

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO**

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**EFFECTO QUIMIOPROTECTOR *in vitro* E *in vivo* DE DIFERENTES
VARIETADES DE HARINAS Y EXTRACTOS DE FRIJOL COCIDO
(*Phaseolus vulgaris*)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

MARÍA LAURA GONZÁLEZ DÁVALOS

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre de 2005
México

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq. H70536

No. Título _____

Clas. TS

616.99447

G643e



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

EFFECTO QUIMIOPROTECTOR *in vitro* E *in vivo* DE DIFERENTES VARIEDADES DE HARINAS Y EXTRACTOS DE FRÍJOL COCIDO (*Phaseolus vulgaris*)

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

María Laura González Dávalos

Dirigido por:

Rosalía Reynoso Camacho

SINODALES

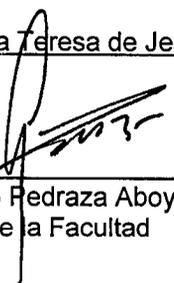
Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Presidente

Dra. Minerva Ramos Gómez
Secretario

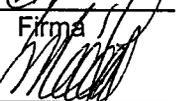
Dr. Irineo Torres Pacheco
Vocal

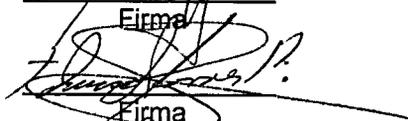
Dra. Ma. Guadalupe F. Loarca Piña
Suplente

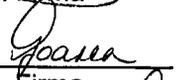
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Suplente

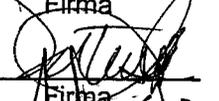

M.C. Gustavo Pedraza Aboytes
Director de la Facultad


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma


Dr. Sergio Quesada Aldana
Director de Investigación y
Posgrado

RESUMEN

El cáncer de colon es una de las mayores causas de mortalidad alrededor del mundo. Algunas causas de esta enfermedad es la producción excesiva de especies reactivas del oxígeno como resultado del ambiente y del metabolismo de carcinógenos en la dieta. La inducción de enzimas de fase 2, actúan como antioxidantes y parece ser una forma efectiva de proteger contra carcinógenos. Estudios epidemiológicos han demostrado una baja incidencia de cáncer de colon en poblaciones con un consumo alto de frijol (*Phaseolus vulgaris*), como en la mexicana. Los compuestos fenólicos del frijol pudieran ser los responsables del efecto protector contra el cáncer, pero no se sabe si esta leguminosa induce estas enzimas. Además, varios estudios han demostrado la inducción de apoptosis de células de cáncer debido a la adición de extractos de plantas, contribuyendo al efecto quimioprotector. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto quimioprotector *in vitro* e *in vivo* de diferentes variedades de frijol. Ratas macho Sprague-Dawley fueron alimentadas con 3 variedades de harinas de frijol cocido (Blanco Tlaxcala, Pinto Zapata y Negro 80-25) y 3 dosis basadas en el consumo *per cápita* en México (0.4%, 0.9% y 5.8%). Los animales fueron sacrificados después de 5 días, removiéndose hígado y colon distal para determinar la actividad de glutatión-S-transferasa (GST) y quinona reductasa (QR). Además, un tratamiento largo (14 semanas) fue realizado para evaluar GST y QR con Pinto Zapata y Negro a dosis de 0.4%. Para evaluar el mecanismo de apoptosis se trataron células de cáncer de colon humano (Caco2) con extractos metanólicos de frijol Pinto y Negro (28 y 9 µg/ml) determinando el nivel de expresión de las proteínas Caspasa-3, Bax y la fragmentación de ADN. El frijol Negro aumentó la actividad de GST al incrementar las dosis, sin ser estadísticamente significativo; en colon distal, GST se incrementó en un 50% en animales tratados con 5.8%. La actividad de QR en hígado disminuyó hasta en un 40% para todas las variedades a las dosis de 0.9 y 5.8%. En el experimento largo no se presentaron cambios ni en GST ni en QR. Ambos extractos disminuyeron la proliferación de las células Caco2 hasta en un 85%. Los niveles de expresión de las proteínas apoptóticas, fueron menores para el tratamiento con frijol Negro. Esto sugiere que el consumo de frijol bajo las mcondiciones probadas, no ejerce quimioprotección debido a la inducción de enzimas de fase II. Por otro lado, Pinto Zapata disminuye la proliferación celular por un mecanismo diferente al de Negro.

Palabras clave: Frijol, *Phaseolus vulgaris*, cáncer de colon, enzimas de fase II, apoptosis.

SUMMARY

Colon cancer is one of the leading causes of mortality around the world. Excessive production of reactive oxygen species, as a result of environmental and diet carcinogen metabolism, is among the causes of this disease. In this regard, induction of phase 2 enzymes that act as indirect antioxidants appears to be an effective means for achieving protection against several carcinogens. Epidemiological studies have shown a lower colon cancer incidence among populations with a high common bean (*Phaseolus vulgaris*) consumption, such as the Mexican population. Moreover, phenolic compounds present in common beans might be responsible for the protective effect against colon cancer development. However, it is not known if this legume induces phase 2 enzymes. On the other hand, multiple studies have shown that induction of apoptosis on cancer cells could be also envisioned to contribute to the chemoprotective effects of some plant extracts. Therefore, the objective of this study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* the chemoprotective effects of several common beans. Male Sprague-Dawley rats were fed a diet supplemented with bean flours (Blanco Tlaxcala, Pinto Zapata and Negro 80-25) at different concentrations (0.4%, 0.9% and 5.8%) based on *per capita* consumption in Mexico. After 5 days, animals were killed, and liver and colon were removed to determine the activity of glutathione-S-transferase (GST) and quinone reductase (QR). In order to assess a long-term treatment on GST and QR activities, animals received a diet supplemented with Pinto and Negro bean flours (0.4%) for 14 weeks. Additionally, colon cancer cell lines (Caco-2) were exposed to methanolic extracts of Pinto and Negro beans (28 and 9 µg/ml) in order to evaluate the induction of apoptosis, measured as the expression of Caspase-3 and Bax, as well as DNA fragmentation. Although not statistically significant, Negro beans increased the activity of hepatic GST in a dose-response manner; whereas in distal colon there was an increase by 50% in animals treated with 5.8%. Unexpectedly, hepatic QR activity decreased up to 40% for all the varieties at 0.9 and 5.8 % doses. In the long-term experiment, there were no GST and QR changes in both tissues. Both Pinto and Negro bean extracts showed a significantly antiproliferative activity (up to 85%) on Caco2 cells. However, apoptotic protein expressions were only lower in the Negro bean group. Overall, the results suggest that bean consumption does not exert its chemopreventive effect by inducing phase 2 enzymes. On the other hand, differences in cell proliferation inhibition between common bean treatments suggest alternate mechanisms of chemoprotection against colon cancer.

Key words: Common beans (*Phaseolus vulgaris*), colon cancer, phase 2 enzymes, apoptosis.

DEDICATORIAS

A MI PADRE...

“... La vida sigue, por supuesto, pero no tiene un solo modo de seguir. Cada uno tiene su ruta y su rumbo...”

“... déjalos y verás que la vida no sólo, como tú dices, sigue, sino que además se acomoda, se reajusta. Quizá tenga razón. Todo este terremoto nos ha dejado rengos, incompletos, parcialmente vacíos, insomnes. Nunca vamos a ser los de antes. Mejores o peores, cada uno lo sabrá. Por dentro, y a veces por fuera, nos pasó una tormenta, un vendaval, y esta calma de ahora tiene árboles caídos, techos desmoronados, azoteas sin antenas, escombros, muchos escombros. Tenemos que reconstruirnos, claro: plantar nuevos árboles, pero tal vez no consigamos en el vivero los mismos tallitos, las mismas semillas... Quitar los escombros, dentro de lo posible, porque también habrá escombros que nadie podrá quitar del corazón y de la memoria”

Mario Benedetti

Tomado de “Primavera con una esquina rota”

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, por su cariño y ayuda en estos últimos años. Gracias mamá, gracias Luli, Juan, Jorge, Cris y Maye. También a ti Pato.

Por este año en el que estuviste y has estado tan cerca de mi, aún lejos me has apoyado en los momentos más difíciles, gracias Edel.

A mi directora de tesis, dra. Rosalía por su dedicación y ayuda; a la dra. Minerva por compartir sus conocimientos, sus consejos y su tiempo. A la dra. Tere, por toda su ayuda y las facilidades otorgadas para trabajar en su laboratorio.

Al dr. Irineo y a la dra. Flavia por sus útiles consejos y sugerencias para la finalización de este proyecto.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Bioquímica Molecular, Toxicología Molecular y Biología Celular; a Gris, Ezequiel, Lorenzo y Rocío, con los que compartí la mayor parte de estos dos últimos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante estos dos últimos años para poder llevar a cabo mis estudios de maestría.

A Carmelita, Laurita y Silvia, por toda su ayuda y ánimo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Cáncer	3
II.2 Características de las células cancerosas	4
II.3 Genética del cáncer	5
II.4 Cáncer de colon	7
II.5 Morfología del colon	8
II.5.1 Patogénesis del cáncer de colon	9
II.6 Estrés oxidativo y cáncer	9
II.6.1 Estrés oxidativo y cáncer de colon	11
II.7 Mecanismos de intervención en la prevención del cáncer de colon	11
II.8 Mecanismos de detoxificación de carcinógenos	12
II.9 Apoptosis	15
II.10 Dieta y cáncer	18
II.11 Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	19
II.12 Compuestos nutraceuticos del frijol y cáncer de colon	21
II.12.1 Fibra	23
II.12.2 Acido fítico	24
II.12.3 Oligosacáridos	24
II.12.4 Polifenoles	25
III. OBJETIVOS	28
III.1 Objetivo general	28
III.2 Objetivos específicos	28
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	29
IV.1 Material Biológico	29
IV.2 Compuestos químicos	29
IV.3 Efecto del frijol sobre la inducción de enzimas antioxidantes	30

