el primer anticuerpo (1:1000) por tres horas. Posteriormente, se colocó el segundo anticuerpo (1:1000) y se incubó durante 1 hora. La membrana se incubó con una solución de quimioluminiscencia y el revelado se realizó en películas fotográficas Kodak empleando una solución reveladora y una solución fijadora. La película con bandas se escaneó para obtener el área de píxeles por banda mediante el programa ImageJ 1.42q. Para verificar la cantidad de proteína cargada en el gel se realizó un “reblotting” para la proteína actina, con lo cual se comprobó que la cantidad de proteína cargada en el

gel fuera igual en cada pozo. Los resultados se reportaron como la relación de área de píxeles entre la proteína de interés y la proteína actina.

6.5.4. Expresión de VCAM, ICAM y TNF- α en riñón por RT-PCR

6.5.4.1. Aislamiento del RNA

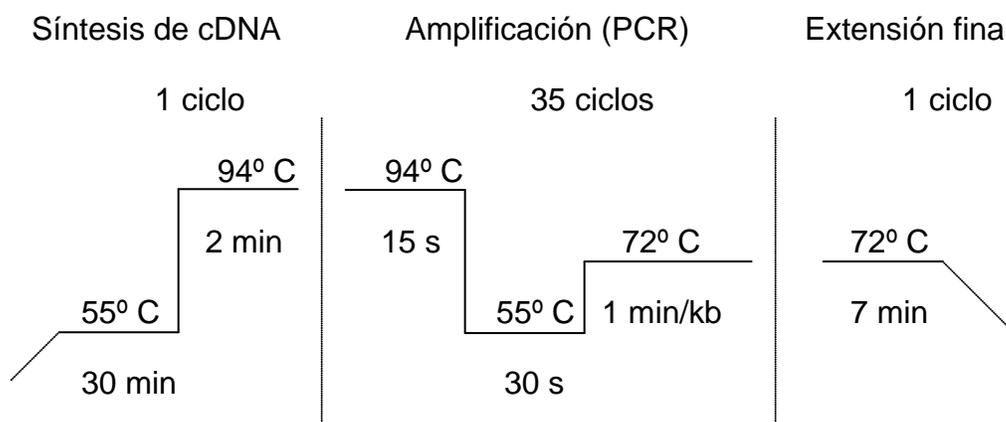
La extracción de RNA total se realizó por medio de un kit de extracción de una columna (RNeasy mini kit). El procedimiento se basa en las propiedades selectivas de unión del RNA a la membrana de sílica gel (contenida en la columna provista por el kit) gracias a soluciones amortiguadoras especializadas compuestas de altas concentraciones salinas y a las velocidades de centrifugación utilizadas, lo cual permite obtener moléculas de ARNm ≥ 200 nucleótidos.

Se pesaron los riñones almacenados a -70° C y se tomó una fracción de 20 – 30 mg. Inmediatamente, se trituraron con nitrógeno líquido y se homogenizaron con 600 μ L de solución salina de tiocinato de guanidina provista por el kit (solución RLT) en tubo eppendorf. Posteriormente, se adicionó 700 μ L de etanol (70%) para el lisado y se transfirieron 700 μ l de muestra sobre la columna. Se centrifugó por 15 s a 8000 x g. Se decantó el líquido y se realizaron 4 lavados con los buffers indicados por los fabricantes. Finalmente, el RNA unido a la membrana, se eluyó con agua libre de RNasas y se determinó la concentración por espectrofotometría.

6.5.4.2. Transcripción y amplificación

Para convertir el RNA total a su cadena complementaria y su posterior amplificación, se utilizó un kit comercial para RT-PCR de un solo paso (QIAGEN OneStep RT-PCR Kit), en el cual se adicionan los componentes necesarios para la síntesis de cDNA y PCR en el mismo tubo, utilizando oligonucleótidos específicos para el gen de interés y el RNA total.

Para la reacción, se tomaron 25 μ L de solución amortiguadora (buffer de reacción 2X), el cual contiene 0.4 mM de cada dNTP y 2.4 mM de sulfato de magnesio; se añadieron 100 ng de RNA, 10 picomoles del oligonucleótido sentido y 10 picomoles del oligonucleótido antisentido, 1 μ L de la mezcla de enzimas (RT/Platinum® Taq Mix) y se aforó a 50 μ L con agua DEPC. Los oligonucleótidos utilizados, se diseñaron en el GenBank de acuerdo al gen de interés (Cuadro 6). La conversión a cDNA y el PCR se llevó a cabo en un termociclador (Gene cycler 220V de Bio-Rad), bajo las siguientes condiciones de corrida:



De cada producto de PCR, se corrieron 5 μ L en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Las fotografías instantáneas de los geles fueron digitalizados en escala de grises. La cantidad de ácidos nucleicos fueron determinados por densitometría y cada cantidad será proporcional al logaritmo de la densidad óptica. La suma de los logaritmos de los valores de los pixeles serán usados para estimar la cantidad de ácido nucleico en una banda, el cual es expresado en unidades arbitrarias. La cantidad de cDNA amplificado fue normalizada con gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Cada alícuota de RNA fue amplificada por triplicado (Sassy-Pringet, 2000).

Cuadro 6. Oligonucleótidos para la amplificación por PCR

	Secuencia	Longitud (bp)	Temperatura Alineamiento (°C)	Ciclos (n)
GAPDH				
Sentido	5' - TGCCACTCAGAAGACTGTGG - 3'	575	58	35
Antisentido	5' - TGTGAGGGAGATGCTCAGTG - 3'			
VCAM-1				
Sentido	5' - CGGTCATGGTCAAGTGTTG - 3'	785	55	35
Antisentido	5' - CTCCAGTTTCCTTCGCTGAC - 3'			
ICAM-1				
Sentido	5' - CCTGTTTCCTGCCTCTGAAG - 3'	558	55	35
Antisentido	5' - GTCTGCTGAGACCCCTCTTG - 3'			
TNF-α				
Sentido	5' - CTCTCAAGGGACAAGGCTG - 3'	454	55	35
Antisentido	5' - TTGTTGAAATTCTGAGCCC - 3'			

6.6. Análisis de Datos

Los resultados se reportaron como la media \pm el error estándar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de 90 y 95%. La diferencia entre los tratamientos se realizará mediante la comparación de medias por el método Tukey-Kramer y la comparación de medias de cada tratamiento con su grupo control, por el método de Dunnet. Los datos se analizarán con el paquete estadístico JMP 5.0.1

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

7.1. Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los frijoles procesados

Se realizó la determinación de compuestos fenólicos en las harinas de frijol en estudio, ya que se ha reportado que alimentos ricos en polifenoles tienen actividad antiinflamatoria y antioxidante (Aggarwal y col., 2004; Tsuda y col., 2004; Hang y col., 2005), además de que reducen el riesgo de padecer muchas enfermedades, incluyendo enfermedades crónicas como la enfermedad cardiovascular, hipertensión, cáncer y diabetes (Kris-Etherton y col., 2004).

Es imprescindible mencionar que los frijoles enlatados, atraviesan una serie de procesos térmicos y manejos para la obtención del producto final. Hay que considerar que se tratan de frijoles de baja calidad comercial, es decir, por lo general, se encuentran quebradizos y son almacenados hasta por 1 año a temperatura y humedad no controlada, antes de que presenten endurecimiento. En este sentido se han realizado trabajos con frijol y se ha encontrado que durante el almacenamiento ocurre un aumento en el oscurecimiento y un incremento de los compuestos fenólicos a partir de los ocho meses (Oliveira y col., 2002). Además, para la obtención del frijol refrito, es necesario de mínimo 2 procesos de cocción y la esterilización del producto final, lo que incide directamente en el contenido de fotoquímicos. Diversos investigadores han reportado la pérdida de compuestos fenólicos tras el tratamiento térmico y el enlatado. La evidencia sugiere que las pérdidas se deben en gran medida a la lixiviación en la salmuera o jarabe que contiene al producto, más que la propia oxidación (Chaovanalikit y Wrolstad 2004; Hong y col., 2004), ya que durante el enlatado se inactivan enzimas que puedan oxidar al producto (peroxidasas), se aplica vacío y se protege de la luz con el envase metálico. Alimentos empacados al vacío o enlatados sin jugo, almíbar o salmuera, muestran ligeros cambios en el contenido de fenoles

totales (Rickman y col., 2007). Además, es importante considerar que el contenido de compuestos fenólicos del frijol refrito no comprende sólo al aportado por el frijol, sino también a los aditivos que se emplean para obtener el producto final y dependen en gran medida de la empresa productora.

Los resultados de las determinaciones de compuestos fenólicos totales, taninos condensados, antocianinas y la capacidad antioxidante se presentan en el Cuadro 7 y corresponden al producto final, sin el conocimiento del tiempo en que permanecieron en el anaquel, y los resultados de los frijoles secados a 60° C, ya que estos últimos fueron utilizados para los estudios *in vivo*. Los datos de los frijoles liofilizados, se presentan para comparar el efecto del secado adicional sobre el contenido de fitoquímicos y la capacidad antioxidante.

Cuadro 7. Concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las harinas de frijoles procesados industrialmente.

Estado del frijol	Marca	Fenoles Totales ¹	Taninos Condensados ²	Antocianinas ³	Capacidad antioxidante ⁴
Frijol Secado/60°C	LC	3.2 ± 0.02 ^{aA}	2.0 ± 0.08 ^{aA}	134.6 ± 0.02 ^{aA}	10.2 ± 0.53 ^{aA}
	LS	3.4 ± 0.05 ^{aA}	1.78 ± 0.07 ^{aA}	58.8 ± 0.05 ^{bA}	8.7 ± 0.17 ^{bA}
	Isa	3.7 ± 0.03 ^{aA}	2.0 ± 0.01 ^{aA}	65.7 ± 0.03 ^{cA}	7.3 ± 0.35 ^{cA}
Frijol Liofilizado	LC	4.1 ± 0.02 ^{aB}	2.0 ± 0.01 ^{aA}	50.6 ± 0.09 ^{dB}	11.6 ± 0.93 ^{aA}
	LS	4.4 ± 0.11 ^{aB}	1.4 ± 0.04 ^{bB}	51.5 ± 0.02 ^{dB}	9.5 ± 0.84 ^{aA}
	Isa	4.1 ± 0.04 ^{aB}	1.8 ± 0.02 ^{aA}	53.3 ± 0.05 ^{cB}	8.4 ± 0.31 ^{bB}

¹Expresados en mg eq. Ácido gálico/g de haria; ²Expresados en mg eq. (+)-catequina/g de harina; ³Expresados en mg eq. 3-glucósido de cianidina/kg de harina; ⁴ Expresados en µM eq. Trolox/g de harina. Los valores representan la media ± E.E. Letras minúsculas indican diferencia estadística significativa entre los productos comerciales para cada parámetro evaluado, letras mayúsculas

indican diferencia estadística significativa entre proceso de secado para cada marca ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tuckey. LC: La Costeña; LS: La Sierra; Isa: Isadora.

En el presente estudio, el contenido de fenoles totales y taninos condensados no varió significativamente entre las marcas de estudio (3.2 y 3.7 mg eq. ac. gálico/g de harina y 1.78 – 2.0 mg eq. (+)-catequina/g harina, respectivamente), sin embargo se observó una ligera disminución de fenoles totales después del secado a 60° C. Esta disminución puede deberse a la pérdida de algunos compuestos fenólicos volátiles a tal temperatura, una posible oxidación o bien el acomplejamiento con otros componentes del producto final, contribuyendo a una disminución en su concentración (Mederos, 2006), no obstante futuras investigaciones sustentarán tales supuestos.

Actualmente, no existen estudios acerca del contenido de fenoles en este tipo de frijoles (bayos refritos procesados), los pocos que hay para frijoles bayos incluyen métodos tradicionales de cocción y los resultados se reportan como mg eq de ácido tánico. Teniendo en cuenta, que el frijol bayo refrito ha sido sometido a una serie de procesos térmicos, se le han añadido diferentes ingredientes y aditivos, los resultados sugieren que aun contienen compuestos fenólicos tras el procesamiento en comparación con aquellos que solo han recibido una cocción tradicional. Es importante destacar, que tal contenido puede ser atribuido a los ingredientes añadidos, ya que se ha encontrado que tras el refrito con aceite vegetal se observa un incremento de fenoles totales e incluso la capacidad antioxidante. En este sentido, Almanza-Aguilera y col., (2009), reportaron que existe una gran variabilidad en el contenido de fitoquímicos de frijoles negros cocidos y refritos de diferentes variedades, observando que en cuanto al contenido de fenoles totales, antocianinas y taninos, existen incrementos de estos fitoquímicos hasta de un 40%, mientras que en otras variedades se presentó una disminución del 80%. Por lo tanto, el contenido de fenoles y taninos no solo se puede atribuir al frijol como tal, sino también a la variedad de frijol cosecha a cosecha, así como a las condiciones de procesamiento y los aditivos empleados para la obtención del producto final.

En cuanto al contenido de antocianinas, los resultados muestran que los frijoles LC secados a 60° C tienen mayor contenido de antocianinas comparados con los frijoles LS e Isa (134.6 vs 58.8 mg eq. 3-glucósido de cianidina/kg de harina), en cambio, tal diferencia no se observó en los frijoles liofilizados. Cabe destacar que durante el secado a 60° C del frijol LC, se observó oscurecimiento, lo cual puede interferir en la cuantificación de antocianinas. Por otro lado, se ha reportado que en alimentos enlatados, estos compuestos pueden migrar fácilmente del propio alimento al medio que los contiene durante el proceso, observándose que existe mayor disponibilidad durante la cuantificación (Chaovanalikit y Wrolstad, 2004). Para la obtención de frijol refrito procesado se aplica una salmuera para mantener fresco por más tiempo al producto. Es posible que durante el almacenamiento y el secado a 60° C haya una liberación de antocianinas a la salmuera y sea más fácil la extracción y cuantificación, lo cual depende en gran medida de la cantidad de salmuera añadida por la empresa productora.