IV.3.1	Preparación de las harinas de frijol cocido	30
IV.3.2	Preparación del alimento con las harinas de frijol.....	31
IV.3.3	Tratamiento in vivo con harinas de frijol cocido	31
IV.4	Sacrificio	33
IV.5	Procesamiento de muestras	33
IV.5.1	Extractos citosólicos.....	33
IV.5.2	Cuantificación de proteínas totales	34
IV.5.3	Determinación de Glutación-S-Transferasa: CDNB.....	34
IV.5.4	Determinación de Quinona Reductasa	36
IV.6	Extracción de la fracción metanólica de las harinas de frijol cocido	37
IV.6.1	Cuantificación de polifenoles	37
IV.7	Efecto de los extractos metanólicos de las harinas de frijol sobre la proliferación de células CaCo2.....	38
IV.7.1	Ensayo de Proliferación y sobrevivencia.....	38
IV.7.2	Cuantificación de proteínas de extractos celulares.....	39
IV.7.3	Western Blot para detección de Caspasa-3 y Bax.....	40
IV.7.4	Fragmentación de ADN.....	41
IV.8	Análisis Estadístico	41
V.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	42
V.1	Actividad enzimática en ratas alimentadas durante 5 días con harinas de frijol cocido	42
V.1.1	Actividad enzimática de glutación-S-transferasa en hígado	42
V.1.2	Actividad enzimática de glutación-S-transferasa en colon distal	45
V.1.3	Actividad enzimática de quinona reductasa en hígado	47
V.1.4	Actividad enzimática de quinona reductasa en colon distal	50
V.2	Actividad enzimática en ratas alimentadas durante 14 semanas con harinas de frijol cocido	52
V.2.1	Actividad enzimática de glutación-S-transferasa en hígado y colon distal durante 14 semanas de tratamiento.....	52
V.2.2	Actividad enzimática de quinona reductasa en hígado y colon distal durante 14 semanas de tratamiento	54
V.3	Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos metanólicos de harinas de frijol cocido Negro 80-25 y Pinto Zapata	56
V.4	Efecto de los extractos metanólicos de diferentes variedades de harinas de frijol cocido en células de cáncer de colon CaCo2.....	58
V.5	Expresión de Caspasa-3 en células de cáncer de colon CaCo2 tratadas con extractos metanólicos de harinas de frijol cocido Pinto Zapata y Negro 80-25	63

V.6	Expresión de Bax en células de cáncer de colon CaCo2 tratadas con extractos metanólicos de harinas de frijol cocido Pinto Zapata y Negro 80-25	65
V.7	Fragmentación de ADN en células de cáncer de colon CaCo2 tratadas con los extractos metanólicos de harinas de frijol cocido Pinto Zapata y Negro 80-25.....	67
VI.	CONCLUSIONES.....	69
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
VIII.	APÉNDICE.....	76
VIII.1	Preparación de extractos citosólicos.....	76
VIII.2	Determinación de Glutación S-Transferasa	76
VIII.3	Ensayo de Quinona Reductasa	77
VIII.4	Preparación del buffer de lisis para extracto de proteínas de células (para 1 ml).....	77
VIII.5	Geles y soluciones para electroforesis.....	78
VIII.6	Buffers para ADN	79

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1.	Oncogenes asociados a tumores humanos..... 6
2.	Especies reactivas del oxígeno. 10
3.	Mecanismos de inhibición del proceso de carcinogénesis en 12
4.	Sistemas de defensa <i>in vivo</i> contra daño oxidativo 13
5.	Fitoquímicos con actividad antioxidante 19
6.	Componentes del frijol común. 20
7.	Contenido de taninos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) de diferentes colores 26
8.	Efectos de la cocción en la distribución de taninos en frijol <i>Phaseolus</i> 26
9.	Grupos experimentales de ratas alimentadas durante 5 días con diferentes variedades de harinas de frijol 32
10.	Grupos experimentales de ratas alimentadas durante 14 semanas con diferentes variedades de harinas de frijol..... 33
11.	Compuestos fenólicos en extractos metanólicos de harinas de frijol cocido expresados en mg (+)catequina 56
12.	Efecto de los extractos metanólicos de las variedades de frijol Negro 80-25 y Pinto Zapata en la sobrevivencia y proliferación de células CaCo 2. 62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Principales causas de muerte en México en el año 2002.....	4
2.	Incidencia de cáncer a nivel mundial.....	7
3.	Esquema del epitelio normal de colon.....	8
4.	Esquema general del papel de las enzimas de fase I y fase II en el metabolismo de carcinógenos.....	14
5.	Inducción de apoptosis y diferencia entre necrosis.....	17
6.	Esquema de la familia Bcl-2 y su acción en el proceso de apoptosis.....	18
7.	Efecto de diferentes variedades de frijol en el número de tumores en ratas a las que se les indujo cáncer de colon.....	23
8.	Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa en hígado de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 5 días con diferentes concentraciones y variedades de harinas de frijol cocido.....	43
9.	Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa en colon distal de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 5 días con diferentes concentraciones y variedades de harinas de frijol cocido.....	46
10.	Actividad enzimática de quinona reductasa en hígado de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 5 días con diferentes concentraciones y variedades de harinas de frijol cocido.....	48
11.	Actividad enzimática de quinona reductasa en colon distal de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 5 días con diferentes concentraciones y variedades de harinas de frijol cocido.....	51
12.	Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa en hígado y colon distal de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 14 semanas a una concentración de 0.4 % con diferentes variedades de harinas de frijol cocido.....	53
13.	Actividad enzimática de quinona reductasa en hígado y colon distal en ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 14 semanas con una concentración de 0.4 % y con diferentes variedades de harinas de frijol cocido.....	55
14.	Efecto del extracto metanólico de la harina de frijol Negro 80-25 en células de cáncer de colon CaCo2.....	60
15.	Efecto del extracto metanólico de la variedad Pinto Zapata en células de cáncer de colon CaCo2.....	61

16.	Expresión de Caspasa 3 en células CaCo2 tratadas con extractos de frijol Pinto Zapata (0.028 mg/ml) y Negro 80-25 (0.009 mg/ml).....	64
17.	Expresión de Bax en células CaCo2 tratadas con extractos de frijol Pinto Zapata (0.028 mg/ml) y Negro 80-25 (0.009 mg/ml)	66
18.	Patrón electroforético de ADN obtenido de células CaCo2 sometidas a extractos metanólicos de diferentes variedades de harinas de frijol cocido durante 48 horas.....	68

I. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, la incidencia de cáncer de colon a nivel mundial se ha incrementado considerablemente, siendo una de las patologías con una elevada mortalidad. En México, el cáncer colorrectal se ha convertido en una causa importante de mortalidad y morbilidad.

La dieta es uno de los factores más importantes en la aparición de tumores de colon. En países en vías de desarrollo existe una menor incidencia de este tipo de cáncer, mientras que dietas bajas en fibra y altas en grasa favorecen la aparición de esta enfermedad. Esto sugiere que algunos componentes de la dieta básica de países en vías de desarrollo, tales como los cereales y las leguminosas, pueden jugar un papel importante en la quimioprotección de cáncer de colon.

Una de las leguminosas que más se consume en México, es el frijol y, junto con el maíz, constituyen la base de la dieta del mexicano, ya que aportan la mayoría de las proteínas de la población con bajos recursos.

En estudios de carcinogénesis en animales se ha comprobado el efecto protector del frijol. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios que demuestren el potencial de las variedades de frijol cultivadas en nuestro país. Asimismo, es importante evaluar el mecanismo de acción a través del cual los componentes de esta leguminosa ejercen actividad quimioprotectora.

Existen diversos factores como el estilo de vida y la dieta que originan que ingresen al organismo carcinógenos que pudieran contribuir al desarrollo de cáncer. Uno de los principales mecanismos de protección dentro del organismo, es la activación de enzimas detoxificantes de fase II, como lo son la glutatión-S-

transferasa, quinona reductasa, entre otras; estas enzimas son importantes para defender a la célula de agentes químicos extraños que generan especies reactivas del oxígeno, conocidas como ROS por sus siglas en inglés (Reactive Oxygen Species); dichos químicos se vuelven más solubles y son eliminados más fácilmente (Prochaska y col., 1992).

Estas enzimas que metabolizan xenobioticos juegan un papel importante en la regulación de la toxicidad, daño oxidativo, mutagenicidad y efectos neoplásicos de agentes carcinogénicos. La inducción de la enzima glutatión-S-transferasa se ha asociado con una reducida incidencia y multiplicidad de tumores en diferentes órganos de roedores.

Por otro lado, se ha encontrado que las harinas de frijol cocido disminuyen en un 67% la incidencia de cáncer de colon inducido químicamente. Dicha leguminosa contiene varios fitoquímicos que pudieran estar actuando contra esta patología; uno de estos componentes, son los compuestos fenólicos; esta leguminosa contiene concentraciones elevadas de compuestos polifenólicos, los cuales pudieran tener un efecto modulador sobre las enzimas de la fase II.

Otro de los mecanismos mediante los cuales los compuestos fenólicos de las harinas de frijol pudieran estar actuando en la protección de cáncer de colon es la inducción de apoptosis. Se ha comprobado que dichos compuestos se encuentran involucrados en un aumento en la expresión de las proteínas que participan en el proceso de muerte celular (apoptosis).

Con base a lo anterior se plantea demostrar en estudios *in vivo* la capacidad de las harinas de frijol para inducir enzima destoxicantes de fase II, así como el efecto de los extractos metanólicos de frijol sobre el proceso de apoptosis, empleando como modelo células CaCo2.

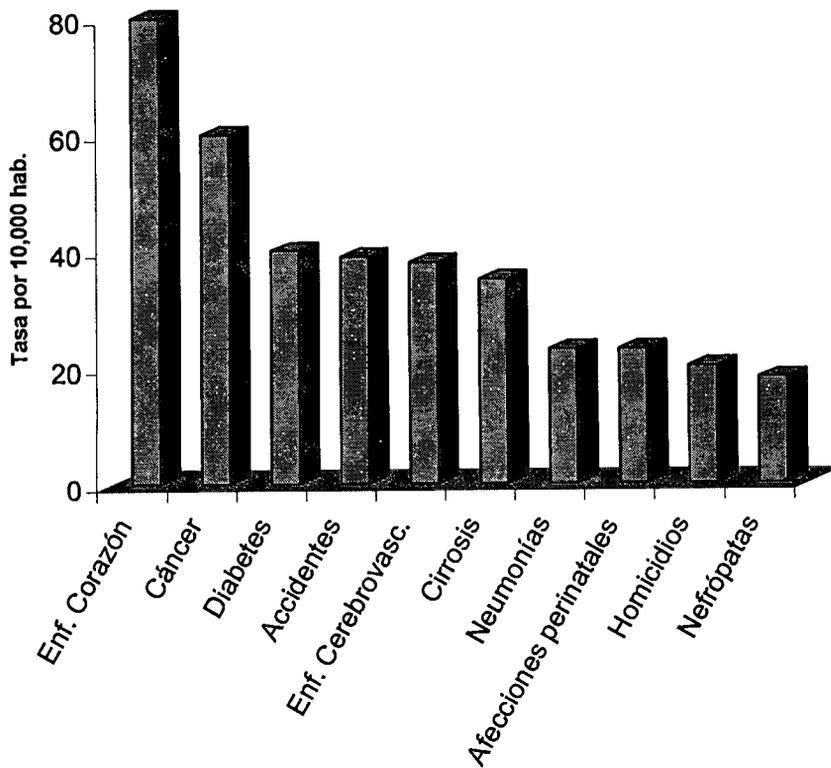
II. ANTECEDENTES

II.1 Cáncer

La capacidad de una célula para producir réplicas exactas de sí misma es un componente esencial de la vida celular. Es un proceso que debe realizarse con gran fidelidad para que los organismos puedan propagarse. La maquinaria que controla el ciclo celular presenta un alto grado de organización, la cual se lleva a cabo mediante señales intracelulares y extracelulares.

La ausencia de fidelidad en el proceso de reproducción celular origina una situación de inestabilidad genética que contribuye de forma importante a la aparición de células cancerosas en organismos eucarióticos superiores, lo que lleva a decir que el cáncer es una enfermedad caracterizada por anomalías en la regulación del crecimiento y la reproducción de las células. Aberraciones del control del ciclo celular reflejan algunas de las alteraciones moleculares características de células cancerosas. Los mecanismos de control intracelular se ven influenciados por la presencia de factores extracelulares tales como mitógenos, antimitógenos, inductores de la diferenciación, factores de crecimiento y de anclaje, disponibilidad de nutrientes, entre otros (Kastan, 1999).

En México, el cáncer ocupó el segundo lugar de mortalidad en el año 2002 seguido de las enfermedades cardiovasculares (Figura 1) (INEGI, 2002).



(INEGI, 2002)

Figura 1. Principales causas de muerte en México en el año 2002

II.2 Características de las células cancerosas

Las células cancerosas difieren de acuerdo al tipo de célula de la cual deriva, pero algunos tumores mantienen las funciones que le pueden servir del tejido normal. Las características celulares de un tejido canceroso son:

- Incremento en el número de células.
- Pérdida del arreglo normal de las células.
- Variación de la forma y el tamaño de las células.
- Aumento en el tamaño del núcleo y la densidad.
- Aumento en la actividad mitótica.

- Mitosis anormal (McCane y Roberts, 1994).

El cáncer comprende tres estadios:

- 1.- Inducción de mutación en el ADN de una célula somática (iniciación).
- 2.- Estimulación de la expansión tumoral del clon mutado (promoción).
- 3.- Malignización del tumor (progresión) (Zorrilla y col., 2004).

II.3 Genética del cáncer

Se sabe que un proceso neoplásico resulta de una serie de alteraciones genéticas, producto de la acumulación de varias mutaciones a lo largo del tiempo. Estas alteraciones afectan tanto a los genes que activan la división celular, como otros que vigilan y ordenan la eliminación de las células potencialmente cancerosas, llevando así a una alteración en el mecanismo normal que controla la proliferación celular (Lira, 2004).

Las mutaciones que producen fallas en el control del ciclo celular pueden ser por la estimulación de un gen que ocasiona hiperactividad o la inhibición de un gene ocasionando inactividad celular. Una hiperactividad es el resultado de una sobreexpresión de genes provocando la formación de tumores, en este caso, los genes alterados se llaman oncogenes (que provienen de la palabra griega *onkos*, que significa masa o tumor) y codifican para proteínas que pueden propiciar la aparición del cáncer (Cuadro 1). El principal objetivo de los oncogenes es la división, la diferenciación e inhiben la muerte celular programada; cuando existe una mutación en estos, pierden la habilidad de ser controlados (Perkins y Stern, 2000).

Cuadro 1. Oncogenes asociados a tumores humanos.

Oncogen	Tumor
<i>c-myc</i>	Leucemias, carcinoma de mama, estómago, colon y pulmón. Neuroblastoma, glioblastoma.
<i>n-myc</i>	Neuroblastoma, retinoblastoma y carcinoma de pulmón.
<i>l-myc</i>	Carcinoma de pulmón.
<i>erbB</i>	Glioblastoma, carcinoma de células escamosas.
<i>erbB-2</i>	Carcinoma de mama, glándulas salivares y ovario.
<i>int-2</i>	Carcinoma de mama, y células escamosas.
<i>hst</i>	Carcinoma de mama y células escamosas.
<i>prad-1</i>	Carcinoma de mama y células escamosas.
<i>abl</i>	Línea celular K562 de la leucemia mielógena crónica.
<i>Myb</i>	Carcinoma de colon, leucemias.
<i>ets-1</i>	Linfoma.
<i>rash</i>	Carcinoma de vejiga.
<i>rask</i>	Carcinoma de pulmón, ovario y vejiga.
<i>rasn</i>	Línea celular del carcinoma de mama.
<i>Mdm-2</i>	Sarcomas.

(Perkins y Stern, 2000)

Los genes supresores de tumores son aquellos que su función normal es inhibir la proliferación, apoptosis o diferenciación en las células, es decir, controlan la división celular. Ejemplos de este tipo de genes son: gene de neurofibromatosis (NF-1), gene de retinoblastoma (rb), gene p53 y el gene del tumor de Wilms (WT-1) (McCane y Roberts, 1994). El desarrollo del cáncer requiere de múltiples alteraciones genéticas tanto en oncogenes como en genes supresores de tumores (Harem y Mak, 2001).

II.4 Cáncer de colon

El cáncer de colon es el tercero en frecuencia, después del de mama y pulmón a nivel mundial, y la segunda causa de muerte en los Estados Unidos. La incidencia es más elevada en los países occidentales y sobretodo en países en desarrollo, particularmente entre los grupos socioeconómicos más altos (Trichopoulos, 1999). A nivel mundial, esta patología ocupó el tercer lugar, después del cáncer de pulmón y de mama en el año 2003 (Figura 2) (OMS, 2003).

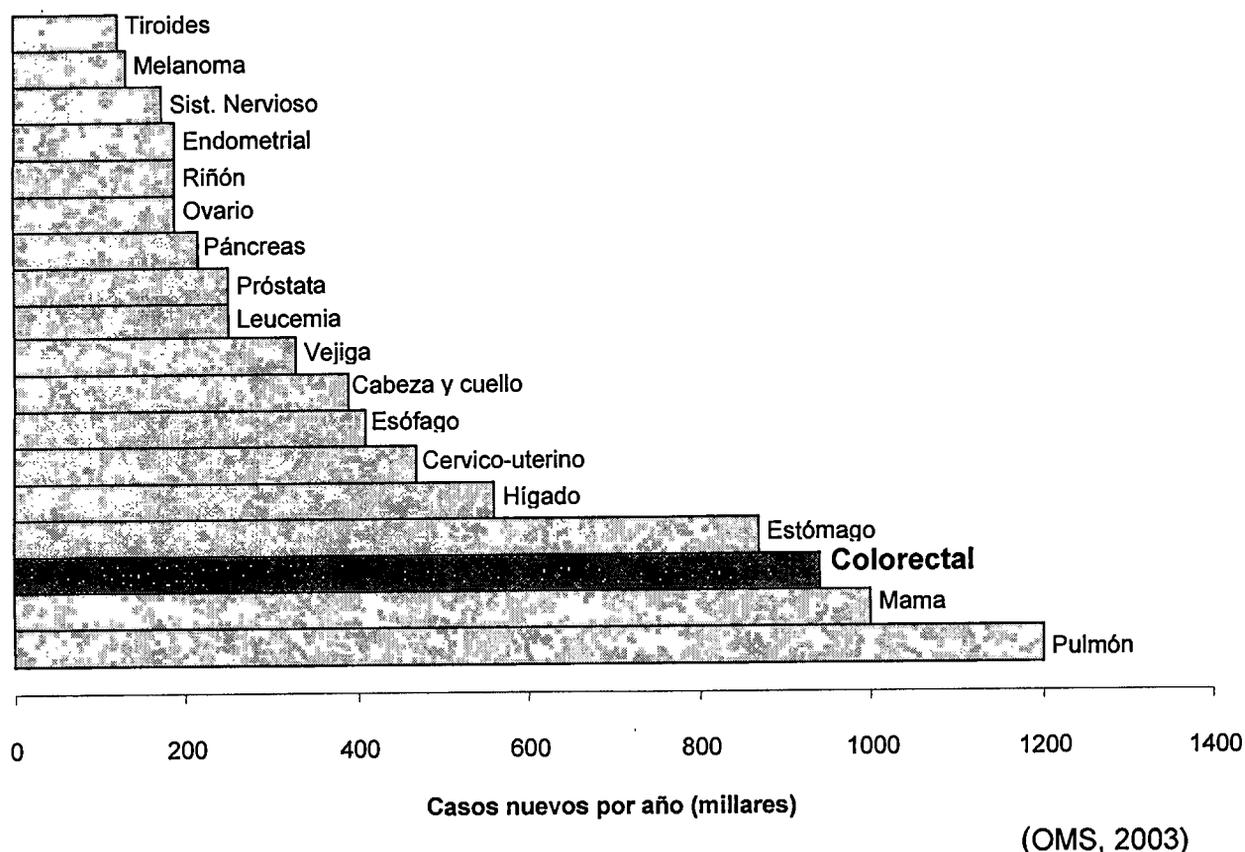


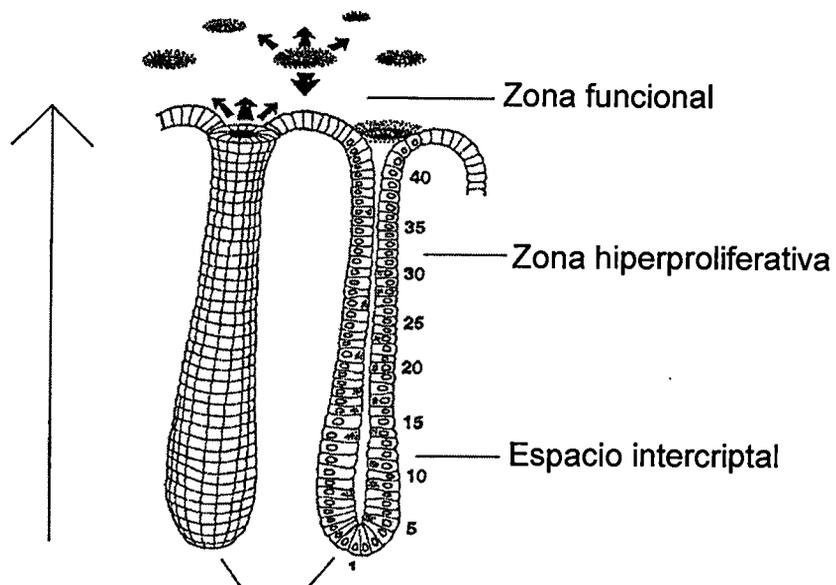
Figura 2. Incidencia de cáncer a nivel mundial

Una de las características más importantes de la epidemiología del cáncer colorectal es el elevado riesgo que presentan las poblaciones urbanas, se ha observado que incrementa exponencialmente con la edad. En las áreas de elevado riesgo, se observa un predominio del cáncer de colon en el sexo

femenino. En relación a los factores ambientales, se ha observado que dietas ricas en grasa animal y un bajo consumo de fibra favorecen la aparición de esta patología. Asimismo, el pH del colon favorece la formación de cocarcinógenos a partir de ácidos biliares. Además un consumo de alcohol aún en concentraciones bajas, duplica o triplica la aparición de un carcinoma colorectal (Piñols, 1995; Bruce, y col., 2000).

II.5 Morfología del colon

El colon es el segmento del tracto gastrointestinal con una mucosa caracterizada por la presencia de múltiples criptas, tiene una monocapa de células epiteliales que se auto-renuevan, las cuales surgen de células tubulares, mismas que están en la base de las criptas, y que constantemente migran hacia la superficie (Figura 3), en donde mueren por apoptosis o por necrosis y posteriormente son removidas por macrófagos epiteliales (Aloysius-Lambertus, 2001).