Finalmente, se observó diferencia significativa en la capacidad antioxidante de los frijoles procesados estudiados (7.3 – 10.2 μ M eq. Trolox/g de harina), sin embargo, estadísticamente, solo hubo una ligera disminución de la capacidad antioxidante para los frijoles Isa, tras el proceso de secado a 60° C. Hasta donde se tiene conocimiento no existen trabajos en la literatura acerca de la capacidad antioxidante de estos frijoles, por lo que estos datos son una aportación e investigaciones futuras en donde se tenga control de la calidad del frijol, los procesos térmicos y los aditivos empleados, podrán fortalecer las hipótesis hasta ahora planteadas tras los resultados obtenidos.

7.2. Regulación de biomarcadores de diabetes por el consumo de frijol procesado industrialmente

7.2.1. Niveles de glucosa sérica

En el presente estudio, se estableció un modelo experimental de Diabetes *in vivo* con una dosis única administrada de estreptozotocina (55 mg/kg de peso corporal) el cual destruye las células β del páncreas, ocasionando una insuficiente o nula secreción de insulina (Szkudelski, 2001), simulando así una etapa avanzada de la enfermedad. Estudios previos en el laboratorio (Martínez; Lomas, 2008) demostraron que a estas concentraciones administradas de estreptozotocina, la enfermedad puede ser considerada como una diabetes de etapas avanzadas, desarrollando daño a diferentes órganos, a partir de la tercer semana de inducción.

En el presente estudio (Figura 2), todos los animales iniciaron con el mismo nivel de glucosa (240 mg/dL).

Se puede observar un incremento de la concentración de glucosa del grupo control a través del tiempo. Sin embargo, al incorporar frijol procesado en la dieta, se observó una tendencia a mantener estos niveles menores al grupo control, excepto para el frijol procesado Isa 3%. Los grupos alimentados con bajas concentraciones incorporadas a la alimentación (3%), mostraron una disminución similar a aquellos animales alimentados con el 25%, a excepción de Isa, la cual solo mostró efecto cuando se incorpora a la dieta al 25%.

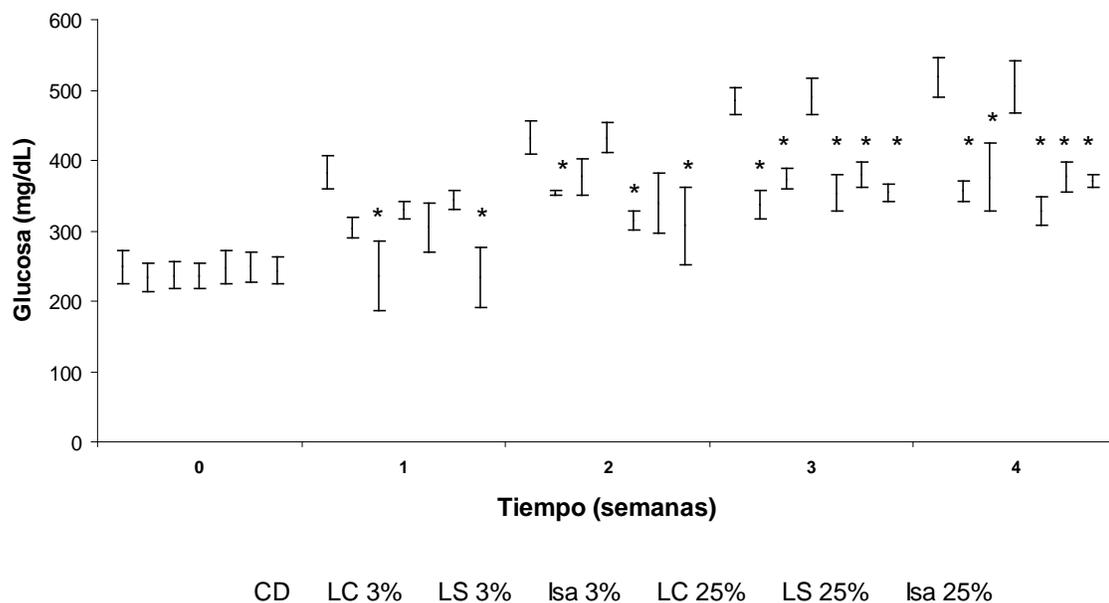


Figura 2. Concentración de glucosa sanguínea (mg/dL) en las ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada con frijol procesado industrialmente.

Los valores se presentan como la media de la concentración de glucosa en sangre \pm E.E.

*Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), analizados con la prueba de Dunnet.

CD = Control Diabético, LC = La Costeña, LS = La Sierra, Isa = Isadora

Los resultados demuestran que al final del periodo experimental se presentó una disminución de glucosa sérica (~40%), estadísticamente significativa, para todos los grupos (excepto Isa al 3%), evitando que los niveles de glucosa se elevaran como en el caso del grupo control, lo que sugiere que el consumo de frijol procesado industrialmente puede ayudar al control de la enfermedad. Si bien, los niveles séricos de glucosa no alcanzaron los niveles basales (70–90 mg/dL), si se mantienen los niveles de glucosa a partir de la segunda semana alrededor de 300 – 350 mg/dL, principalmente para los grupos de LC y LS a ambas concentraciones. Este efecto resulta importante, ya que las oscilaciones de glucosa, características durante la diabetes, son las que promueven mayor riesgo de desencadenar el estado inflamatorio (Esposito y col., 2002).

Se ha reportado que en el frijol enlatado se incrementa la digestibilidad *in vitro* del almidón, en comparación con los frijoles cocidos de forma tradicional (Tovar y col., 2005). Esto sugiere que este tipo de frijoles tiene un alto índice glicémico elevando la glucosa post-prandial, sin embargo, no se observó un aumento de los niveles séricos de este carbohidrato respecto al control diabético. También se ha reportado que harinas de frijoles enlatados presentan una disminución en el contenido de almidón disponible y aun más, el proceso de deshidratado de los frijoles incrementan el contenido de almidón resistente y retrogradado (Osorio-Díaz y col., 2003; Foster-Powel y col., 2002), lo cual sugiere que los carbohidratos presentes en este tipo de frijoles (fibra, almidón resistente, oligosacáridos) no tienden a incrementar la glucosa post - prandial. Adicionalmente, en estudios previos, se ha encontrado que los compuestos fenólicos presentes en el frijol tienen diversas acciones en la respuesta glicémica, ya que, pueden tener un efecto inhibitorio de la enzima α -amilasa, lo cual se traduce en una mayor dificultad de digerir los carbohidratos glicémicos, incrementando así la cantidad de almidón resistente durante la digestión. Por otra parte, en hígado, los compuestos fenólicos pueden inhibir la actividad de enzimas gluconeogénicas como la glucosa 6-fosfatasa y fructosa 1,6-bifosfatasa (Pari y Venkateswara, 2003), enzimas encargadas de la conversión de glucosa a partir de sustratos gluconeogénicos, lo cual disminuye la concentración de glucosa en suero y su producción endógena, evitando así la elevación de niveles séricos de glucosa en el paciente diabético. Además, se ha reportado que los compuestos fenólicos tales como ácido gálico, catequina y vainillina incrementan la sensibilización de la insulina, por lo que se incorpora glucosa a tejido dependientes de esta hormona, disminuyendo así los niveles de glucosa en torrente sanguíneo (Guzmán y col., 2004). Lo anterior sugiere, que el consumo de frijol procesado puede incrementar la secreción y/o la acción de la hormona insulina, facilitando la incorporación de glucosa sérica a los tejidos, como el adiposo y muscular, evitando que los niveles de glucosa se eleven drásticamente en torrente sanguíneo (Choi y col., 2008).

7.2.2. Peso corporal

Durante la diabetes, un factor importante de diagnóstico es la pérdida de peso corporal, ya que en cuanto evoluciona la enfermedad hay una correlación positiva con la pérdida de peso (Cowie y Harris, 1995), debido a que hay una mayor degradación de triglicéridos provenientes del tejido adiposo y degradación de proteínas del músculo, ya que la hormona insulina media la síntesis de proteínas e inhibe la β -oxidación de ácidos grasos (Pirola y col. 2004). Por tal razón, se monitoreó el peso corporal de las ratas diabéticas en estudio. En la Figura 3, se puede observar el peso de los animales a través del tiempo de experimentación.

Todos los animales partieron del mismo peso corporal. En cuanto evolucionó la enfermedad, se observa una clara tendencia del grupo control diabético a disminuir el peso, hasta un 20%. Sin embargo, se observó una tendencia a mantener el peso, por parte de los grupos alimentados con altas concentraciones de frijol (25%). En cambio, los grupos alimentados con bajas concentraciones de frijol (LC e Isa al 3%) no mostraron efecto significativo sino hasta el final del periodo de experimentación. Sólo los grupos LS 3% y LC 25%, mostraron una capacidad de incrementar el peso corporal al final de la experimentación hasta un 25 y 21%, respectivamente, en comparación con el grupo control diabético.

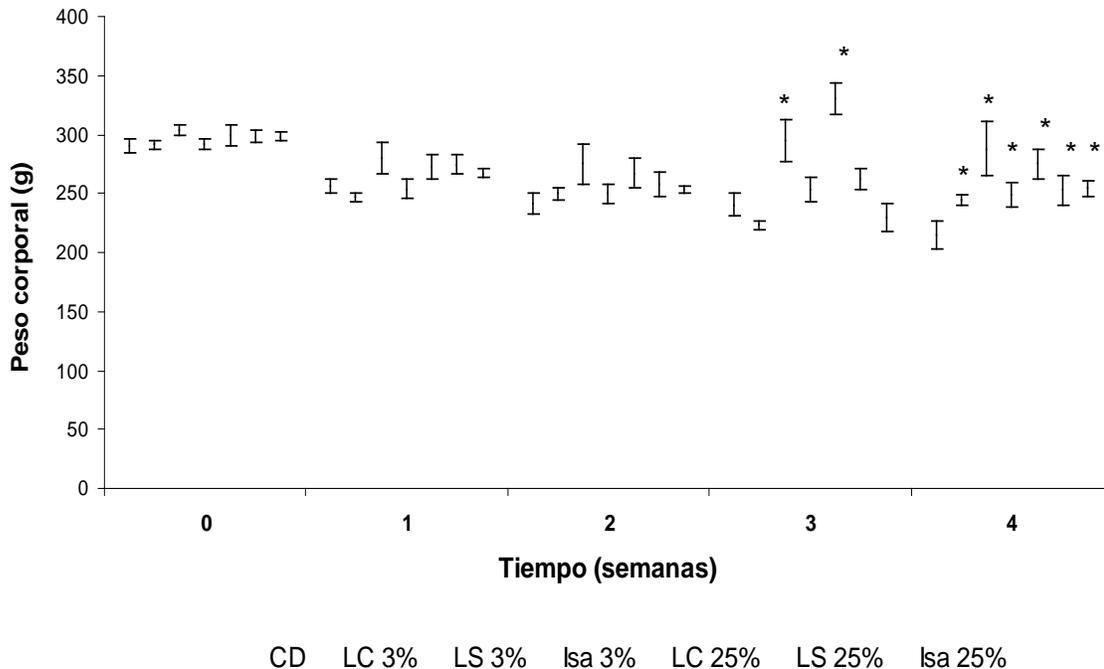


Figura 3. Peso corporal semanal en ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada con frijol procesado industrialmente.

Los valores se presentan como la media del peso corporal \pm E.E.

*Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), analizados con la prueba de Dunnet.

CD = Control Diabético, LC = La Costeña, LS = La Sierra, Isa = Isadora

Estos resultados sugieren, que el consumo del frijol procesado industrialmente, puede ejercer efecto en la regulación del peso corporal aun en etapas avanzadas de la enfermedad. Es posible, que el consumo de frijol aumente la secreción de insulina y/o su señalización en tejidos dependientes de esta hormona, ya que la insulina es necesaria para incorporar glucosa a las células musculares para obtener energía e incrementar la síntesis de proteínas musculares y almacenamiento de triacilglicéridos en tejido adiposo. Además, durante la diabetes hay una mayor demanda de aminoácidos, principalmente alanina y glutamina, por parte del hígado para generar más glucosa a través de la gluconeogénesis. Estos aminoácidos provienen principalmente de la degradación

de proteínas musculares, lo que genera una pérdida de peso corporal (Klimes, y col., 1997; Salway, 2004).

7.2.3. Consumo de alimento y agua

La hormona insulina no solo controla los niveles de glucosa, sino que induce la producción y secreción de hormonas, tal como, el péptido similar al glucagón tipo 1 (glucagon like peptide amide 1, GLP-1, por sus siglas en inglés), ya que suprime la ingesta de alimento por medio de la sensación de saciedad (Gutzwiller y col., 1999). Además, se ha encontrado que la insulina modula la secreción de neuropéptidos en el hipotálamo, los cuales regulan la ingesta de alimento (Schwartz y col., 1992; Arora y Anubhuti, 2006). Durante la diabetes, la insuficiente secreción o acción de la insulina, no pueden activar la secreción de las hormonas encargadas de la saciedad. Por lo tanto, el monitoreo del consumo de alimento es una medida indirecta de la secreción y acción de la insulina.