(Aloysius-Lambertus, 2001)

Figura 3. Esquema del epitelio normal de colon

II.5.1 Patogénesis del cáncer de colon

En los eventos tempranos del desarrollo del cáncer de colon, una de las características es la pérdida de la diferenciación entre los compartimientos proliferativos y funcionales. La zona proliferativa se expande hacia la parte superior de la cripta colónica, lo que implica un estado menos diferenciado del epitelio. En etapas tardías, el grado de proliferación excede a la muerte celular, lo que significa una mayor acumulación de células epiteliales en la mucosa y partes del tejido salen hacia el lumen. Esto resulta en la formación de adenomas, y en algunos casos, estos se convierten en malignos, siendo carcinomas invasivos. Las transformaciones fenotípicas son debidas a las alteraciones ocurridas en los genes que controlan el intercambio celular (supresores de tumores y oncogenes) (Aloysius-Lambertus, 2001).

Se ha demostrado que otro mecanismo a través del cual se promueve la formación y progresión de tumores es el estrés oxidativo.

II.6 Estrés oxidativo y cáncer

En células de mamíferos, el estrés oxidativo resulta de una prevalencia de oxidantes que producen tipos específicos de daño celular a macromoléculas. El daño por oxidantes y xenobióticos juegan un papel en el desarrollo y generación del cáncer. Entre las posibles causas del desarrollo del cáncer se encuentran los ROS, causando daño en el ADN en las células. Las especies reactivas del oxígeno son moléculas que contienen oxígeno, las cuales son más activas que el triple oxígeno que se encuentra en el aire. El ión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo y oxígeno simple (1O_2), u otras especies como lo son el radical alcoxil, radical peroxil, dióxido de nitrógeno, hidroperóxido lipídico,

hidroperóxido protéico e hipoclorito son también considerados como especies activas del oxígeno (Cuadro 2) (Noguchi y Niké, 1999).

Cuadro 2. Especies reactivas del oxígeno.

Radicales		No radicales	
O_2^-	ión superóxido	H_2O_2	peróxido de hidrógeno
$HO\cdot$	radical hidroxilo	1O_2	oxígeno simple
$HO_2\cdot$	radical hidroperóxido	$LOOH$	hidroperóxido lipídico
$L\cdot$	radical lipídico	$Fe=O$	complejo hierro-oxígeno
$LO_2\cdot$	radical peroxil lipídico	$HOCl$	hipoclorito
$LO\cdot$	radical alcoxil lipídico		
$NO_2\cdot$	dióxido de nitrógeno		
$\cdot NO$	óxido nítrico		
$RS\cdot$	radical til		
$P\cdot$	radical protéico		

(Noguchi y Niké, 1999)

Por otro lado, los ROS pueden ser generadas como resultado del metabolismo intracelular normal en la mitocondria y peroxisomas, así como por una variedad de sistemas enzimáticos citosólicos. Lo anterior causa un desbalance a favor de un estado oxidativo, que ocasiona un estrés oxidativo, dando lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo y consecuentemente llega a producir daño celular, específicamente en lípidos, proteínas y ADN (Finkel, y Holbrook, 2000; Zorrilla y col., 2004).

La metilación, la desaminación, la depuración y la oxidación del ADN son los daños endógenos más importantes. El grado del daño depende del genotóxico o del estrés oxidativo prevalente en el tejido, el nivel de los sistemas de detoxificación y la capacidad de reparación de ADN, por lo que diferentes tejidos tienen diferentes niveles de daño oxidativo.

II.6.1 Estrés oxidativo y cáncer de colon

El colon es especialmente susceptible a oxidantes y antioxidantes, ya que contiene bacterias que generan radicales libres, peróxido de hidrógeno y genotoxinas (Pool-Zobel y col., 1999).

Los ROS pueden ser fácilmente producidos en la cavidad intracolónica, debido a las grandes cantidades de bacterias y metabolitos dietarios, los cuales generan radicales libres, peróxido de hidrógeno y genotoxinas. Existen varios reportes en donde se ha visto que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) está involucrado en la patogénesis de los tumores de colon, ya que puede cruzar la membrana celular de forma libre y así modificar proteínas y ácidos nucleicos. Hay evidencias de que el H_2O_2 promueve el crecimiento celular y está relacionado con la expresión de genes en tumores humanos, en la apoptosis y la proliferación; además se ha estudiado su participación en la respuesta inflamatoria (Zhu y col., 2002).

Se cree que un defecto en la barrera epitelial activa a COX-2 (ciclooxigenasa involucrada en procesos de inflamación), con la consecuente generación de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico, dichas prostaglandinas activan la respuesta inflamatoria en células generando ROS y promoviendo la carcinogénesis (Zhu y col., 2002).

II.7 Mecanismos de intervención en la prevención del cáncer de colon

La prevención del cáncer puede ser lograda por evitar la exposición a carcinógenos o por favorecer la ingesta de factores que protegen el mecanismo de defensa fisiológico, esto se refiere a la quimioprevención, y se basa en intervenciones farmacológicas y dietarias (De Flora y col., 2001).

Los mecanismos de inhibición de la carcinogénesis en cáncer de colon según De Flora y col. (2001), se muestran en el Cuadro 3:

Cuadro 3. Mecanismos de inhibición del proceso de carcinogénesis en cáncer de colon

Etapa	Mecanismo de inhibición
Iniciación	Atrapamiento y detoxificación. Inhibición de procarcinógenos por enzimas fase I Inducción de enzimas de fase I y fase II. Actividad antioxidante y remoción de ROS.
Promoción	Actividad antioxidante. Inhibición de la proliferación. Inducción de apoptosis.
Progresión	Inhibición de efectos genotóxicos. Actividad antioxidante.
Invasión y metástasis	Inducción de diferenciación celular. Modulación de la transducción de señales. Activación de genes antimetástasis

(De Flora y col., 2001)

II.8 Mecanismos de detoxificación de carcinógenos

De acuerdo a lo anterior, uno de los principales mecanismos de protección contra el cáncer, es la actividad antioxidante. La iniciación de la gran mayoría de los tumores es el resultado del daño al ADN por metabolitos de carcinógenos electrofílicos o por ROS (Talalay. y col., 1995). Los sistemas antioxidantes enzimáticos (catalasa CAT, superóxido dismutasa SOD, glutatión peroxidasa GxP) y no enzimáticos (vitamina C, E, NADPH, piruvato, flavonoides, carotenoides, etc) regulan los niveles de ROS. Si se incrementan los niveles de ROS y no existe un balance con los sistemas antioxidantes, se puede interrumpir el papel fisiológico de los oxidantes en relación con la proliferación celular y las defensas (Yin y col., 2003).

Por otro lado, se sabe que algunos antioxidantes son sintetizados en el cuerpo humano. Estos incluyen enzimas, algunas proteínas y especies de bajo peso molecular. Los sistemas de defensa antioxidantes como SOD incrementan la conversión de superóxido a peróxido de hidrógeno, mientras que la CAT y GxP convierten el peróxido de hidrógeno en agua, como se muestra en el Cuadro 4 (Halliwell y Arouma, 1997; Noguchi y Niké, 1999; Finkel y Hoolbrok, 2000).

Cuadro 4. Sistemas de defensa *in vivo* contra daño oxidativo

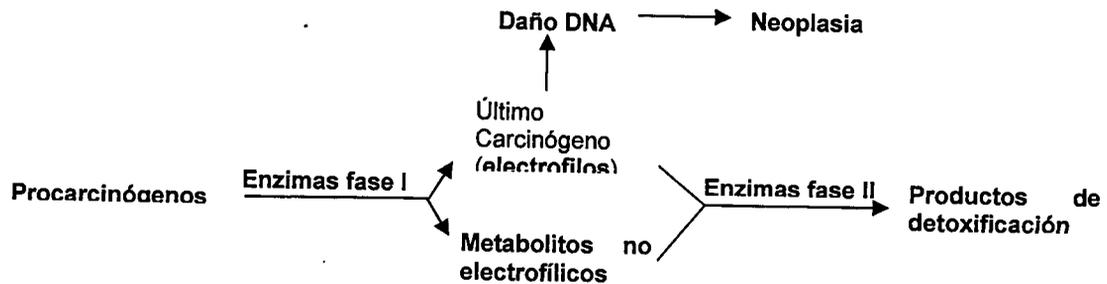
1.- Antioxidantes preventivos: supresión de la formación de radicales libres.
(a) Descomposición de hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno

CAT	Descomposición de peróxido de hidrogeno $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
GxP	Descomposición de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos de ácidos grasos. $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ $\text{LOOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{LOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
Glutación peroxidasa de plasma	Descomposición de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos de fosfolípidos $\text{PLOOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{PLOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
Hidroperóxido fosfolipídico glutación peroxidasa	Descomposición de hidroperóxidos de fosfolípidos.
Peroxidasa	Descomposición de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos lipídicos. $\text{LOOH} + \text{AH}_2 \rightarrow \text{LOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{A}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{A}$
Glutación S-transferasa	Descomposición de hidroperóxidos lipídicos.

(Noguchi y Niké, 1999).

Existe suficiente evidencia que sugiere un aumento en la actividad de enzimas que se encuentran relacionadas con la inactivación de carcinógenos como uno de los mecanismos más importantes para lograr la quimioprotección (Talalay, 1988).

Algunos carcinógenos son procarcinógenos inocuos, éstos requieren la conversión por enzimas de fase I y convertirlos en últimos carcinógenos, produciendo así una serie de eventos dañinos que pueden originar cáncer, aunque también pueden formar productos de detoxificación no electrofílicos (Figura 4).



(Talalay, 1991)

Figura 4. Esquema general del papel de las enzimas de fase I y fase II en el metabolismo de carcinógenos

Las reacciones catalizadas para la biotransformación de carcinógenos mediante enzimas están divididas en dos grupos, llamadas de fase I y de fase II; éstas se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo, y el hígado es el principal órgano donde se llevan a cabo las reacciones de biotransformación, y son localizadas en el citosol principalmente (Parkinson, 1995). El metabolismo por las enzimas de fase I se garantiza por la acción del citocromo P450 (Langsch y Bader, 2001). Los productos de las enzimas de fase I son sustratos para las enzimas de fase II y son un mecanismo importante de defensa contra la ingesta de xenobióticos, ya que los convierte en sustancias que son más solubles en agua y fácilmente excretables. Además, éstas pueden ser inducibles (Itoh y col., 1997). Las principales reacciones de fase II son catalizadas por:

- a) Glutación transferasas (GST's): reducen hidroperóxidos de bases de ADN y de lípidos. Reducen además los metabolitos de o-quinona y previenen la generación de las especies reactivas de oxígeno. La mayor función de GST's es la protección de la célula contra el estrés oxidativo.

- b) Quinona reductasa (QR): cataliza de manera obligatoria la reducción de dos electrones de quinonas a hidroquinonas y finalmente convirtiendo los carcinógenos en productos menos tóxicos (Itoh y col., 1997). Esta enzima también mantiene los antioxidantes endógenos celulares como lo son ubiquinona y α -tocoferilquinona en sus formas reducidas y por lo tanto, activas, protegiendo así a las membranas contra daño oxidativo. Muy recientemente se ha visto que QR puede jugar un papel en la protección contra enfermedades crónicas neurodegenerativas, reduciendo los niveles de metabolitos prooxidativos de dopamina en células nerviosas (Talalay, 2000).

La transcripción de las enzimas de fase II es regulada en las células de los animales por una baja concentración de una variedad de agentes químicos, muchos de éstos son encontrados en la dieta. Por lo que, modificaciones específicas relacionadas a un incremento en el consumo de fitoquímicos que inducen enzimas de fase II, pueden ser una estrategia prometedora para disminuir el riesgo de cáncer (Talalay y col., 1995; Prochaska, y col., 1992).

II.9 Apoptosis

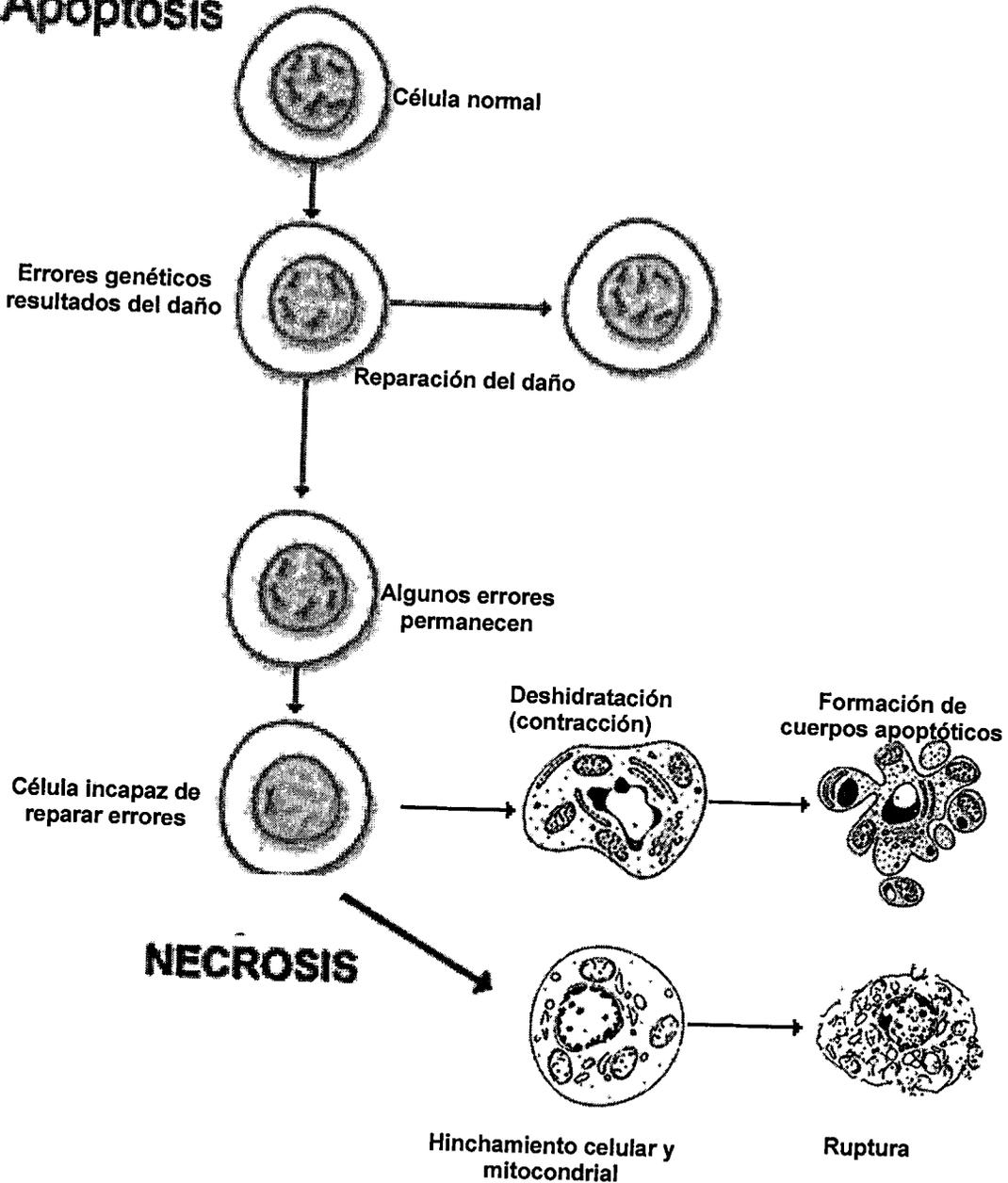
Los antioxidantes además de prevenir la peroxidación de lípidos y reducir los efectos de las especies reactivas del oxígeno, estos compuestos controlan otras funciones fisiológicas relacionadas a la supresión del cáncer, tales como la apoptosis. Dicho proceso es uno de los principales mecanismos relacionados con la supresión del cáncer y prevención del cáncer.

La muerte celular programada o apoptosis es esencial para el desarrollo y el mantenimiento de los organismos multicelulares. Cuando existe un daño en la célula, ésta tiene la capacidad de corregir dichos errores. En caso contrario, la célula decide suicidarse o eliminarse mediante el mecanismo de apoptosis (Figura 5).

La apoptosis es definida como los cambios morfológicos en el núcleo en el que se condensa la cromatina y aparece el rompimiento del núcleo y de la célula en general. Además hay exposición de la fosfatidilserina del citoplasma al espacio extracelular, el citoplasma se comprime, hay fragmentación y finalmente la aparición de cuerpos apoptóticos, donde se encuentran partes del núcleo y de los demás organelos (Figura 5). Dentro de los cambios bioquímicos existe la demanda de energía, la liberación de varios factores hacia el citoplasma por la mitocondria (citocromo C) y la activación de la cascada de las caspasas. Los cambios fisiológicos que ocasiona son que no hay respuesta inflamatoria, ni fagocitosis por células adyacentes o macrófagos además se afecta a la célula de manera individual.

Los fenómenos más comunes del mecanismo de apoptosis son la activación de caspasas, la condensación de la cromatina y la aparición de fagocitos en la superficie, aunque existe la habilidad inesperada de la célula a sobrevivir a la activación de caspasas pro-apoptóticas.

Apoptosis



(Genetics Home Referentes)

Figura 5. Inducción de apoptosis y diferencia entre necrosis

Existen familias de supresores y promotores de apoptosis, la primera incluyen a miembros de la familia de Bcl-2 e inhibidores de apoptosis (XIAP, NF- κ B). Dentro de la familia de Bcl-2, existen miembros que inhiben el proceso de apoptosis (Bcl-2, Bcl-X) y miembros que la promueven (Bax, Bad, Bid). Altos niveles de Bcl-2 promueven el cáncer al inhibir el proceso de apoptosis. Las familias de promotores además de los miembros de la familia Bcl-2, incluyen a las proteasas (Caspasa 3, 9, 8, 10). Bax por ejemplo, actúa como promotor de apoptosis uniéndose a la mitocondria donde interfiere con la función mitocondrial y la liberación del citocromo c (Raff, 1998; Bar-Am, 2005)

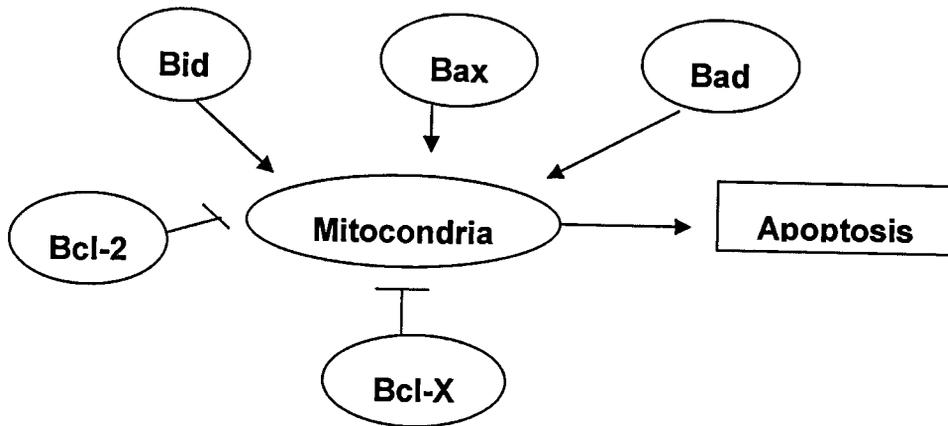


Figura 6. Esquema de la familia Bcl-2 y su acción en el proceso de apoptosis

II.10 Dieta y cáncer

Un gran número de fitoquímicos no reconocidos como nutrientes esenciales, juegan un papel importante en relación a la actividad antioxidante en el cuerpo. Una gran diversidad de fitoquímicos son ahora estudiados extensivamente por su papel potencial en reducir el riesgo y prevenir varias enfermedades, entre ellas el cáncer (Cuadro 5) (Papas, 1999).

Cuadro 5. Fitoquímicos con actividad antioxidante

Fitoquímico	Ejemplo
Carotenoides	Licopeno, luteína, α caroteno
Bioflavonoides	Genisteína, daizdeína, quercetina.
Fitoesteroles	Sitosterol, estigmasterol, oryzanol.
Taninos	Catequinas y otros compuestos polifenólicos.
Clorofila	Clorofila A y clorofilina.
Terpenoides	Limonina y limoneno.
Compuestos alilicos	Sulfito dialil y disulfito.
Indoles	Indol-3-carbinol

(Tsuda y col., 2004; Nishino y col., 2005)

Se ha evaluado, en estudios experimentales y en algunas poblaciones, el potencial de algunos agentes de la dieta para promover o inhibir el desarrollo de cáncer de colon hecho que permitió sugerir fuertemente a una dieta más protectora (McIntosh y col., 1998). Dentro de los alimentos más prometedores se encuentra el frijol, el cual es una fuente importante de fibra soluble e insoluble, compuestos fenólicos, almidón resistente (AR) a la hidrólisis de enzimas digestivas, ácidos grasos (linoléico y linolénico), entre otros.

II.11 Frijol (*Phaseolus vulgaris*)

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los alimentos de gran importancia en México, ya que junto con el maíz aportan prácticamente la totalidad de las proteínas vegetales que consumen los estratos sociales de bajos ingresos de la ciudad y del campo, ocupando un lugar predominante dentro de la dieta. Además, esta leguminosa constituye un complemento nutricional al consumo de los cereales (Pérez y col., 2002). Algunos de los componentes del frijol se pueden observar en el Cuadro 6. Esta especie es una rica fuente de proteínas, hierro vegetal, fibra, ácido fólico, tiamina, magnesio, potasio y zinc (De Mejía y col., 2003). Otras sustancias fitoquímicas están presentes en los frijoles, tales como: fitoestrógenos, taninos y aminoácidos azufrados (Rodríguez-Castillo y Fernández-Rojas, 2003).