Durante el tiempo de experimentación, cada día se monitoreó el consumo de alimento y en la Figura 4 se muestra su consumo semanal de los animales en experimentación.

Se puede observar que, estadísticamente, todos los grupos tuvieron el mismo consumo de alimento al iniciar el experimento. En cuanto transcurrió el tiempo, la tendencia de los animales diabéticos fue de incrementar el consumo de alimento. Mientras que, los grupos alimentados a bajas concentraciones de frijol incorporado en la dieta (3%), mostraron una disminución de la ingesta hasta de un 22%, en comparación con el grupo control diabético. Los grupos alimentados con concentraciones altas de frijol, solo mostraron un ligero efecto en la regulación del apetito en la tercera semana, sin embargo, tal efecto no fue estadísticamente significativo, por lo tanto en estos grupos no hubo regulación en el control de la saciedad.

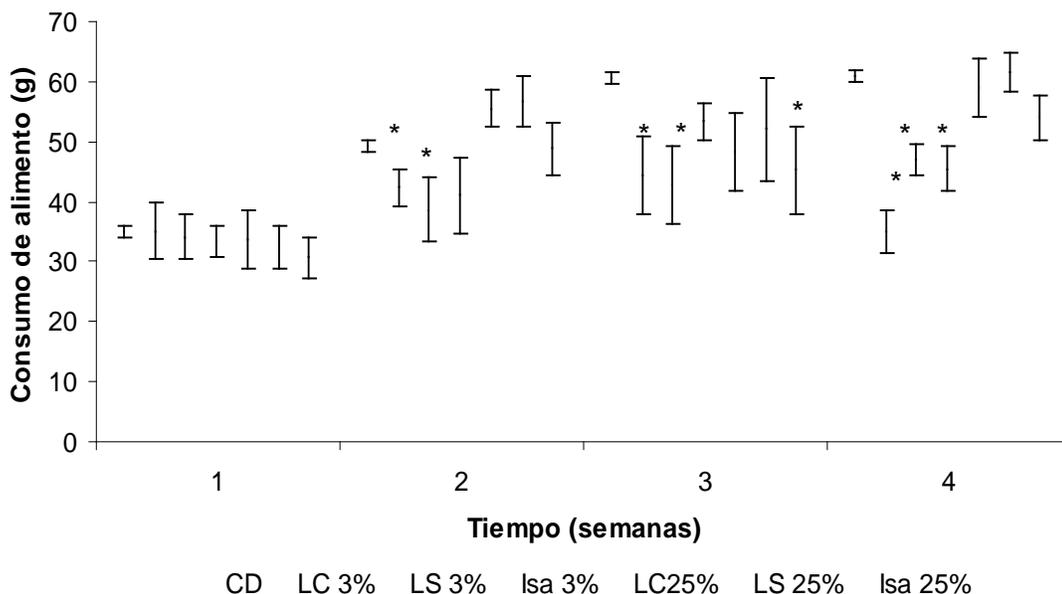


Figura 4. Consumo semanal de alimento de las ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada con frijol procesado industrialmente.

Los valores se presentan como la media del consumo de alimento diario por rata \pm E.E.

*Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), analizados con la prueba de Dunnet.

CD = Control Diabético, LC = La Costeña, LS = La Sierra, Isa = Isadora

Otro parámetro importante a considerar durante la diabetes es el consumo incrementado de agua, lo que se denomina polidipsia (Braunwald y col., 1998). La deshidratación está claramente asociada con un mal control de la diabetes debido a la diuresis osmótica causada por los altos niveles de glucosa en sangre. Los cambios en el balance ácido base y un incremento en la osmolalidad de la orina debido a la glucosuria inducida por la hiperglicemia y la cetoacidosis conllevan a una mayor secreción de orina y deshidratación (IOM, 2005). Por lo tanto, un mal control de la diabetes se refleja en un mayor consumo de agua.

Durante la experimentación, se observó la presencia de polidipsia desde el tercer día de inducción de la diabetes, por lo que se monitoreó el consumo de

agua. El patrón de consumo se puede observar en la Figura 5 en donde se grafica el promedio de la cantidad de agua, en cada semana. Se puede observar que, las ratas consumieron la misma cantidad de agua en la primera semana. Sin embargo, a medida que transcurrió el tiempo se puede observar un incremento progresivo del consumo de agua por el grupo control diabético de 25%, no así en los grupos alimentados con frijol.

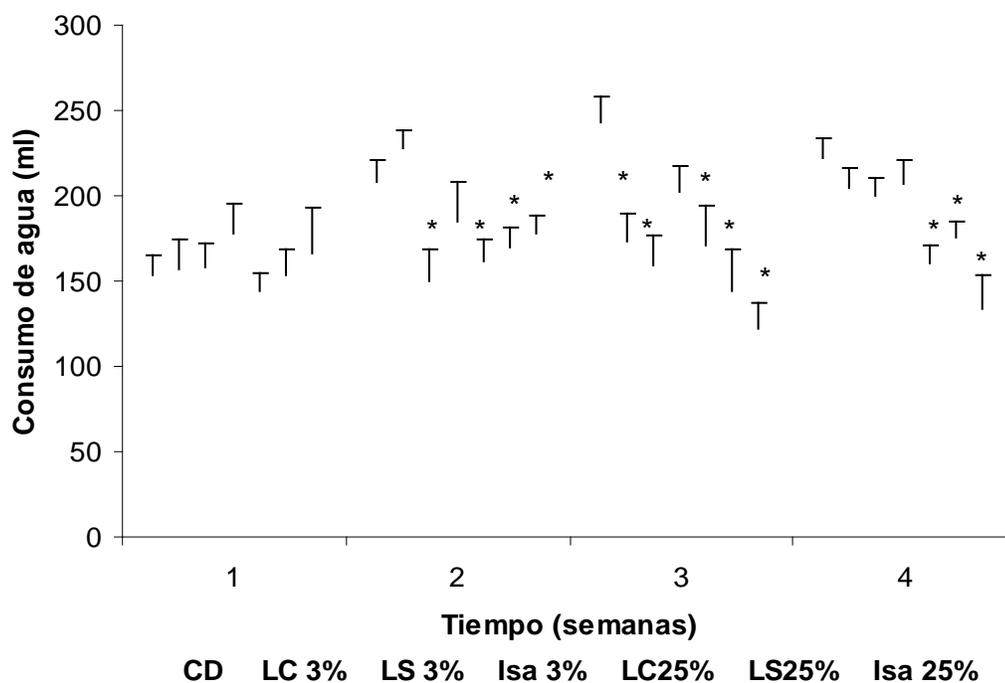


Figura 5. Consumo semanal de agua de ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con frijol procesado industrialmente.

Los valores se presentan como la media del consumo de agua por cada rata \pm E.E.

*Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), analizados con la prueba de Dunnet.

CD = Control Diabético, LC = La Costeña, LS = La Sierra, Isa = Isadora

Para los grupos alimentados con bajas concentraciones de frijol, se puede observar que no mostraron efecto en este parámetro. Sin embargo, a altas concentraciones se presenta un menor consumo de agua. Esto sugiere, que para ejercer un efecto benéfico en el control de la ingesta de agua, se necesitan consumir concentraciones más altas de frijol.

Estudios *in vivo*, demuestran que el consumo de algunos alimentos ricos en polifenoles disminuyen la ingesta de agua y alimento en ratas diabéticas (Crespy y Williamson, 2004; Utsunomiya y col., 2005). Los resultados anteriores, sugieren que el consumo de frijol industrializado a concentraciones bajas incorporadas a la dieta (3%) pueden ejercer un efecto importante, posiblemente a través de la acción de la insulina, o bien, incrementando la secreción de hormonas anorexigénicas independientemente de la acción insulínica.

7.2.4. Perfil lipídico

La baja producción de insulina o su acción deficiente, promueve la movilización de grasa almacenada en el tejido adiposo al torrente sanguíneo, por lo que no se metaboliza completamente y constituyen un riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (Stamler y col., 1993; Schwartz y col., 1992). La enfermedad cardiovascular aterosclerótica puede causar hasta un 70% aproximadamente de las muertes de los pacientes con diabetes y de cerca de 40% de las muertes en la población no diabética (Grundy y col., 1999).

Valores superiores de triglicéridos a 150 mg/dL indican un riesgo de padecer enfermedad cardiovascular. Niveles altos de triglicéridos séricos corresponden a una deficiente o nula acción de la insulina, la cual introduce al tejido adiposo la glucosa para producir glicerol-3-fosfato, el cual permite la reesterificación y almacenamiento de ácidos grasos, provenientes del torrente sanguíneo, en forma de triacilglicéridos (Mathews, 2002). Se puede observar en el Cuadro 8, que los niveles de triglicéridos para el grupo diabético es mayor al reportado para animales sanos (~86 mg/dL) (Lomas, 2008). El consumo de frijol

produjo una disminución de la concentración de triglicéridos (37-48%) para los grupos LS y LC (3 y 25%) respectivamente, al compararlo con el control diabético, lo cual resultó estadísticamente significativo. Los grupos alimentados con Isadora a ambas concentraciones, no mostraron una disminución significativa. Los resultados muestran, que el consumo de frijol enlatado probado pueden disminuir las concentraciones séricas de triacilglicéridos, lo cual se relaciona con un aumento de peso observado para los grupos de LC y LS.

Cuadro 8: Perfil de lípidos en suero de ratas diabéticas alimentadas durante cuatro semanas con frijol procesado industrialmente.

	TRIGLICÉRIDOS	COLESTEROL	HDL	LDL
Control	228.0 ± 17.1	70.2 ± 6.7	11.6 ± 1.1	58.6 ± 5.6
LC 3%	117.5 ± 7.6 *	50.8 ± 7.4 *	11.7 ± 0.2	39.0 ± 7.1 *
LS 3%	123.2 ± 8.6 *	51.9 ± 7.8 *	15.5 ± 0.7 *	36.4 ± 7.0 *
ISA 3%	159.0 ± 36.0	53.0 ± 3.9 *	11.8 ± 1.2	41.2 ± 4.1
LC 25%	117.3 ± 5.4 *	56.0 ± 6.0 *	16.3 ± 0.8 *	30.1 ± 5.2 *
LS 25%	142.7 ± 14.0 *	41.0 ± 6.3*	14.2 ± 1.2 *	27.0 ± 4.0*
ISA 25%	189.9 ± 17.1	65.1 ± 4.8	10.4 ± 1.0	54.6 ± 2.8

Las concentraciones de lípidos se presentan en mg/dL

Los valores se presentan como la media ± E.E.

*Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), analizados con la prueba de Dunnet

Control = Control Diabético, LC = La Costeña, LS = La Sierra, Isa = Isadora

En cuanto al colesterol total, se puede observar una disminución de las concentraciones séricas para todos los grupos excepto para Isadora al 25%, con respecto a los animales control diabético. Tal disminución varió desde un 20 hasta un 40%. Sin embargo, el hecho de que disminuya el colesterol total no es suficiente y se requiere considerar otros lípidos relacionados con el colesterol como el HDL y la LDL, ya que un incremento de esta última lipoproteína tiene potencial aterogénico. Así pues, se puede observar que de los valores de colesterol total, solo los grupos alimentados con LS a ambas concentraciones y LC al 25 % mostraron un efecto significativo al aumentar las concentraciones de HDL respecto al grupo control diabético. En cambio, los grupos alimentados con LS y LC (3 y 25%) mostraron un efecto significativo al disminuir las concentraciones circulantes de LDL, desde un 27 hasta un 53%. Estos resultados son interesantes, ya que en estos grupos disminuyeron los niveles séricos de triglicéridos y las concentraciones de LDL, el factor más importante para desarrollar aterosclerosis, aunado a esto, altas concentraciones de glucosa modifican estructuralmente a las LDL por glicosilación, oxidándose fácilmente e incrementando el riesgo cardiovascular (Witztum y col. 1982). Así pues, el consumo de estos frijoles (LC y LS) puede ejercer un efecto benéfico durante la diabetes, evitando que los niveles de triglicéridos y LDL séricos aumenten, lo cual puede constituir un efecto protector de desarrollar enfermedad cardiovascular.

Se ha reportado que la fibra del frijol y el almidón resistente, al ser metabolizados, sufren una fermentación por la microflora del colon produciendo ácidos grasos de cadena corta como acético, propiónico y butírico. El ácido propiónico puede disminuir los niveles de colesterol debido a la inhibición de la colesterogénesis, a través de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA) (Serrano y Goñi, 2004). Diferentes estudios sugieren que los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de diferentes compuestos puede ejercer un efecto importante al disminuir los niveles de la citocina TNF- α (Amigó-Correig y col., 2008), la cual durante la diabetes, actúa inhibiendo a la lipoproteína lipasa, aumentando así los niveles de colesterol LDL en torrente sanguíneo (Grunfeld y Feingold, 1991). Es probable, que los compuestos del frijol pudieran

disminuir esta citocina en suero. Adicionalmente, se ha reportado que fitoquímicos como los flavonoides pueden emplear dos mecanismos de protección contra el daño celular provocado por la oxidación de las LDL: la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas y el bloqueo directo a nivel celular de la toxicidad de LDL oxidada (Álvarez y Orallo, 2002; Zhang y col., 2006). Por lo tanto, los resultados sugieren que el consumo de frijol, el cual puede contener carbohidratos no digeribles, como el almidón resistente, oligosacáridos y fibra, así como compuestos fenólicos, es benéfico para evitar una dislipidemia, en el modelo de diabetes inducida por estreptozotocina.