Cuadro 6. Componentes del frijol común.

Componente	Contenido
Proteína ¹ (% base seca)	16-33
Características nutricias del frijol cocido	
PER ²	0.9-1.7
Valor biológico (%)	77-92
Digestibilidad de la proteína (%)	77-92
Metionina+cisteína (g/100b proteína)	2.24-2.53
Lisina (g/100g proteína)	8.7
Fibra dietética (% en base seca)	14-19
Frijol crudo	
Fibra insoluble	0.1-13.1
Fibra soluble	3.3-7.6
Frijol cocido	
Fibra insoluble	13.4-22.9
Fibra soluble	3.1-7.6
Ácidos grasos (g/100g)	
Linoléico	21-28
Linolénico	37-54
Vitaminas (mg/100g)	
Ácido fólico	0.17-0.59
Niacina	1.16-2.68
Riboflavina	0.14-0.27
Tiamina	0.9-1.2
Oligosacáridos (g/100g)	
Rafinosa	0.19-0.22
Estaquiosa	1.84-2.45
Acido fítico	22-28
Taninos	9.6-131.4
Inhibidores de tripsina	13-29

¹N x 6.25

²PER. Grado de eficiencia proteica

(Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998)

El frijol es uno de los cultivos de mayor importancia en el país, ya que representa una fuente importante de ocupación e ingreso. El 68% de su producción se destina en forma directa al autoconsumo. Esta leguminosa se cultiva en todas las regiones del país bajo todas las condiciones de suelo y clima. Durante la primavera-verano se siembra la mayor superficie; Zacatecas, Durango, Chihuahua, San Luis Potosí y Guanajuato siendo los principales Estados

productores con aproximadamente el 77% de la superficie y el 75% de la producción. En el ciclo otoño-invierno se siembra menor superficie pero con mayor rendimiento destacando como productores los estados de Sinaloa y Nayarit. De acuerdo a las cifras del cierre preliminar de cosechas del ciclo otoño-invierno 1999-2000, la producción obtenida fue de 255 mil 806 toneladas (FIRA, 2005; SAGARPA, 2003). El consumo per cápita anual para la población mexicana se ha establecido en un 11% para el año 2003 (SAGARPA, 2003).

En México se han identificado más de 67 especies, de las cuales sólo se han domesticado cuatro: *Phaseolus vulgaris*, *P. coccinus*, *P. lunatus* y *P. acutifolius*. Existen diferentes clases de frijol y su valor comercial es influenciado por características de tamaño, color y uniformidad del grano, además del tiempo de cocción, sabor y espesor del caldo (Pérez y col., 2002).

II.12 Compuestos nutraceuticos del frijol y cáncer de colon

Como ya se mencionó, el frijol contiene varios componentes que tradicionalmente se han considerado como antinutrientes tal es el caso de inhibidores de tripsina, fitatos (inositol hexafosfato), oligosacáridos (rafinosa y estaquiosa) y saponinas (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998; Messina, 1999; Bennink y Rondini, 2002). Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que dichos compuestos pueden tener un efecto antimutagénico (Cardador-Martínez y col., 2002).

El frijol, al ser una buena fuente de varios fitoquímicos, se ha asociado a la disminución del riesgo de padecer cáncer de colon. En países de América Latina donde el consumo de esta leguminosa es alta, la incidencia de este tipo de cáncer es baja (Madar y col., 1993; Parra-Cabrera y Fernández-Ortega, 1994; Cardador-Martínez y col., 2002).

Varios estudios con animales han mostrado el efecto protector del frijol sobre el cáncer de colon. Los resultados de Hughes y col. (1997), muestran que ratas, a las que se les indujo cáncer con AOM y que se les incluyó frijol seco en su dieta, presentaron una baja incidencia y multiplicidad de adenomas y adenocarcinomas en colon e intestino delgado. Asimismo, Hangen y Bennink (2002), observaron que al alimentar ratas con frijol negro y azul cocido disminuía la incidencia total de tumores y adenocarcinomas.

Estudios previos realizados por el grupo de trabajo (Laboratorio de Bioquímica Molecular de la Universidad Autónoma de Querétaro), han mostrado el efecto protector de diferentes variedades de frijol cocido cultivadas en México, las cuales fueron adicionadas a la dieta de los animales tratados con un carcinógeno de colon, considerando el consumo per cápita de la población mexicana en el año 2000 (11 kg). Se observó que los animales tratados con las variedades pigmentadas, ayocote morado, ayocote negro y negro 8025, así como el Pinto Zapata tuvieron una menor aparición de tumores en colon y una menor incidencia en comparación con las otras variedades evaluadas (Figura 7).

La digestión de la fibra por bacterias colónicas produce ácidos grasos de cadena corta (acético y propiónico) que disminuyen el pH fecal y tienen un efecto protector en el intestino. Thorup y col. (1994) observaron una disminución en la formación de fosas crípticas aberrantes en tejido colónico de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de fibra, los resultados mostraron una relación inversa entre la duración de la dieta alta en fibra y el número de animales con criptas aberrantes, así como el número total de dichas criptas.

II.12.2 Acido fítico

El ácido fítico permite un aumento en la fermentación colónica y por lo tanto un incremento en la producción de butirato y otros ácidos grasos de cadena corta, promoviendo apoptosis. Su mecanismo puede estar relacionado con la expresión del gen *bcl-2* o el gen *bak*, el cual es un promotor de apoptosis. El ácido fítico puede además, disminuir el tiempo de tránsito colónico y por lo tanto alterar la mutagenicidad de los contenidos intestinales (Messina, 1999). Se ha sugerido que el butirato puede inducir apoptosis en el colon disminuyendo niveles de proteína Bcl-2 o induciendo la expresión de Bak (Messina, 1999; Jenab y Thompson, 2000).

II.12.3 Oligosacáridos

Los oligosacáridos en el fríjol se calculan en 25-50 mg/g. La estaquiosa y rafinosa pasan por el colon donde las bacterias los metabolizan formando grandes cantidades de dióxido de carbono, hidrógeno y algunas veces metano. Al parecer puede haber algunos efectos benéficos asociados con el consumo de oligosacáridos (Messina, 1999; Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998).

II.12.4 Polifenoles

Las plantas producen una variedad de metabolitos secundarios que contienen un grupo fenol. Estos compuestos son un grupo químico heterogéneo que incluye fenoles simples, flavonoides y sus glicósidos los cuales incluyen catequinas, proantocianinas, antocianinas flavonoles y taninos condensados. Estos compuestos proveen mucho del sabor, color y textura. La ingesta de taninos en la dieta occidental se ha reportado de 23 mg por día (Johnson, 2001). La ingesta diaria de compuestos fenólicos puede ser hasta de 1 g al día, pero la cantidad de flavonoides en la dieta probablemente no contiene más que 10 mg al día (Johnson, 2001).

Los flavonoides son sustancias también presentes en el frijol. Estos compuestos son antioxidantes muy efectivos y pueden tener efectos anticarcinógenos en el intestino. Además de actuar como antioxidantes intraluminales, pueden inducir enzimas de fase II, suprimir la producción de prostaglandinas con actividad biológica, inhibiendo la cascada del ácido araquidónico e inhibiendo la mitosis al inhibir las cinasas de proteína intracelulares (Johnson, 2001).

Se ha demostrado que la actividad antioxidante del frijol depende de la coloración de la cascarilla, ya que el frijol rojo y negro tienen una buena actividad antioxidante. Se han identificado las antocianinas malvidina 3-glucósido (38%), petunidina 3-glucósido (26%), delfinidina 3-glucósido (56%) en frijoles negros, encontrando en ésta variedad 213 ± 2 mg/100 g (Takeoka y col., 1997).

Los taninos, los cuales representan aproximadamente el 2% en el frijol (expresado en equivalentes de catequina y ácido tánico), se encuentran principalmente en la cascarilla de la semilla (Shahidi y Naczki, 1995). Los taninos en el frijol son polímeros lineales de 3-flavanol (catequina y galocatequina) y 4-

flavandiol como leucodianidina y leucodefinidina (Shahidi y Naczk, 1995; De Mejía y col., 2003, Aparicio-Fernández y col., 2005). Aparicio-Fernández y col. (2005), realizaron la caracterización de los compuestos fenólicos en diferentes fracciones metanólicas presentes en la cascarilla de frijol Negro Jamapa. Encontrando proantocianidinas, antocianinas y flavonoles, especialmente en la fracción 9-12 (Silica Gel), donde obtuvieron los compuestos kaempferol, quercetina y miricetina, siendo éste último detectado por primera vez en frijol. A estos compuestos se les ha comprobado una gran capacidad antioxidante y antimutagénica inducida por benzo-a-pireno y 1-nitropireno, los cuales son agentes premutagénico y mutagénico respectivamente (Cardador-Martínez y col., 2002).

Por otro lado se he reportado que el procesamiento como la cocción afecta la concentración de taninos (Cuadro 7 y Cuadro 8) (Shahidi y Naczk, 1995).

Cuadro 7. Contenido de taninos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de diferentes colores

Muestra	Color cascarilla	Semilla entera	Cotiledónea	Cascarilla	Semillas enteras cocidas
NEPI mutante	Blanco	3.8	3.8	1.3	1.8
Normal	Blanco	3.9	4.5	1.3	2.1
Normal	Rojo	9.3	5.0	38.0	4.1
Normal	Negro	9.2	4.6	42.0	4.7
San Fernando	Negro	6.7	5.9	43.0	5.8

(Shahidi y Naczk, 1995)

Cuadro 8. Efectos de la cocción en la distribución de taninos en frijol *Phaseolus*

Fracción cocida	Frijol blanco g/500g	Frijol blanco [%]	Frijol negro g/500g	Frijol negro [%]	Frijol rojo g/500g	Frijol rojo [%]
Semilla cruda	1.80	100.0	4.50	100.0	7.35	100.0
Semilla cocida	1.20	66.7	2.72	60.4	2.75	37.4
Agua de cocción	0.28	15.5	0.86	19.1	6.86	11.4
Pérdida o unión	0.32	17.6	0.92	20.5	3.74	50.9

Frijol cocido durante 4 horas en una relación frijol:agua 1:3.

(Shahidi y Naczk, 1995)

La cascarilla de frijol *Phaseolus vulgaris* cv. FM38 contiene grandes cantidades de compuestos fenólicos, los cuales muestran actividad antimutagénica contra aflatoxina B₁ en el ensayo de microsuspensión, utilizando *S. typhimurium* (Cardador-Martínez y col., 2002).