7.3. Regulación de biomarcadores de daño renal e inflamación

7.3.1. Marcadores bioquímicos en orina

Los parámetros bioquímicos clínicos utilizados comúnmente para evaluar la función renal se basan en las mediciones de albúmina, proteína total, creatinina, cetona y glucosa, principalmente. Si bien, la excreción urinaria de albúmina no es un parámetro definitivo para diagnosticar el daño renal, la proteína excretada es un buen marcador de daño e incluso, de insuficiencia renal crónica (Suzuki y col., 2005). Por lo tanto, estos parámetros se midieron en la orina recolectada de 12 horas en condiciones de ayuno, para evaluar el daño renal.

En el Cuadro 9, se pueden observar las concentraciones de glucosa, creatinina, microalbúmina y proteína total. En animales sanos, el valor normal de glucosa en orina es menor a 100 mg/dL. Los resultados de esta medición revelan que en los animales diabéticos los niveles exceden hasta 10 veces más que los valores de referencia. Esto sugiere, en primera instancia, que en el modelo experimental se presentó un estado de hiperglicemia, la cual produce una descompensación de la filtración glomerular. Esto fue también observado por Lomas y por Martínez en el 2008, utilizando modelos experimentales con ratas inducidas con estreptozotocina (55 mg/kg de peso), observó un incremento del

100% en los niveles de los marcadores bioquímicos tempranos de daño renal, respecto al control no diabético.

Cuadro 9. Parámetros bioquímicos en la orina de ratas diabéticas alimentadas durante cuatro semanas con frijol procesado industrialmente

	GLUCOSA¹	CREATININA²	MICROALBUMINA³	PROTEÍNA⁴
CD	198.0 ± 18.0	12.0 ± 1.2	1.40 ± 0.40	1.2 ± 0.02
LC 3%	176.2 ± 14.6	9.0 ± 0.2*	0.54 ± 0.05*	0.56 ± 0.05 *
LS 3%	150.0 ± 14.7*	6.8 ± 0.2*	0.45 ± 0.04*	0.53 ± 0.04*
ISA 3%	186.0 ± 16.3	1.9 ± 0.1*	1.44 ± 0.16	0.87 ± 0.07
LC 25%	190.8 ± 17.1	2.1 ± 0.3*	1.07 ± 0.11	0.60 ± 0.03 *
LS 25%	275.0 ± 32.2*	2.5 ± 0.3*	0.54 ± 0.08*	0.80 ± 0.01*
ISA 25%	200.0 ± 14.7	1.8 ± 0.1 *	0.60 ± 0.04*	1.0 ± 0.04

¹Expresada como mg de glucosa/ 12 h

²Expresada como mg de creatinina/12 h

³Expresada como mg de microalbúmina/12 h

⁴Concentración expresada en mg de albúmina/12 h

Los valores se presentan como la media ± E.E.

*Indica diferencia estadística significativa (p<0.05), analizados con la prueba de Dunnet.

Control = Control Diabético, LC = La Costeña, LS = La sierra, Isa = Isadora

El grupo alimentado con LS 3% mostró niveles de glucosa en orina que están por debajo de los niveles excretados por el grupo control (hasta el 48%). En contraste, el grupo alimentado con el mismo frijol a concentraciones más altas de incorporación en la dieta (25%), mostró niveles por arriba de los niveles de excreción urinaria de glucosa del grupo control diabético (39%). Este hecho

sugiere, que algún compuesto del frijol refrito procesado, al ser consumido a altas concentraciones, puede ejercer un efecto inhibitorio en la disminución de la diuresis osmótica. Ningún otro grupo mostró una disminución estadísticamente significativa. Estos resultados nos sugieren que la disminución de glucosa observada para los grupos LS y LC, no es la suficiente para disminuir la diuresis osmótica causada por la glucosa.

Los niveles elevados de creatinina en orina indican una mala función del riñón para depurar las concentraciones de creatinina séricas provenientes de la degradación de proteínas musculares (Schrier, 2007). En cuanto a los niveles de creatinina, se observó una disminución de este valor para todos los grupos alimentados con frijol. Es interesante observar que los niveles de creatinina disminuyeron significativamente para los grupos alimentados a mayores concentraciones y principalmente para los grupos de Isadora al 3% y 25%.

Se han reportado también, cambios renales en modelos experimentales de diabetes inducida con estreptozotocina, observándose hipertrofia glomerular, hiperfiltración y un incremento de la excreción urinaria de albúmina (Grønbæk y col., 2008). Existen diversas evidencias que sugieren que el riesgo de padecer nefropatía diabética y enfermedad cardiovascular comienza cuando los valores de excreción urinaria de albúmina aun están en los intervalos de normoalbuminuria. (<30 mg/día). Sin embargo en pacientes diabéticos, hay mayor riesgo de que la enfermedad progrese a microalbuminuria (Forsblom, 1998), la cual se diagnostica al excretar concentraciones de albúmina entre 30 y 300 mg/L durante 24 horas (Gross y col., 2005). Los resultados de la presente investigación, mostraron que para el grupo control diabético la excreción de albúmina fue superior a los 30 mg/L de orina, lo que sugiere que el modelo experimental mostró un estado de microalbuminuria.

Se observó un efecto significativo sobre la disminución de la microalbuminuria para los grupos LC 3% y LS 3 y 25%. Esta disminución sugiere que el consumo de frijol, principalmente a bajas concentraciones (3% de incorporación en la dieta), puede ejercer un efecto benéfico en la función renal, lo

que se relaciona con menores concentraciones de citocinas, principalmente $\text{TNF}\alpha$, la cual en diversos estudios, se ha encontrado que juega un papel crítico en el desarrollo de microalbuminuria (Mahmud y col., 1995). A pesar de que la microalbuminuria se ha considerado como un factor de riesgo para progresar a macroalbuminuria, no todos los pacientes progresan a tal estado y pueden regresar a un estado de normoalbuminuria (Caramori y col., 2000), por lo cual es necesaria la determinación de proteinuria. En el Cuadro 9, se presentan los niveles de proteína en orina de los animales en estudio y se observó que tal estado, no progresó a proteinuria, sin embargo, las concentraciones de proteínas excretadas para los grupos LS y LC son menores en comparación con las cantidades excretadas por el grupo control. Estos valores están relacionados con una menor concentración de glucosa y producción de la citocina $\text{TNF}\alpha$ en suero. Los mecanismos por los cuales se observan estas disminuciones, comprenden tanto las concentraciones de citocinas en sangre, como el estado oxidativo e inflamatorio en el riñón, por lo tanto, es posible que los componentes del frijol procesado ejerzan su efecto a través de un sistema antioxidante o bien mediante la disminución de citocinas independientemente, del estado oxidativo.

7.3.2. Citocinas proinflamatorias en suero

Un estado de hiperglicemia mantenido induce la formación de productos de glicosilación avanzada y estos conducen a un aumento del estado inflamatorio, produciendo una secreción crónica de citocinas proinflamatorias y sus niveles dependen del control glicémico (Eposito y col, 2002). El estado inflamatorio crónico en la diabetes propicia el desarrollo de especies reactivas de oxígeno contribuyendo en el desarrollo de las macro y microangiopatías (Pickup, 2004). Se han reportado niveles elevados de Interleucina-6 y TNF-a e $\text{IL-1}\beta$ en pacientes diabéticos, aun antes de desarrollar alguna complicación. Por lo tanto, su determinación predice el riesgo de que la enfermedad progrese a micro o macroangiopatías.

En el Cuadro 10, se muestran las concentraciones de las citocinas determinadas en suero. Se puede observar una disminución significativa de los niveles de TNF- α , la cual corresponde a un 32 y 43% para los grupos alimentados con LS al 25 y 3%, respectivamente. Para el grupo de LC al 3%, se observó una disminución de 18%, lo cual resultó significativo. Sin embargo, para los grupos restantes, se observa un incremento de la producción de esta citocina, principalmente para los alimentados a altas concentraciones. Esto se puede deber a un incremento en el estrés oxidativo. Se ha observado este comportamiento con modelos experimentales en animales, en donde aquellos alimentados con altas concentraciones de frijol, se incrementan la producción de esta citocina (Lomas, 2008).

Cuadro 10. Concentraciones séricas de citocinas proinflamatorias de ratas diabéticas alimentadas durante cuatro semanas con frijol procesado industrialmente

	TNF- α	IL - 1 β
Control	120 \pm 9	24 \pm 6
LC 3%	98 \pm 5*	17 \pm 1
LS 3%	68 \pm 8*	18 \pm 3
ISA 3%	107 \pm 15	22 \pm 4
LC 25%	151 \pm 25	15 \pm 2 *
LS 25%	82 \pm 11*	24 \pm 7
ISA 25%	350 \pm 21	24 \pm 3

Las concentraciones de citocinas se presentan en pg/ml.

Los valores se presentan como media \pm E.E.

* Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), analizados con la prueba de Dunnet.

Control = Grupo Control Diabético, LC = La Costeña, LS = La sierra, Isa = Isadora

Los resultados anteriores sugieren que el consumo de frijol a bajas concentraciones puede estar ejerciendo un efecto antiinflamatorio, ya sea por la disminución de la glucosa y/o por la disminución del estrés oxidativo. Esposito y col. (2002) observaron en pacientes diabéticos que la enzima glutatión S – tranferasa, previene el incremento de citocinas en plasma (IL-6 y TNF- α) inducidas durante la hiperglicemia. Dicha enzima puede ser inducida por compuestos fenólicos.

En cuanto a la IL-1 β , solo se observó una disminución significativa (29%) para el grupo de LC al 25%. Aunque los niveles de esta citocina no resultaron muy elevados, si es importante su disminución, ya que a pequeñas concentraciones (picogramos) pueden ejercer un efecto biológico en sus órganos diana (Abbas y Lichtman, 2002).

Estudios con diferentes alimentos que disminuyen las concentraciones de marcadores de inflamación (TNF- α e IL-1 β), han atribuido tal efecto al contenido de ácidos grasos, polifenoles y por lo tanto, a su capacidad antioxidante (Blok y col. 1996; Azadbakht y col. 2007; Santangelo y col., 2007., Lomas, 2008). Los resultados obtenidos sugieren que los compuestos presentes en el frijol LC y LS pueden ejercer un efecto en la disminución de los marcadores de inflamación, observándose mayor efecto en los grupos alimentados con concentraciones más bajas de frijol.

7.3.3. Cuantificación de NF- κ B, IKB α y PPAR γ en riñón

El desarrollo de la nefropatía puede predecirse por el incremento de citocinas proinflamatorias en sangre, las cuales se infiltran en los riñones para activar una serie de señalizaciones que mantienen el estado inflamatorio en la diabetes. Una de estas señalizaciones esta mediada por el factor de transcripción NF- κ B. Por lo tanto, su mayor expresión o actividad indica que puede presentarse un estado inflamatorio en los riñones.

Se mencionó anteriormente, que el consumo de frijol enlatado a bajas concentraciones, disminuyó principalmente las concentracion de TNF- α sérico. Este hecho puede tener un efecto protector sobre la inflamación propia del riñón.

El riñón es un órgano que se encarga de filtrar la sangre, lo que significa, que es muy fácil la infiltración de citocinas, principalmente TNF- α . Las citocinas se pueden infiltrar a los glomérulos y comenzar su acción inflamatoria al activar cinasas que fosforilan a IKB- α el cual libera a NF- κ B. Por lo tanto, el encontrar niveles elevados de la proteína inhibitoria IKB- α , refleja un mayor secuestro del factor de transcripción y por el contrario, encontrar niveles bajos de esta proteína indicaría que se ha degradado por acción de cinasas y ha liberado al factor de transcripción, lo que se traduce en una mayor inflamación. Por lo anterior, se determinó la cantidad relativa de IKB- α en los riñones de las ratas diabéticas tratadas. En la Figura 6 se muestra el gel y la concentración relativa de proteína determinada como área de pixeles de IKB- α sobre el área de pixeles de su control interno, β -actina.

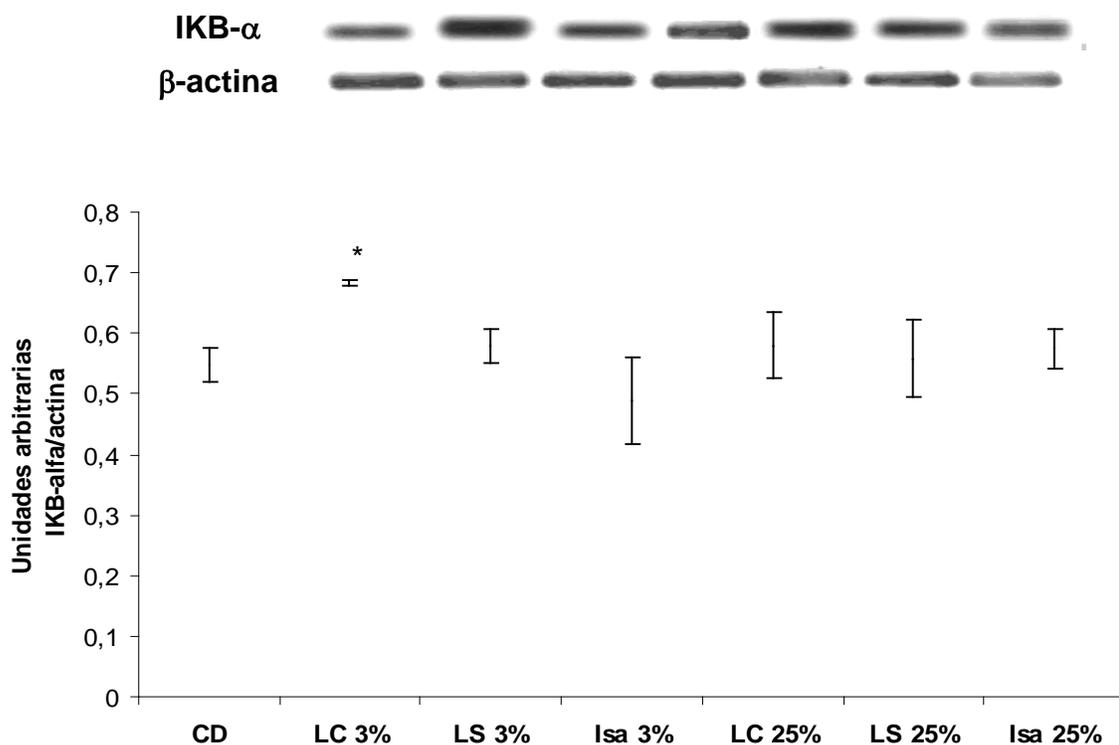


Figura 6. Cantidad relativa de IKB- α en el riñón de las ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con frijol procesado industrialmente.

Los valores se presentan como media de 3 experimentos independientes \pm E.E.

* Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), analizados con la prueba de Dunnet.

CD = Grupo Control Diabético, LC = La Costeña, LS = La sierra, Isa = Isadora

Se observa, que estadísticamente, existe una concentración relativa para el grupo de LC 3%, incrementando hasta un 30%. Por el contrario, no se observó un efecto significativo en los grupos restantes. Esto concuerda con una disminución de los niveles de TNF- α en suero, indicando que, por un lado existe una menor concentración de citocinas que active la señalización de NF- κ B y de esta manera un estado inflamatorio, así mismo, podría presentarse una mayor defensa antioxidante que evita el estímulo de NF- κ B. En este contexto es importante recordar que NF- κ B induce la producción de citocinas en el propio órgano en

donde actúe, en este caso en el riñón, de tal manera que la activación de este factor es crucial para mantener el estado inflamatorio. Por lo tanto, los resultados sugieren que el incremento de I κ B- α es un mecanismo por el cual se podría mantener secuestrado al factor de transcripción NF- κ B y de esta manera disminuir la inflamación. Otro mecanismo de regulación es la propia expresión de NF- κ B, debido a que se ha observado que en estados inflamatorios existe una mayor concentración de esta proteína (Ruiz-Ortega y col, 2002). Para determinar este efecto, se evaluó la concentración del factor de transcripción en el riñón. En la Figura 7 se observa la expresión de factor NF- κ B en el riñón de las ratas diabéticas en estudio.

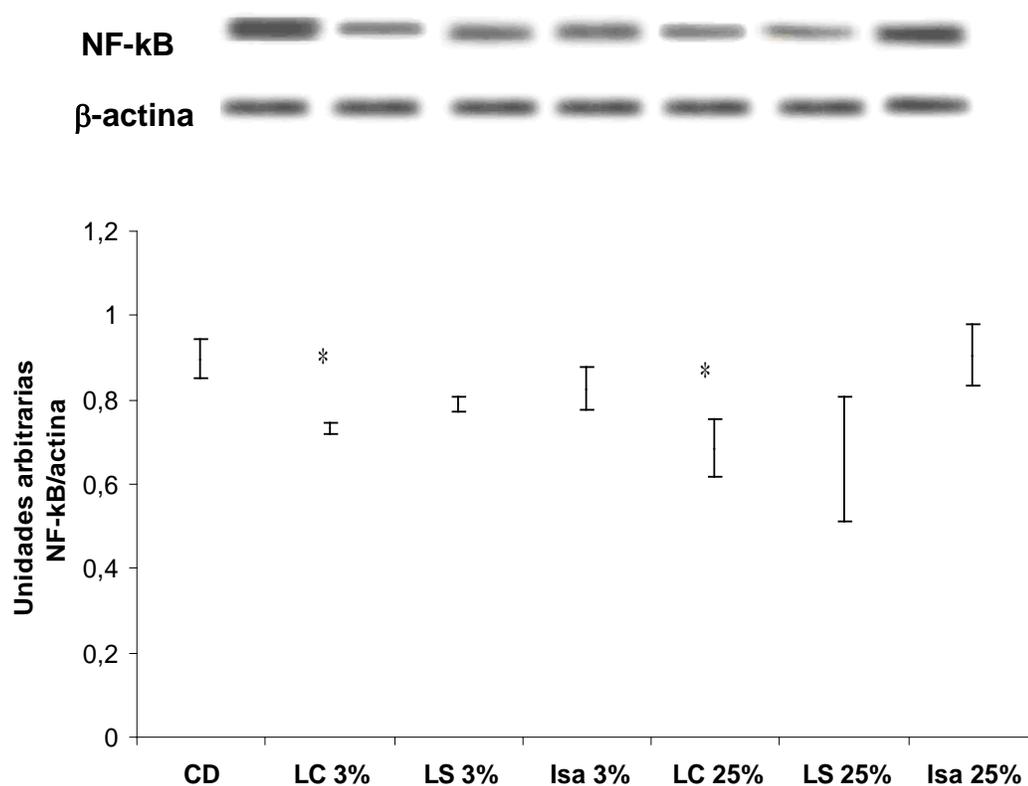


Figura 7. Cantidad relativa de NF- κ B total en el riñón de las ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con frijol procesado industrialmente.

Los valores se presentan como media de 3 experimentos independientes \pm E.E.

*Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), analizados con la prueba de Dunnet.

CD = Control Diabético, LC = La Costeña, LS = La sierra, Isa = Isadora

Se puede observar que nuevamente, el consumo de frijol LC a ambas concentraciones mostró una disminución significativa de la cantidad de NF- κ B total, aunado a lo observado para I κ B- α , en donde LC 3% incrementa la concentración de dicha proteína. Los resultados sugieren que LC, no solo podría disminuir la actividad de NF- κ B, si no que además disminuye su expresión.

Por otro lado, la inflamación a nivel renal podría disminuir la activación de PPAR γ , el cual inhibe la expresión de genes, antagonizando las actividades de los factores de transcripción como AP-1, STAT y NF- κ B, esto a su vez inhibe la expresión del TNF α , IL-6, IL-1 β (Zelechower y Elbert, 2009). Por lo tanto, para evaluar el efecto del consumo de frijol procesado sobre PPAR γ , se midió la expresión de esta proteína en el riñón de las ratas en experimentación y los resultados se muestran en la Figura 8.

Se puede observar que para los grupos LC y LS a ambas concentraciones, incrementa la cantidad de esta proteína. El mecanismo del efecto antiinflamatorio puede depender de interacciones con diferentes vías de señalización, ya que no existe ninguna relación entre el incremento de la concentración de PPAR γ y la disminución de la expresión de NF- κ B total, pero si de su actividad, ya que NF- κ B puede mantenerse secuestrada por acción de I κ B α sin que su expresión disminuya.

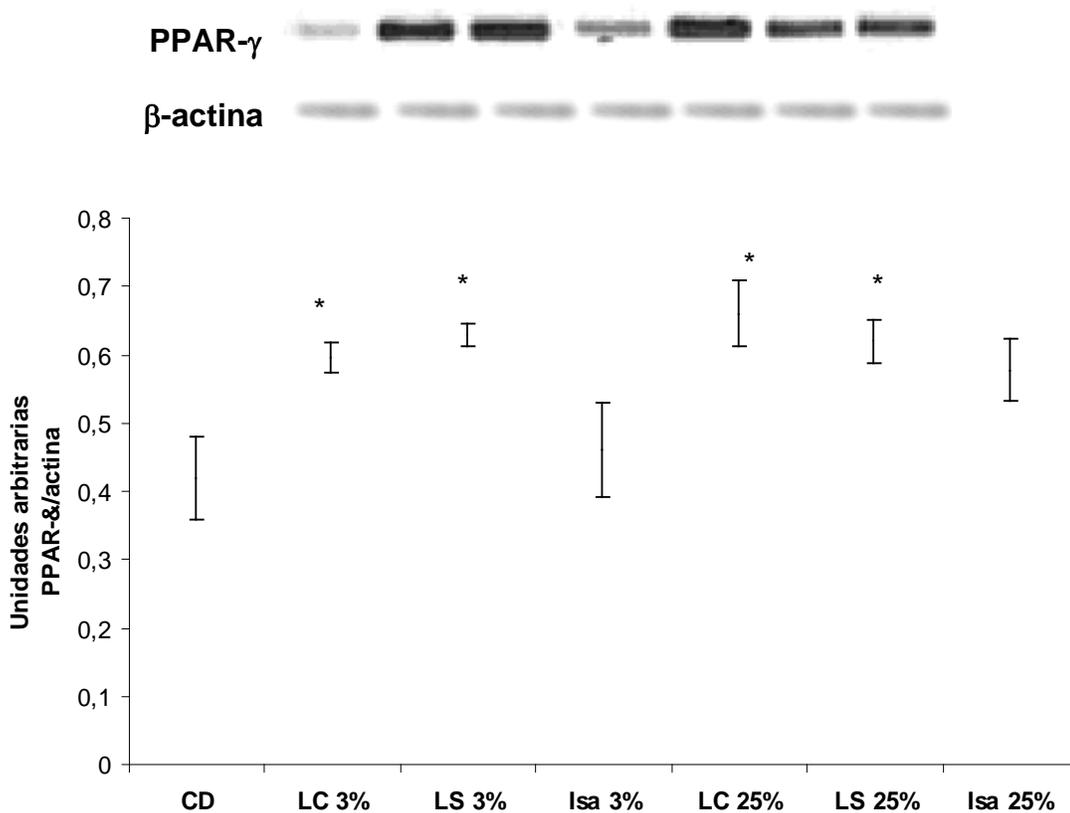


Figura 8. Cantidad relativa de PPAR γ total en el riñón de las ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con frijol procesado industrialmente.

Los valores se presentan como media de 3 experimentos independientes \pm E.E.

*Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), analizados con la prueba de Dunnet.

Control =Control Diabético, LC = La Costeña, LS = La sierra, Isa = Isadora

Considerando que los frijoles en estudio contienen cantidades de fenoles totales, comparables con otros alimentos estudiados, donde se ha reportado que los polifenoles pueden inhibir la proliferación mesangial y prolongar la sobrevivencia renal en modelos experimentales con glomeruloesclerosis (Yokozawa y col., 1986). Además, se ha reportado que alimentos ricos en polifenoles tienen actividad antiinflamatoria y antioxidante. Por ejemplo, la catequina puede inhibir la activación del factor de transcripción NF- κ B, que es un mediador importante de la respuesta inflamatoria, tal como, algunas enzimas

involucradas en las vías de transducción de señales (Aggarwal y col., 2004; Cho y col., 2003; Hang y col., 2005). Esto sugiere, que el frijol, por medio de mecanismos antioxidantes de los compuestos que lo conforman, puede ejercer un efecto antiinflamatorio al incrementar la concentración de IKB- α y PPAR- γ y disminuir las concentraciones séricas de TNF- α , lo cual fue observado para los grupos LC y LS a bajas concentraciones de frijol incorporado en su dieta.

7.4. Regulación de biomarcadores de diabetes por el consumo de frijol procesado industrialmente proveniente de un segundo lote

Se sabe, que los frijoles destinados para el enlatado provienen de diversas zonas del país. Si bien, dentro de la empresa productora se debe tener un control de calidad estricto, no hay un control sobre la zona de producción del frijol, ya que dependiendo de la época en que se requiera hacer la producción, será la zona de procedencia de los frijoles. Este aspecto es importante, puesto que el contenido de compuestos nutraceuticos en los alimentos está afectado por varios factores: clima, tipo de suelo, tipo de cultivo, exposición al sol, entre otros (D'Archivio y col., 2007). Por lo tanto, fue importante realizar un segundo experimento para determinar si los frijoles de diferentes lotes ejercen un efecto diferente al observado previamente. Para ello, se decidió trabajar con los frijoles enlatados La Costeña y La Sierra al 3%, de los cuales se observó un mayor efecto en el control de la diabetes.

7.4.1. Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

Se determinaron las concentraciones de los compuestos fenólicos totales, taninos condensados, antocianinas y capacidad antioxidante total y los resultados se pueden observar en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las harinas de frijol procesado proveniente de diferentes lotes.

	Fenoles Totales¹	Taninos Condensados²	Antocianinas³	Capacidad Antioxidante⁴
LC	4.29 ± 0.3 ^a	1.52 ± 0.3 ^a	123.1 ± 0.08 ^a	10.68 ± 1.2 ^a
LS	3.65 ± 0.2 ^a	1.29 ± 0.2 ^a	45.3 ± 0.2 ^b	9.28 ± 3.3 ^a

¹Expresados en mg eq. Ácido gálico/g de haria; ²Expresados en mg eq. (+)-catequina/g de harina; ³Expresados en mg eq. Cianidina 3-glucósido/kg de harina; ⁴Expresados en µM eq. Trolox/g de harina. Los valores representan la media ± DE. a y b indican diferencia estadística significativa entre variedades comerciales para cada parámetro evaluado (p<0.05), evaluado por la prueba de Tuckey.

Se puede observar que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de fenoles totales, taninos condensados y la capacidad antioxidante de las dos marcas en estudio. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el primer experimento. Mediante una prueba de Tuckey comparando las concentraciones obtenidas en ambos experimentos, no hay diferencia significativa (p<0.05) entre el contenido de fenoles, taninos y la capacidad antioxidante, sin embargo, en este último experimento hubo una reducción significativa en el contenido de antocianinas, respecto al primer experimento. De la misma manera, se observó que el contenido de antocianinas es menor significativamente para LS, comportamiento que concuerda con los resultados obtenidos en el primer experimento.