Debido a que se ha encontrado una correlación entre el consumo de frijol y la disminución en la incidencia de cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley, principalmente con los frijoles negros y morados que tienen una mayor concentración de compuestos fenólicos, se estudió el efecto antioxidante de dichos frijoles en el hígado por ser el principal órgano donde se lleva a cabo la detoxificación del organismo, así como en el colon que fue el órgano blanco de protección. Las concentraciones utilizadas están basadas en el consumo de la población mexicana, por lo que se probaron el consumo per cápita del año 2000 (23 kg/año), 2003 (11 kg/año) y un consumo considerado como rural (146 kg/año). Se sabe además que los compuestos fenólicos encontrados en la dieta, pudieran tener el efecto de activar la muerte celular programada en células con cáncer, por lo que además se evaluó el mecanismo de apoptosis *in vitro* inducido por la adición de extractos metanólicos en células transformadas de cáncer de colon.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general

Evaluar el efecto quimioprotector *in vitro* e *in vivo* de diferentes variedades de harinas y extractos de frijol cocido.

III.2 Objetivos específicos

- Cuantificar la actividad de las enzimas glutatión-S-transferasa y quinona reductasa en hígado y colon distal de animales tratados con diferentes variedades de harinas de frijol cocido durante 5 días y 14 semanas de tratamiento.
- Evaluar el efecto de extractos metanólicos de las harinas de frijol Pinto Zapata y Negro 80-25 sobre la sobrevivencia y proliferación de células de cáncer de colon CaCo2.
- Determinar indicadores de apoptosis, tales como la expresión de Bax y Caspasa 3, así como la fragmentación del ADN en los tratamientos con frijol que muestren una disminución de la proliferación celular.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Material Biológico

Ratas machos Sprague-Dawley de cuatro semanas de edad adquiridas en el bioterio de Harlan México S.A de C.V.

Células de cáncer de colon CaCo-2 del laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ.

Frijol Negro 80-25, Pinto Zapata y Blanco Tlaxcala cosecha 2001 proporcionada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

IV.2 Compuestos químicos

Los reactivos para la electroforesis en geles de poliacrilamida y extracción de proteínas: acrilamida, bisacrilamida, tris, SDS, persulfato de amonio, mercaptoetanol, azul de coomasie, glicina, temed y el marcador de peso molecular, EDTA fueron de la marca Biorad. El kit de quimioluminiscencia y la solución bloqueadora fueron de la marca Roche. El glicerol fue de la marca promega; la tricina, Hepes, ortovanadato de sodio, PMSF, leupeptina, el reactivo Folin-Ciocalteus y la estaurosporina de la marca Sigma. El tween 20 de la marca Hycel de México. El Nonidet P 40 de la marca Fluka. El NaCl, la sacarosa, Tris-HCl, MgCl₂, KCl, de la marca J.T. Baker. Los primeros anticuerpos fueron de la marca Santa Cruz, los segundos anticuerpos de la marca Zymed. Las películas y las soluciones de revelado y fijado fueron de la marca Kodak.

Los reactivos para la determinación de la enzima glutatión-S-transferasa; glutatión, CDNB y el sulfurofano fueron de la marca Sigma. Para la quinona reductasa: la menadiona, FAD, NADPH, glucosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y dicumarol fueron de la marca Sigma. El acetonitrilo fue de la marca Caledon. El kit para la cuantificación de proteínas fue de la marca Pierce. Se utilizaron placas de la marca Corning.

Los reactivos para la extracción metanólica de las harinas de frijol cocido: hexano-acetona, metanol fueron de la marca J.T. Baker.

Los reactivos para cultivo celular: el medio de cultivo fue de la marca Gibco. El Suero fetal bovino (SFB), Hepes y Piruvato de sodio, la albúmina sérica bovina (ASB) y el DMSO fueron de la marca sigma.

IV.3 Efecto del frijol sobre la inducción de enzimas antioxidantes

IV.3.1 Preparación de las harinas de frijol cocido

Se pesó el frijol (5.5 kg – 6 kg) y se lavó. En una olla con aislamiento térmico, el frijol se coció en una relación aproximada de 1:2 (w/v) en agua a $90^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se dejó reposar 2 horas y se extendió sobre charolas de aluminio para secarlo en un horno de vacío a 40°C durante 24 horas. Seco el frijol, fue molido en un pulvex. Una vez obtenidas las harinas, éstas fueron almacenadas en refrigeración.

IV.3.2 Preparación del alimento con las harinas de frijol

El alimento para las ratas marca Harlan, fue molido en un pulvex; ya molido, se le adicionó y se mezclaron las harinas de frijol de acuerdo a las concentraciones a evaluar.

IV.3.3 Tratamiento in vivo con harinas de frijol cocido

Para esta parte se realizaron dos experimentos independientes. Para el primer experimento, se usaron ratas macho Sprague-Dawley de cinco semanas de edad con un peso de entre 160-180 g se mantuvieron con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y temperatura de 25 °C. Después de cinco días de aclimatación los animales se dividieron en once grupos como se muestra en el Cuadro 9. Durante la fase experimental, a cada grupo se les proporcionó agua *ad limitum* y el alimento adicionado con las diferentes harinas de frijol cocido de acuerdo a la dosis correspondiente para cada grupo experimental.

El frijol se adicionó a la dieta considerando el consumo per cápita anual en México en el año 2003, el cual fue de 11 kg. Además se incluyeron 23 kg y 146 kg/año, que se refieren al consumo de la población mexicana durante el año 2000 y de poblaciones rurales, respectivamente. Estas dosis se extrapolaron al consumo de alimento del animal, las cuales fueron de 0.4, 0.9 y 5.8 % respectivamente, considerando un consumo de 30 g de alimento diarios por animal.

El grupo considerado como control positivo se le administró vía intragástrica el compuesto sulfurofano a una concentración de 500 $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{día}$, el cual fue disuelto en aceite de maíz. Dicho compuesto fue administrado a los animales

durante 5 días de tratamiento (Matusheski y Jeffery, 2001). El grupo considerado como control negativo sólo consumió alimento molido para roedores.

Cuadro 9. Grupos experimentales de ratas alimentadas durante 5 días con diferentes variedades de harinas de frijol

Grupo	N	Tratamiento	Dosis
1	4	Dieta control negativo	0.0 %
2	4	Dieta control positivo	0.0 %
3	4	Negro 80-25	0.4 %
4	4	Pinto Zapata	0.4 %
5	4	Blanco Tlaxcala	0.4 %
6	4	Negro 80-25	0.9 %
7	4	Pinto Zapata	0.9 %
8	4	Blanco Tlaxcala	0.9 %
9	4	Negro 80-25	5.8 %
10	4	Pinto Zapata	5.8 %
11	4	Blanco Tlaxcala	5.8 %

Con el objeto de evaluar el efecto de las variedades de frijol Pinto Zapata y Negro 80-25 a largo plazo, se realizó un segundo experimento, en donde a ratas macho Sprague-Dawley fueron alimentadas durante 14 semanas con las harinas de frijol cocido de las variedades antes mencionadas; los animales fueron divididos en 3 grupos como se indica en el Cuadro 10. La dosis de frijol para este experimento fue el consumo per cápita de la población para el año 2003 (11 kg/año).

Cuadro 10. Grupos experimentales de ratas alimentadas durante 14 semanas con diferentes variedades de harinas de frijol

Grupo	n	Tratamiento	Dosis
1	4	Dieta control	0.0 %
2	4	Pinto Zapata	0.4 %
3	4	Negro 80-25	0.4 %

IV.4 Sacrificio

Al final del tratamiento (5 días y 14 semanas, respectivamente), los animales fueron sacrificados mediante decapitación y se extrajeron hígado y colon. Como se mencionó anteriormente, el hígado es el órgano principal de detoxificación de carcinógenos del organismo y el colon por haberse observado una disminución del número de tumores en animales alimentados con estas variedades. Éste último fue dividido en tres partes (proximal, medio y distal). Todas las muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C para su posterior análisis.

IV.5 Procesamiento de muestras

IV.5.1 Extractos citosólicos

Los tejidos fueron descongelados. Se tomaron 500 mg de tejido, las muestras de hígado y colon distal fueron colocadas en tubos cónicos en donde se les adicionó cuatro volúmenes de buffer Tris/Sacarosa pH 7.0 (Apéndice 1). Posteriormente, las muestras fueron homogeneizadas con un politrón (Kinemática, Suiza) hasta que no fuera visible algún grumo de tejido. Los homogenizados se centrifugaron por 15 minutos a 10,000 x g en una centrífuga Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik, Alemania) a 4 °C. Al término, el sobrenadante fue removido

con la ayuda de una pipeta pasteur y transferirlo en tubos, los cuales fueron centrifugados por una hora a 100,000 x g a 4 °C en una ultracentrífuga Beckman Optima L-90K (Beckman, EUA). La fracción microsomal se encontró en la pastilla y el citosol se removió con la ayuda de una pipeta pasteur. Los extractos citosólicos se almacenaron en tubos eppendorf a -70 °C hasta su análisis.

IV.5.2 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas de los extractos citosólicos, se realizó por el método BCA (ácido bicinconínico), utilizando albúmina bovina como estándar (Pierce). Se realizó una dilución 1:40 y 1:20 para hígado y colon distal respectivamente de los extractos citosólicos en buffer de fosfatos. Posteriormente se colocaron 50 µl de la dilución en placas de 96 pozos (Corning). Se agregaron 250 µl en cada pozo de la solución de trabajo. Se dejó incubar durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se leyó en el lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Microplate Reader (Molecular Devices Co. Sunnyvale, EUA) a una longitud de onda de 562 nm, y los resultados fueron analizados con el software SoftMax Pro Ver. 4.7.1 (Molecular Devices Co. Sunnyvale, EUA).

IV.5.3 Determinación de Glutación-S-Transferasa: CDNB

Este método se basa en que la reacción catalizada por esta enzima entre GSH (Glutación reducido) y el sustrato de GST CDNB (1-cloro,-2,4-dinitrobenceno), el cual tiene un amplio rango para detectar las diferentes isoenzimas (alfa, mu, pi y otras isoformas de GST). GST cataliza la formación de CDNB-GSH, el cual puede ser detectado por espectrofotometría a 340 nm. Una

unidad de GST es definida como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de CDNB-GSH conjugado por minuto.

Para evaluar la actividad enzimática, se realizaron diluciones de los extractos citosólicos en buffer de fosfatos 1 M pH 6.5 (Apéndice 2). Se colocaron 50 μ l de la dilución de los extractos citosólicos en placas de 96 pozos marca Corning. Posteriormente se adicionó 100 μ l de buffer GSH y 150 μ l de buffer CDNB (Apéndice 2). Finalmente se corrió la reacción por 2 minutos a una temperatura de 25 °C a 340 nm en el lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Microplate Reader (Molecular Devices Co. Sunnyvale, EUA), obteniéndose lecturas cada 20 segundos. Los resultados fueron analizados con el software SoftMax Pro Ver. 4.7.1 (Molecular Devices Co. Sunnyvale, EUA).