7.4.2. Parámetros bioquímicos de diabetes: glucosa, peso y perfil lipídico

Se evaluó el efecto del consumo del frijol a las concentraciones que mostraron mayor efecto en el primer experimento. Por lo tanto, se trabajó con 3 grupos: un grupo control diabético, un grupo LC y un grupo LS, ambos con una dieta suplementada con frijol al 3%.

El parámetro que indica la presencia de diabetes es la concentración de glucosa sérica (The Expert Committee, 2003). Aunado a este parámetro, en modelos experimentales en donde se simula el estado del paciente diabético, es importante la medición de peso corporal el cual es relativo al avance de la enfermedad. Además, los análisis clínicos inmediatos recomendados para el paciente diabético es la concentración de lípidos séricos para determinar si la enfermedad presenta riesgo cardiovascular, que es la primer causa de muerte en aquellas personas que padecen diabetes. En el Cuadro 12 se muestran las concentraciones iniciales y finales de glucosa y peso, así como, las concentraciones séricas de lípidos para los grupos en estudio.

En cuanto a los niveles de glucosa, se observa que los tres grupos partieron de las mismas concentraciones séricas de este carbohidrato. Estas concentraciones fueron similares a las del primer experimento, por lo tanto, los resultados pueden ser comparables entre ambos estudios. Sin embargo, al final de la experimentación, la cual solo duró tres semanas de tratamiento después de la inducción, no se observó diferencia estadística en las concentraciones de glucosa sérica.

Cuadro 12 Concentración de glucosa sérica, peso y perfil lipídico de las ratas alimentadas con frijol procesado de diferente lote.

	Glucosa sanguínea ¹		Peso corporal ²		Triglicéridos ³	Colesterol ³ total	HDL ³
	Inicial	Final	Inicial	Final			
CD	239 ± 9	351 ± 2	275 ± 2	240 ± 10	142 ± 18	54 ± 6	15.12 ± 0.7
LC 3%	239 ± 13	330 ± 18	278 ± 10	251 ± 12	104 ± 10*	44 ± 8	18.8 ± 0.3*
LS 3%	240 ± 11	376 ± 5	278 ± 7	257 ± 13	110 ± 7*	56 ± 4	17.4 ± 0.2

¹Expresados en mg/dL. ²Expresados en gramos. ³Concentraciones séricas de lípidos expresadas en mg/dL. Los valores se presentan como la media ± E.E.*Indica diferencia estadística significativa (p<0.05), analizados con la prueba de Dunnett.

Control = Control Diabético, LC = La Costeña, LS = La Sierra

El efecto hipoglucémico de un determinado alimento está dado principalmente por el contenido de fibra, almidón resistente, ácidos grasos y polifenoles. En base a los resultados obtenidos, se sugiere que posiblemente los compuestos fenólicos no son los responsables del efecto antidiabético, ya que los cambios en las concentraciones de fitoquímicos entre el primer y segundo estudio son mínimos, por lo tanto, algún(os) otro(s) componente(s) del frijol podría presentar actividad antidiabética, o por otro lado, el perfil de los compuestos fenólicos podría ser diferente.

Con respecto al peso corporal, se observó un ligero aumento en los animales alimentados con frijol, sin embargo, esto no fue estadísticamente significativo, lo que sugiere que el efecto hipoglucemiante no es reproducible entre los diferentes lotes de estudio. Para lo cual, es necesario tener un mayor control sobre la producción de frijol destinada para enlatarse.

En cuanto al perfil lipídico, se puede observar que no hay diferencia estadística significativa en las concentraciones séricas de colesterol. En cambio, las concentraciones séricas de triglicéridos y HDL fueron reguladas por estos frijoles. Se puede observar que los triglicéridos, disminuyeron en un 22 y 26% para LS y LC, respectivamente. Así mismo, las concentraciones de HDL, aumentaron 19 y 11% para LC y LS, respectivamente, sin embargo, sólo fue significativa para LC.

7.4.3. Parámetros bioquímicos de daño renal en orina

Se ha observado que algunos alimentos no son capaces de tener un control significativo sobre los niveles de glucosa sérica, sin embargo, tienen un efecto significativo en el control del daño renal y la inflamación. Por lo tanto, se determinaron los parámetros bioquímicos en orina para evaluar el efecto del consumo de frijol en el daño renal. Así pues, se determinaron las concentraciones de glucosa y creatinina en orina, para evaluar la capacidad de filtración del riñón. Se determinó también la microalbúmina y la proteína, los cuales son marcadores de daño renal. En el Cuadro 13, se muestran las concentraciones de estos parámetros bioquímicos determinados en orina.

La dieta con frijol no mostró ninguna regulación de los niveles de glucosa sanguínea. Sin embargo, las concentraciones de creatinina urinaria disminuyeron significativamente para el grupo LC hasta un 25%, comparado con el grupo CD, pero no se observó una disminución significativa para el grupo LS, a diferencia del primer experimento en el cual este frijol disminuyó este parámetro.

Cuadro 13. Parámetros bioquímicos de daño renal en las ratas alimentadas con frijol procesado.

	CD	LC 3%	LS 3%
Glucosa ¹	200.0 ± 38.18	262.5 ± 53.35	206.2 ± 42.60
Creatinina ²	13.5 ± 0.40	10.4 ± 0.66*	11.9 ± 1.23
Microalbúmina ³	1.3 ± 0.06	0.7 ± 0.20*	0.9 ± 0.30
Proteína ⁴	3.9 ± 0.20	2.9 ± 0.20 *	3.6 ± 0.40

¹Expresada como mg de glucosa en orina/12 h

²Expresada como mg de creatinina en orina/12 hr

³Expresada como mg de microalbúmina en orina/12 hr

⁴Concentración determinada por el método de Lowry y expresada en mg de albúmina/dL en orina
Los valores se presentan como la media ± E.E.

*Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), analizados con la prueba de Dunnet.

CD = Control Diabético, LC = La Costeña,

En cuanto a los niveles de microalbúmina, se puede observar que hubo una disminución significativa de albúmina para el grupo LC de hasta un 45%, de la misma manera para las concentraciones de proteína, estas disminuyeron hasta un 25% para el mismo grupo, mientras que LS, no presentó ningún efecto en estos parámetros. Esto refleja, que no necesariamente el control de la glucosa sérica tiene el mismo efecto en el control de las complicaciones en la diabetes. Si bien, en este último experimento no se observó diferencia significativa en los niveles de glucosa, se observa un control a nivel del daño renal, que puede estar efectuado por nutrientes que permanecen constantes durante el procesamiento y que no fueron determinados en el presente estudio, o bien, aditivos añadidos que dependen de la empresa productora.

7.4.4. Parámetros bioquímicos de inflamación

Se ha mencionado anteriormente que lo más importante es que la enfermedad en el paciente diabético no progrese a complicaciones micro o macrovasculares, ya que la patogenia de estas enfermedades está determinada por el grado de inflamación. Por lo tanto, es importante determinar si aun cuando no hay regulación de los niveles de glucosa, se puede observar una regulación en el grado de inflamación. Para ello se determinaron las concentraciones de TNF- α en suero y en el riñón se cuantificó la expresión de las moléculas de adhesión vascular (VCAM-1, ICAM-1), así como, TNF- α .

7.4.4.1. Cuantificación de TNF- α en suero

La citocina TNF- α , es un marcador importante en la inflamación, ya que tiene una acción pleiotrópica y su presencia en la sangre pone en riesgo al paciente diabético de progresar a diversas complicaciones (Aguillón y col., 2002). En individuos sanos, los niveles circulantes de esta citocina no son detectables. En la Figura 9, se pueden observar los niveles de TNF α en suero de los animales en estudio. Se puede observar un efecto importante en la disminución significativa de esta citocina hasta en un 76% para LC y un 58% para LS. Este efecto fue mayor durante el último estudio, en comparación con el primero en donde se observó una disminución de 18 y 43% para LC y LS, respectivamente. Estos resultados sugieren que si bien, la glucosa no disminuyó significativamente, el consumo de frijol procesado puede disminuir el estado inflamatorio dados por la concentración de TNF- α .

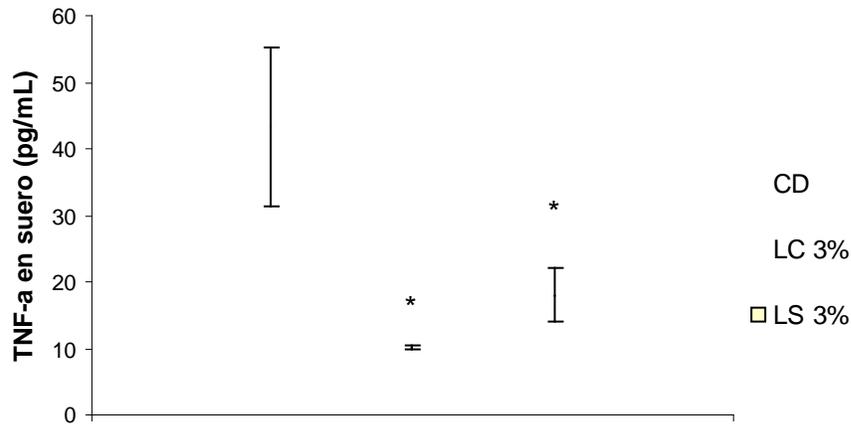


Figura 9. Concentraciones de $\text{TNF}\alpha$ en el suero de las ratas diabéticas alimentadas con frijol procesado.

Los valores se presentan como media de 3 experimentos independientes \pm E.E.

* Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), analizados con la prueba de Dunnet.

CD = Grupo Control Diabético, LC = La Costeña, LS = La Sierra

7.4.4.2. Expresión de VCAM-1, ICAM-1 y $\text{TNF}\alpha$ en riñón

Se ha demostrado, que en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, se promueve la migración de macrófagos a células dañadas por el fármaco. Las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1, atraen a los macrófagos en los glomérulos renales, para la producción continua de citocinas proinflamatorias dentro del riñón (Brady, 1994). La producción de las moléculas de adhesión son reguladas por NF-kB (Guijarro y Egido, 2001). Por lo tanto, la determinación de la expresión de adhesinas y $\text{TNF}\alpha$ en el riñón, pueden ser utilizados como marcadores de inflamación.

En la Figura 10, se muestran las unidades arbitrarias de VCAM-1, ICAM-1 y $\text{TNF}\alpha$, representadas como la relación del área de pixeles de cada mRNA, con el área de pixeles del control interno de carga, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.

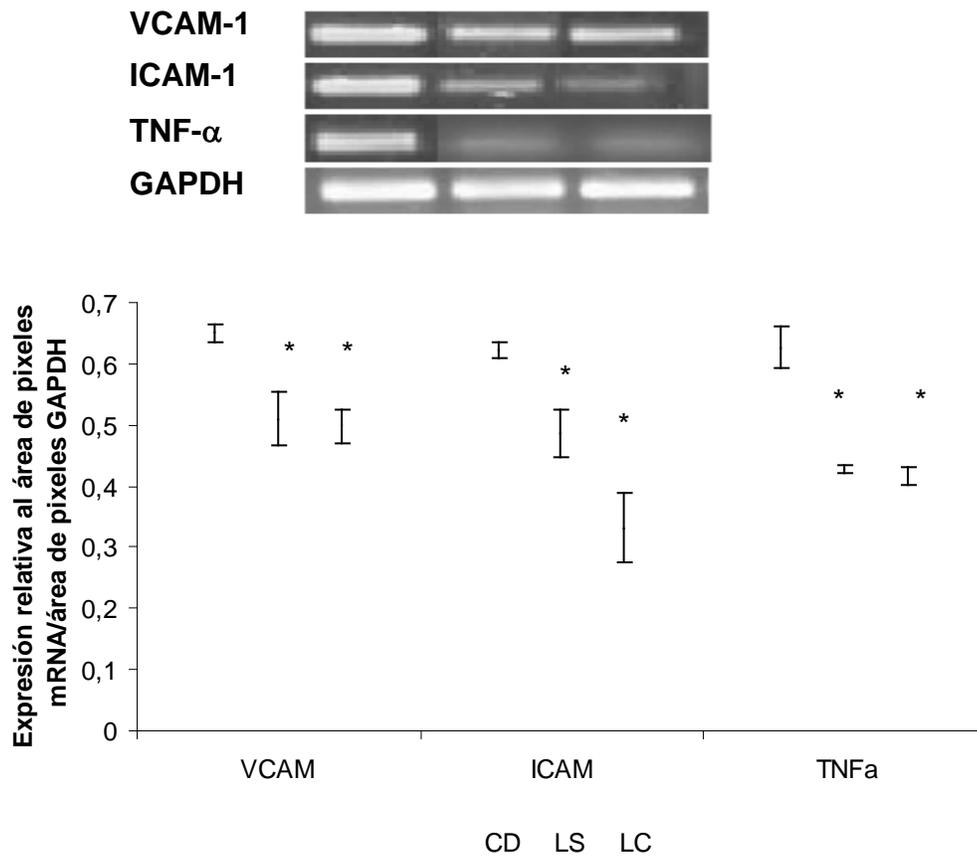


Figura 10. Expresión de VACM-1, ICAM-1 y TNF- α en el riñón de las ratas diabéticas alimentadas con dietas suplementadas con frijol procesado industrialmente.

Los valores se presentan como media de 3 experimentos independientes \pm E.E.

* Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), analizados con la prueba de Dunnet.

CD = Grupo Control Diabético, LC = La Costeña, LS = La sierra, Isa = Isadora

En diversos estudios, se ha observado la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en el riñón de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (Sassy-Pringet y col., 2000). En el presente estudio, el consumo de frijol mostró una disminución significativa de la expresión de los mRNA de las moléculas de adhesión. LS disminuyó la expresión de ambos transcritos (VCAM-1, ICAM-1) hasta un 23%. En cambio, el consumo de LC disminuyó para ICAM, hasta un 46%. En cuanto a la citocina TNF- α , el consumo de ambos frijoles disminuyó la expresión hasta un 34%, comparado con el grupo control.

La producción de citocinas proinflamatorias pone en riesgo al paciente diabético a progresar a diferentes complicaciones. Una alta concentración de TNF- α en suero promueven la producción de moléculas de adhesión (Pober y Cotrán, 1985). En este estudio se observó una disminución de la expresión de adhesinas al igual que una disminución de la concentración de TNF- α al consumir frijol procesado a bajas concentraciones. Es posible, que una menor concentración de TNF- α en suero disminuya la señalización por medio de NF- κ B, para la producción de VCAM-1, ICAM-1 y TNF- α en el riñón. Si bien, no se observó un control sobre los niveles de glucosa sérica, si se disminuyó la alteración renal mediada por TNF- α .

Se ha observado que el consumo de fitoquímicos de diversos alimentos puede ejercer una regulación de citocinas proinflamatorias, NF- κ B y moléculas de adhesión (Manzoor y Agrewala, 2008). Además, la acción antiinflamatoria se ha atribuido a compuestos como ácido fólico y ácidos grasos de cadena corta (Rodríguez y col.,2003). Esto sugiere, que compuestos bioactivos del frijol procesado, pueden disminuir los niveles de marcadores de inflamación y daño renal, independientemente del efecto hipoglucémico.

VIII. CONCLUSIONES

El frijol bayo refrito LC mostró mayor cantidad de antocianinas y capacidad antioxidante (ABTS), respecto a La Sierra e Isadora.

Los frijoles bayos refritos LC y LS mostraron el mayor efecto antidiabético al disminuir los niveles de glucosa y lípidos en sangre comparados con el control diabético, pero tal efecto no es dosis-dependiente.

El efecto antidiabético parece estar relacionado al proceso de industrialización y a la mezcla de aditivos empleados, ya que los frijoles enlatados mostraron mayor efecto que aquellos empacados al vacío.

El efecto hipoglucémico no se reproduce entre los lotes, pero si se mantiene la protección al daño renal.

El frijol LC disminuye TNF- α en suero y esto podría estar asociado a una disminución y menor actividad de IKB- α en riñón.

LS y LC producen efectos de protección ante el daño renal. Sin embargo, solo LC (3%) ejerce su actividad a través de la regulación de la inflamación.

El frijol LC mantiene un efecto anti-inflamatorio y de prevención contra el daño renal, independientemente del lote.

El consumo de frijol LC y LS enlatado posiblemente puede ser utilizado en la dieta como coadyudante en la diabetes, ayudando a disminuir la inflamación y por lo tanto, el riesgo de progresar a otras complicaciones como riesgo cardiovascular y nefropatía.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas K. A. y Lichtman A. H. 2003. Inmunología celular y molecular. Citocinas. 5ª Edición. Editorial. Elsevier España, S.A. pp. 355.
- Abdel-Aal M.S. and Hucl, A. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple paricarp wheats. *Cereal Chem.* 76:350-354.
- Aggarwal B., Bhardwaj A., Aggarwal R. S., Seeram N. P., Shishodia S. and Takada Y. 2004. Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Res.* 24: 0250-7005.
- Aguilar-Salinas C., Velázquez O., Gómez-Pérez F., González A., Lara A., Molina V., Rull-Rodrigo J. and Tapia R. 2003. Characteristics of Patients With Type 2 Diabetes in México. Results from a large population-based nationwide survey. *Diabetes Care.* 26:2021–2026.
- Aguillón J. C., Cruzat A. C., Cuenca J. M., Cuchacovich M. T. 2002. El polimorfismo genético del factor de necrosis tumoral alfa como factor de riesgo en patología. *Rev Méd Chile.* 130: 1043-1050.
- Aguzzi A. and Heikenwalder M. 2005. Prions, cytokines, and chemokines: a meeting in lymphoid organs. *Immunity.* 22: 145-54.
- Alfaro J., Simal A. y Botella F. 2000. Tratamiento de la diabetes mellitus. *Inf Ter Sist Nac Salud.* 24: 33-43.
- Almanza-Aguilera E., Guzmán-Tovar A., Acosta-Gallegos J. y Guzmán-Maldonado S. H. 2009. Contenido de fitoquímicos en grano de frijol negro cocido y refrito. *Memorias 2º Congreso Internacional y feria nacional del frijol.*
- Álvarez C. A. y Orallo C. F. 2002. Actividad de los flavonoides (II). Acción cardiovascular y sanguínea. *Bioquímica.* 22: 102 – 110.
- Alves, MC; Carvalheira, LB; Modulo CM and Rocha, EM. 2008. Tear film and ocular surface changes in diabetes mellitus. *Arq. Bras. Oftalmol.* Vol.71, n.6: 96-103.

- Ambriz T. 2007. "Evaluación del efecto del Frijol (*Phaseolus vulgaris*) y del chilacayote (*Cucúrbita ficifolia*) sobre los niveles de la proteína TGF- β_1 relacionada con la alteración renal en ratas diabéticas". Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Amigó-Correig P., Bulló M., Márquez-Sandoval F., Vizmanos-Lamotte B., Alegret C. y Salas-Salvadó, J. 2008. Importancia de la dieta en la inflamación. *Antropología*. 16:23-28.
- Arora S. and Anubhuti. 2006. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity. *Neuropeptides*. 30: 375-401.
- Arts M., Haenen G., Voss H. P. and Bast, A. 2003. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chem Tox.* 42:45-49.
- Atkinson M. and MacLaren N. K. 2001. Mechanism of disease: the pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus. *New Engl J Med*. 24:1014-8.
- Azadbakht L., Kimiagar M., Mehrabi Y., Esmailzadeh A., Hu F. and Willett W. 2007. Soy consumption, markers of inflammation, and endothelial function. A cross-over study in postmenopausal women with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 30:967–973.
- Bach J. F. 1994. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endoc Rev*.15:516-42.
- Baynes J. W. 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 40:405-412.
- Bello, A. 2006. Uso del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) como planta medicinal. *Medicina tradicional de México y sus plantas medicinales*. Tlahui-Medic. No. 21.
- Björck I. M., Granfeldt Y., Liljerberg H., Tovar, J. and Asp N. G. 1994. Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates. *Am J Clin. Nutr.* 59: 699S-705S.

- Blok W., Katan M. and Vandermeer J. M. 1996. Modulation of Inflammation and Cytokine Production by Dietary (n-3) Fatty Acids. *J. Nutr.* 126: 1515-1533.
- Brady H.R. 1994. Leukocyte adhesion molecules and kidney. *Kidney Int.* 45:1285-1300.
- Bravo L., Siddhuraju P. 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.
- Braunwald E., Fauci A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L. y Jameson, J. L. 1998. *Principios de medicina interna Harrison*. 15a edición. Editorial Mc. Graw Hill. p. p. 2467-2487.
- Calvo C. 2007. Lípidos y Riesgo Cardiovascular *Medwave*. Año VII No. 1.
- C.A.N. Centro de Agronegocios del Noroeste. s.a. Estudio de las necesidades estratégicas de investigación, validación y transferencia de tecnología en el estado de Sinaloa.
- Caramori M. L., Fioretto P. and Mauer M. 2000. The need for early predictors of diabetic nephropathy risk: is albumin excretion rate sufficient? *Diabetes* 49:1399–1408.
- Cardador-Martínez A., Castaño-Tostado E. and Loarca-Piña, G. 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in common beans against aflatoxin B₁. *Food Add Cont.* 19: 62-69.
- Carrillo J. y Bear R. 2004. Biomarcadores, inflamación, estrés oxidativo, lípidos y aterotrombosis. *Aterosclerosis: Un proceso inflamatorio. Arc Card Méx.* 74, Supl. 2: S379-S384.
- Cases A., Bragulat E., Serradell M., Vera M., De la Sierra A. and Escolar G. 2003. Disfunción endotelial en la insuficiencia renal crónica. *Nefrología.* 23 Suplemento 4:42-51.
- Celleno L., Tolaini M. V., D'Amore A., Perricone N. V. Preuss H. G. 2007. A Dietary supplement containing standardized *Phaseolus vulgaris* extract

- influences body composition of overweight men and women. *Int J Med Sci.* 24:45-52.
- Cerović A., Miletić I., Konić-Ristić A., Baralić I., Djordjević B., Djurčić I. and Radusinović M. 2006. The dry plant extract of common bean seed (*Phaseoli vulgaris pericarpium*) does not have an affect on postprandial glycemia in healthy human subject. *Bosn J Basic Med Sci.* 6:28-33.
- Chaovanalikit A. and Wrolstad R.E. 2004. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *J Food Sci.* 69:FCT67–FCT72.
- Choi M. S., Jung U. J., Yeo J., Kim M. J. and Lee M. K. 2008. Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Res Rev.* 24:74-81.
- Cho S., Park S., Kwon M., Jeong T., Bok S. and Choi W. 2003. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-Kappa B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol Cell Biochem.* 243: 153-60.
- Cowie C. C. and Harris M. I. 1995. Physical and metabolic characteristics of persons with diabetes. In *Diabetes in America*. 2nd ed. Harris MI, Ed. Bethesda, MD, Nat Inst Health. 950-1468.
- Crespy V. and Williamson G. 2004. A review of the health effects of green tea catechins in *in vivo* animal models. *The Journal of nutrition* 2004;134 (12 Suppl):3431S-3440S.
- Desphande, S. S., Cheyran, M. 1987. Determination of phenolic compounds of dry beans using vainillin, redox and precipitation assays. *J Food Sci.* 52:332-334.
- Díaz-Flores M., Baiza-Gutman L. A., Ibáñez-Hernández M. A., Pascoe-Lira D., Guzmán-Greenfel A. M. y Kumate-Rodríguez J. 2004. Aspectos

moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac Méd Méx.* 140:437-448.

Esposito K., Nappo F., Marfella R, Giugliano G., Giugliano F., Ciotola M., Quagliari L, Ceriello A., and Giugliano D. 2002. Inflammatory Cytokine Concentrations Are Acutely Increased by Hyperglycemia in Humans: Role of Oxidative Stress. *Circulation.* 106:2067-2072.

Farid, M. y Ghani, A. G. 2004 "A new computational technique for the estimation of sterilization time in canned food". *Chemical engineering and processing.* Vol. 43. pp. 523-531.

F.M.D. Federación Mexicana de Diabetes, 2009. Disponible en: www.fdm.org

Forsblom C. M. y Groop P. H. Ekstrand A, Totterman KJ, Sane T, Saloranta C, and Groop L. 1998. Predictors of progression from normoalbuminuria to microalbuminuria in NIDDM. *Diabetes Care.* 21:1932– 1938.

Foster-Powel K., Holt S. and Brand-Miller, J. 2002. International table of glycemic index and glycemic load values. *Am. J. Clin. Nutr.* 76:5-56.

García G.V. 2006. "Efecto hipoglucemiante de diferentes variedades de harinas de frijol cocido (*Phaseolus vulgaris*) y su posible mecanismo de acción en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina". Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. México.

Garibay B. C. y San Martín E. 2006. Estudio del efecto hipoglucémico de algunas plantas utilizadas en México para el control de la diabetes. *Salud Pub.* 11.

Ghosh S., May M. J. and Kopp E. B. 1988. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:225 – 260.

Giugliano D., Ceriello, A. and Paolisso, G. 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care.* 19:257-267.

Golovchenko I., Goalstone M. L., Watson P., Brownlee M. and Draznin B. 2000. Hyperinsulinemia enhances transcriptional activity of nuclear factor- κ B

□induced by angiotensin II, hyperglycemia, and advanced glycosylation end products in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 87: 746-752.

Gómez-Fernández P., Ruiz A., Conde M., Campos R., Vargas J. C. y Almaraz M. 2004. Marcadores de inflamación vascular en la diabetes mellitus tipo 2 con hipertensión arterial y albuminuria. *Nefrología.* 24:2-29.

González-Maqueda I. 2007. La enfermedad coronaria del diabético. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento. *Rev Esp Cardiol Supl.* 7:29H-41H.

Grønbæk H., Vogel I., Østerby R., Lancranjan I., Flyvbjerg A. and Ørskov H. 1998. Effect of octreotide, captopril or insulin on renal changes and UAE in long-term experimental diabetes. *Kidney Int.* 53:173–180.

Gross J.L., Azevedo M., Silverio S., Canani L. H. Caramori M. L. and Zelmanovitz T. 2005. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care.* 28:176–188.

Grundy S. M., Benjamin I. J. and Burke G. L. 1999. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for health-care professionals from the American Heart Association. *Circulation.* 100:1134-1146.

Grunfeld C. and Feingols K. R. 1991. The metabolic effects of tumor necrosis factor and other cytokines. *Biotherapy.* 3:143 –158.

Guan Y. y Breyer M. D. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney Int.* 60:14-30.

Guijarro C. y Egido J. 2001. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int.* 59: 415–424.

Guijarro C., Kim Y., Kasiske B.L. 1997. Central role of the transcription factor nuclear factor-kappa B in mesangial cell production of chemokines. *Contrib Nephrol.* 120: 210-218.

Gutzwiller J. P., Goeke B., Drewe J., Hildebrand P., Ketterer S., Handschin D., Winterhalder R., Conen D. and Beglinger C. 1999. Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. *Gut.* 44: 81–86.

- Hang C. H., Shi J. X., Li J. S., Wu W. and Yin H. X. 2005. Concomitant upregulation of nuclear factor-kB activity, proinflammatory cytokines and ICAM-1 in the injured brain after cortical contusion trauma in a rat model. *Neurology India*. 53: 312-317.
- Hernández S., León C., González F., Fuentes JL., González C. y García G. 2004. Citocinas proinflamatorias en la infección de tejidos blandos de pacientes diabéticos. *Rev Méd IMSS*. 42: 227-233.
- Hong YJ, Barrett DM and Mitchell AE. 2004. Liquid chromatography/mass spectrometry investigation of the impact of thermal processing and storage on peach procyanidins. *J Agric Food Chem* 52:2366–2371.
- Iniestra-González J. J., Ibarra-Pérez F. J., Gallegos-infante J. A., Rocha-Guzmán, N. E. y González-Laredo R. F. 2005. Factores antinutricios y actividad antioxidante en variedades mejoradas del frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia*. 39:603-610.
- IOM. 2005. Institute of Medicine (U.S.). Panel on Dietary Reference Intakes for Electrolytes and Water. Washington, D.C. National Academies Press.
- Jacinto C. and Campos A. 1993. Efecto de la cocción sobre algunas características nutricionales del frijol. *Agron Mesoam*. 4: 42-47.
- Jenkins D. J., Thorne M. J., Camelon K., Jenkins A., Rao L., Taylor R. H., Thompson L. U., Kalmusky J., Reichert R. and Francis T. 1982. Effect of processing in digestibility and the blood glucose response: study of lentils. *Am J Clin Nutr*. 36: 1093-1101.
- Klimes I., Haffner S. M., Seböková E., Howard B. V. and Storlien L. H. 1997. Lipids and syndromes of insulin resistance. Regulation of lipolysis. Ed. Staff. New York, NY. 204-205.
- Kris-Etherton P. M., Lefevre M., Beecher G. R., Gross M. D., Keen C. L., Etherton T. D. 2004. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: The antioxidant and anti-

- inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Ann Rev Nutr.* 24:511-538.
- Kwok B. H. B., Koh B., Ndubuisi M. I., Elofsson M. and Crews C. M. 2001. The antiinflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits I κ B kinase. *Chem Biol.* 8: 759–766.
- Lomas C. 2008. Efecto del consumo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) cocido sobre citocinas Proinflamatorias relacionadas con daño renal en ratas diabéticas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Luechapattanaporn, K., Wang, Y., Wang, J., Al-Holy, M., Kang, D. H., Tang, J. and Hallberg L. M. 2004. Microbial Safety in Radio-frequency Processing of Packaged Foods. *Journal Of Food Science*—Vol. 69, Nr. 7.
- Mahmud N., O'Connell M., Stinson J., Goggins M., Weir D. and Kelleher D. 1995. Tumor necrosis factor-alpha and microalbuminuria in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 7: 215-219.
- Manzoor A. and Agrewala J. 2008. Polyphenols and Health: Dietary polyphenols on modulation of immune system. Ed. Naville-Vasallo. Pp. 245-272.
- María-Llamas J. 2009. Enlatado de Alimentos. ANTAD. Asociación Nacional de tiendas de autoservicio y departamentales.
- Martínez S. P. 2008. Análisis Molecular de la Capacidad Antioxidante del fruto de Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) en ratas diabéticas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Mathews C. K. y Van Holde K. E. 2002. Bioquímica, “Metabolismo de los hidratos de carbono II: Biosíntesis”. 2ª edición. Edit, McGraw-Hill. Interamericana. 16:615-617, 626.
- May M. J. and Ghosh S. 1997. Rel/NF κ B and I κ B proteins: An overview. *Semin. Cancer Biol.* 8: 63–73.

- Mogensen CE, Christensen CY, Vitthighus E. 1993. The stages in diabetic renal disease with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*; 32 (suppl. 2): 64-78.
- Navarro J. 2003. Nefropatía diabética: ¿una cuestión de inflamación? Hipótesis del daño renal inflamatorio en la diabetes mellitus tipo 2. *Nefrología*. 23:381-389.
- Oberley, L. W. 1988. Free radicals and diabetes. *Biol Medic*. 5:113-124.
- Oliveira, A. de, Patto, c. y Duarte, A. Efeitos da época de colheta e do tempo de armazenamento no escurecimento do tegumento do Feijoo (*Phaseolus vulgaris*, L.) *Cien. Agrotec.*, Lavras, 2002. Vol, 26, no. 3, p 545-549.
- Osorio-Díaz P., Méndez-Montealvo G., Agama-Acevedo E., Islas-Hernández J., Sánchez-Muñoz J. and Bello-Pérez L. A. 2003. Starch bioavailability in two commercial bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) and in industrialized beans. *Agrociencia*. 37: 565-573.
- Palma G. J. 2007. La diabetes mellitus entendida como una enfermedad cardiovascular de origen metabólico. *Diabetol Cardiol*. 7:12H-19H.
- Pari L. y Venkateswara S. 2003. Effect of an aqueous extracto of *Phaseolus vulgaris* on plasma insulin and hepatic key enzymes of glucosa metabolism in experimental diabetes. *Pharmazie*. 58:916-925.
- Peterson J. and Dwyer J. 1998. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr Res*.18:1995-2018.
- Pickup J. 2004. Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 27:813–823.
- Pirola L., Johnston A. M. and Van Obberghen E. 2004. Modulation of insulin action. *Diabetologia*. 47:170-84.
- Pober J. S. y Cotran R. S. 1985. Effects of cytokines on vascular endothelium: their role in vascular and immune injury. *Kidney Int*. 35: 969-975.

- Rekeneire N., Peila R., Ding J., Colbert L., Visser M., Shorr R., Kritchvsky S., Kuller L., Strotmeyer E., Schwartz A., Vellas B. y Harris T. 2006. Diabetes, Hyperglycemia, and Inflammation in Older Individuals. The Health, Aging and Body Composition study. *Diabetes Care*. 29:1902–1908.
- Rickman JC, Barrett DM and Bruhn CM. 2007. Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. *J Sci Food Agric* 87:930–944.
- Rijks L. G. 1995. Friedewald formula. *Clin Chem*. 41: 761.
- Rocha-Guzmán N. E., González-Laredo R. F., Ibarra-Pérez F. J., Nava-Berúmen C. A. and Gallegos-Infante J. A. 2007. “Effect of pressure cooking on the antioxidant activity of extracts from three common beans (*Phaseolus Vulgaris* L.) cultivars”. *Food Chemistry*. 100. 31 -35.
- Rodgers C., Burch P., VanHeest J., Suzuki K., Bussiere C. and Schemmel R. 2007. A tepary bean diet and exercise delays indices of type 2 diabetes in female fa/fa rats. *Int J Diabetes Metab*. 15: 38-45.
- Rodiño, E. 2000. Estudio componentes químicos de las judías. *Food Biochem*. 18:297-309.
- Rodríguez J., López J. M., Rodríguez J. y Jiménez A. 2003. Características epidemiológicas de pacientes con diabetes en el estado de México. *Rev Méd IMSS*. 41: 383-392.
- Rodríguez L. G., García Salazar J.A., Rebollar S. y Cruz A. C. 2008. Preferencias del consumidor de Frijol en México. *Memorias: 1er Congreso Internacional y feria del Frijol 2008*.
- Romagnoli M. 2007. Mecanismo de producción de radicales libres en la diabetes: importancia de la xantina oxidasa e implicación del factor nuclear κ B. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. España.
- Ruiz-Ortega M., Rupérez M., Lorenzo O., Esteban V., Blanco J., Mezzano S and Egido J. 2002. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int*. 82 (Supl. 2): 12-22.

- Ruotsalainen E., Salmenniemi U., Vauhkonen I., Pihlajam J., Punnonen K., Kainulainen S. and Laakso M. 2006. Changes in Inflammatory Cytokines Are Related to Impaired Glucose Tolerance in Offspring of Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes Care*. 29:2714–2720.
- Salway J. G. 2004. *Metabolism at a glance*. 3rd edition. Editorial Malden Mass, Blackwell Pub.
- Sánchez-Recalde A. y Kaski C. J. 2001. Diabetes mellitus, inflamación y aterosclerosis coronaria: perspectiva actual y futura. *Rev Esp Cardiol*. 54: 751-763.
- Santangelo C., Vari R., Scazzocchio B., Di Benedetto R., Filesi C. and Masella R. 2007. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanità*. Vol. 43, No. 4: 394-405.
- Sassy-Prigent C., Heudes D, Mandet C, Bélair, Odile M, Perdereau B, Bariéty J., and Bruneval P. 2000. Early Glomerular Macrophage Recruitment in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Diabetes*. 49:466–475.
- Serrano, J. y Goñi, I. 2004. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. *ALAN*. 54:1.
- Schmidt A.M., Yan S. D., Wautier J. L. y Stern D. 1999. Activation of Receptor for Advanced Glycation End Products A Mechanism for Chronic Vascular Dysfunction in Diabetic Vasculopathy and Atherosclerosis. *Circulation Research*. 84:489-497.
- Schrier R. W. 2007. *Diseases of the kidney and urinary tract*. Volume 1. Eight edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. U.S.A.
- Schwartz M. W., Sipols A. J., Marks J. L., Sanacora G., White J. D., Scheurinck A., Kahn S. E. Baskin D. G., Woods S. C., Figlewicz D. P. and Porte D. Jr. 1992. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology*. 130:3608-3616.

- Singleton V.L., Orthofer R., and Lamuela- Reventos R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol.* 299: 152-178.
- Stamler J., Vaccaro O., Neaton J. D., Wentworth D. 1993. Diabetes, other risk factors, and 12 year cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care.* 16: 434–44.
- Stentz F., Umpierrez E., Cuervo R. y Kitabchi A. 2004. Proinflammatory Cytokines, Markers of Cardiovascular Risks, Oxidative Stress, and Lipid Peroxidation in Patients With Hyperglycemic Crises. *Diabetes.* 53:2079–2086.
- Stienstra R., Duval C., Muller M. and Kersten S. 2007. PPARs, Obesity and inflammation. *PPAR Res.* 23:5974-5978.
- Suzuki K., Babazono T., Murata H. y Iwamoto Y. 2005. Clinical significance of urinary liver-type fatty acid-binding protein in patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 28:2038–2039.
- Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50: 536-546.
- The Expert Committee. 2003. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 26:S5-S20.
- Tovar J. and Melito C. 1996. Steam-cooking and dry heating produce resistant starch in legumes. *J Agric Food Chem.* 44: 2642-2645.
- Tovar J., Fernández M. y Blanco A. 2005. Digestibilidad *in vitro* del almidón en preparaciones cocidas y molidas de frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) *Interciencia* Vol. 30. No. 12: 780-783.
- Trejo-Gonzalez A., Gabriel-Ortiz G., Puebla-Perez A. M., Guisar-Contreras M. D., Murguía-Mazariegos M. R., Mejía-Arreguín S. and Calva E. 1996. A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fulginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats. *Ethnopharmacology.* 55:27-33.

- Tsuda H., Ohshima Y., Nomoto H., Fujita K., Matsuda E., Iigo M., Takasuka N and Moore M. A. 2004. Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metab. Pharmacokin.* 19: 245-263.
- Utsunomiya H., Yamakawa T., Kamei J. Kadonosono K. and Tanaka S. I. 2005. Anti-hyperglycemic effects of plum in a rat model of obesity and type 2 diabetes, wistar fatty rat. *Biomed Res.* 26 :193-200.
- Velasco Z. I., Rascon A. and Tovar J. 1997. Enzymic availability of starch in cooked black beans (*Phaseolus vulgaris L*) and cowpeas (*Vigna spp.*). *J Agric Food Chem.* 45: 1548-1551.
- Venkateswaran M. S. y Pari L. 2002. Antioxidant effect of *Phaseolus vulgaris* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asia Pacific J Clin Nutr.* 11: 206–209.
- Wautier M. P., Chappey O., Corde S., Stern D. M., Schmidt A. M. and Wautier J. L. 2001. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol.* 280: E685-694.
- Witztum J. L., Mahoney E. M., Branks M. J., Fisher M., Elam R. and Steinberg D. 1982. Nonenzymatic glycosylation of low-density lipoprotein alters its biologic activity. *Diabetes.* 31:283-291.
- Wolff S. P. 1993. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull.* 49:642-652.
- Xu, B.J. and Chang, S.K.C. 2008. Total phenolic content and antioxidant properties of eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris L.*) as affected by processing methods. *Journal of Food Science*, Volume 73, Number 2, pp. H19-H27.
- Yokosawa T., Zheng P. D., Oura H. and Koizumi F. 1986. Animal model of preservative, a precaution that also applies to known adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron.* 44: 230.
- Zelechower H. and Elbert A. E. 2009. PPARs - Receptores activados por proliferadores peroxisomales. *Nefrología, diálisis y trasplante volumen 29 - nº 2.*

Zang M., Xu S., Maitland-Toolan K., Zuccollo A., Hou X., Jiang B., Wierzbicki M., Verbeuren T. and Cohen R. 2006. Polyphenols stimulate AMP-Activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes* 55:2180–2191.