La actividad de GST fue expresada en nmol de producto formado, por proteína por minuto, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$nmol / mg \cdot min = \frac{\Delta(abs \text{ min} 2 - abs \text{ min} 1)}{(mg \text{ proteína}) (0.0096)}$$

Donde abs min2: es la absorbancia a 345 nm al minuto 2 de la muestra

abs min 1: es la absorbancia a 345 nm al minuto 1 de la muestra

mg proteína: son los mg de proteína en la dilución del extracto citosólico

0.0096: el coeficiente de extinción.

IV.5.4 Determinación de Quinona Reductasa

La formación de 6-fosfogluconolactona mediante la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, genera poder reductor (NADPH), donde la QR reduce al MTT, dicha reducción puede ser detectada por espectrofotometría a 610 nm.

En cada pozo de una placa (Corning, Nueva York, EUA) se colocaron 50 μ l, correspondientes a 10-40 μ g de proteína de la dilución del extracto citosólico en buffer Tris/HCl 0.025 M pH 7.4 (Apéndice 3). Se adicionaron los cofactores flavin-adenina dinucleótido (FAD), nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato (NADP), glucosa 6-fosfato (G6P), glucosa 6-fosfato deshidrogenada (G6PD) y metil tetrazolium (MTT) a 15 ml del buffer de ensayo. Se agregó 15 μ l de menadiona diluida en acetonitrilo en una concentración 1:1000 inmediatamente antes de la lectura y se colocaron 200 μ l en cada pozo. La reacción se detuvo a los 5 minutos con 50 μ l de buffer de Tris-HCl 0.025 M pH 7.4 el cual contenía dicumarol preparado en NaOH 1 N. Finalmente se leyó la placa en el lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Microplate Reader (Molecular Devices Co. Sunnyvale, EUA) a una longitud de onda de 610 nm. Se hizo el análisis de los datos con el software SoftMax Pro Ver. 4.7.1 (Molecular Devices Co. Sunnyvale, EUA) y se realizaron los cálculos correspondientes empleando la siguiente fórmula y expresando el resultado en nmol por proteína.

$$\text{nmol} / \text{mg} \bullet \text{min} = \frac{A_{610}}{(\text{mg proteína}) (0.1833)}$$

Donde A: es la absorbancia de la muestra a 610 nm

mg proteína: son los mg de proteína en la muestra

0.1833: es el coeficiente de extinción a los cinco minutos.

IV.6 Extracción de la fracción metanólica de las harinas de frijol cocido

Se pesaron 100 g de las harinas de frijol cocido de las variedades Pinto Zapata y Negro 80-25 y se empaquetaron en papel filtro whatman. Se hizo una primera extracción con hexano-acetona (1:1) ambos grado reactivo hasta la extracción completa de los aceites esenciales (aproximadamente 24 horas). Posteriormente, se hizo la extracción con metanol grado reactivo. Finalmente se realizó una extracción con agua destilada. Todas las extracciones se realizaron en el aparato Soxhlet y posteriormente fueron concentradas a sequedad en un rotaevaporador Büchi Watherbath B-480 y Büchi Rotavapor R 114 (Büchi Labortechnik AG, Flawi, Suiza) acoplado a una bomba de alto vacío Equatherm (Curtin Matherson Scientific, Inc, Houston, EUA). Los extractos fueron refrigerados a 4 °C hasta su uso.

IV.6.1 Cuantificación de polifenoles

El contenido de polifenoles totales de los extractos metanólicos obtenidos de las harinas de frijol cocido de las variedades Negro 80-25 y Pinto Zapata, fueron evaluados usando el método de la Vainillina. A 1 ml de extracto metanólico de frijol se le agregó 9 ml de metanol; posteriormente fueron centrifugados durante 20 minutos a 2500 rpm. Se tomó 1 ml de la solución centrifugada y se agregaron 5 ml de solución HCl 8 %: Vainillina 1 % recién preparada. Simultáneamente se

preparó un blanco con 5 ml de solución HCl 4 %. La mezcla se mantuvo durante 20 minutos a 30 °C e inmediatamente se leyó a una absorbancia de 500 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2S.

La concentración se calculó con base a una curva de calibración preparada con (+)catequina.

IV.7 Efecto de los extractos metanólicos de las harinas de frijol sobre la proliferación de células CaCo2

IV.7.1 Ensayo de Proliferación y supervivencia

Las células de cáncer de colon (CaCo2) se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), 200mM de piruvato, 5.7 g/L de HEPES. Las células se mantuvieron a 37 °C en atmósfera humidificada al 90 % aire y 10 % CO₂ en una incubadora FELISA con cámaras de gasificación manual.

Para los tratamientos con los extractos metanólicos de las diferentes variedades de harinas de frijol cocido, las células se sembraron en cajas de 24 pozos en DMEM, 10 % SFB, 200 mM de piruvato de sodio y HEPES (3 x 10⁴ células/pozo). A las 48 horas se eliminó el medio de cultivo y se cambiaron las condiciones agregando las diferentes concentraciones del extracto metanólico de frijol disuelto en DMEM al 1 % de albúmina sérica bovina (ASB). Las concentraciones que se probaron fueron desde 0.01 µg/ml hasta 1 mg/ml. Se incluyeron 6 pozos con DMEM al 1 % ASB, dos como control del experimento, dos como controles positivos, a los cuales se les adicionó tritón 100x y dos pozos

como control interno del experimento en condiciones óptimas de cultivo, a los cuales se les adicionó DMEM 10 % SFB.

Se contaron dos pozos que fueron considerados como el número de células al inicio del experimento o control inicial (Co). Cada prueba se hizo por duplicado.

A las 48 horas de tratamiento se eliminó el medio de cultivo de los pozos. Finalmente las células se cosecharon con tripsina 0.15 % y se contaron con un hemocitómetro cuatro veces. El porcentaje de proliferación y sobrevivencia se calculó de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\text{sobrevivencia} = \frac{\text{\# de células tratadas o control 1\% ASB}}{\text{\# de células iniciales (Co)}} \times 100\%$$

$$\text{proliferación} = \frac{\text{\# de células tratadas}}{\text{\# de células del control 1\% ASB}} \times 100\%$$

IV.7.2 Cuantificación de proteínas de extractos celulares

Se sembraron células (2×10^5 células/caja de 60 Mm.) en DMEM 10 % SFB y se permitió que llegaran al 80 % de confluencia para cambiar condiciones y agregar los extractos de cada variedad de frijol por separado de acuerdo a sus CL_{50} en DMEM 1 % ASB. A las 48 horas de tratamiento, les retiró el medio de cultivo, se tripsinizaron para despegarlas de la placa y se colocaron en un tubo para resuspenderlas y contarlas. Posteriormente se centrifugaron durante 5

minutos a 3000 rpm; a la pastilla se le adicionó 2 ml de medio para resuspenderlas; el volumen total se colocó en un tubo limpio para recentrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm y obtener las células. Las células se suspendieron en un buffer de lisis (Apéndice 4). Se rompieron haciéndolas pasar por la aguja de una jeringa 6 veces. Después de 30 minutos de mezclado a 4 °C, la mezcla se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante se colectó como el extracto celular. El contenido de proteína se determinó utilizando la técnica de Lowry (1951).

IV.7.3 Western Blot para detección de Caspasa-3 y Bax

Las proteínas (120 µg) se separaron en geles de poliacrilamida al 10 % (Apéndice 5) durante 180 minutos a voltaje constante (120 volts). Dichos geles se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a un voltaje constante de 15 volts por un tiempo de 10 minutos. La membrana se bloqueó con solución bloqueadora al 5 % preparada con solución de Tris-HCl y NaCl (TBS) (Apéndice 5) durante tres horas a temperatura ambiente sin agitación. Posteriormente se incubó la membrana por 3 horas con el primer anticuerpo específico para la proteína de interés a una concentración 1:1000 y 1:500 para Caspasa-3 y Bax, respectivamente, a temperatura ambiente con agitación constante en solución bloqueadora al 5 % en solución de Tris-HCl, NaCl y Tween 20 (TTBS) (Apéndice 5). A continuación, se realizaron 6 lavados de 5 minutos cada uno y 4 lavados de 10 minutos con solución TTBS; 2 lavados de 10 minutos con solución bloqueadora al 5% en TBS para ambas proteínas. Posteriormente la membrana se incubó con el segundo anticuerpo universal a una concentración 1:2000 y 1:5000 para Caspasa-3 y Bax respectivamente durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación continua. Se aplicaron 6 lavados de 5 minutos cada uno y 2 lavados de 10 minutos con solución TTBS para eliminar el segundo anticuerpo. Finalmente, se incubó la membrana con la solución sustrato del kit de

quimioluminiscencia BM Chemiluminéscence Blotting Substrate (POD) (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, EUA) en la oscuridad y se expuso 30 minutos a una película fotográfica Kodak BioMax Light Film Cat. 178 8207 (Eastman Kodak Company, Rochester, EUA) la cual posteriormente fue revelada y las bandas correspondientes a la proteínas Caspasa-3 y Bax fueron identificadas utilizando marcadores de peso molecular de la marca Biorad.

IV.7.4 Fragmentación de ADN

Se resuspendieron aproximadamente 1×10^6 células en 100 μ l de buffer de lisis (Apéndice 6). Se pusieron a digerir en un baño de agua a una temperatura de 50-55°C durante 7-18 horas, posteriormente se extrajo el ADN con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Apéndice 5) y se precipitó con etanol al 70% frío, se lavó con etanol al 95%, se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos y se disolvió en agua HPLC. El ADN de cada muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 60 V durante 45 minutos en buffer TAE (Tris-acetato). El ADN en los geles se visualizó con luz UV después de haber sido teñido con Bromuro de Etidio (0.5 mg/ml).

IV.8 Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos se llevó a cabo una comparación de medias utilizando la prueba de Dunnett ($p < 0.05$)

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

V.1 Actividad enzimática en ratas alimentadas durante 5 días con harinas de frijol cocido

V.1.1 Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa en hígado

En estudios preliminares se demostró que las harinas de frijol cocido Pinto Zapata y Negro 80-25 tuvieron la capacidad de disminuir la incidencia y multiplicidad de tumores en ratas tratadas con el carcinógeno DMH. Las enzimas de fase II son inducibles a tiempos cortos, por lo que se evaluó durante el proceso de prevención la inducción de éstas durante 5 días de tratamiento.

Una de las enzimas de fase II que se estudiaron en este trabajo fue la GST, la cual conjuga metabolitos de xenobióticos. En la Figura 8 se puede observar el efecto de diferentes concentraciones de las harinas de frijol cocido Blanco Tlaxcala, Pinto Zapata y Negro 80-25 en la actividad de la enzima GST en hígado de ratas Sprague-Dawley; tratadas durante cinco días con diferentes concentraciones de frijol. La actividad de dicha enzima no fue modificada ni por la variedad ni por la concentración de frijol al compararla con el control negativo.

Cabe mencionar que los animales tratados con la variedad Negro 80-25 mostraron un incremento en la actividad de esta enzima al aumentar la concentración de frijol en la dieta (424.28 ± 53.37 , 456.87 ± 80.85 y 507.4 ± 89.43 nmol/mg min para las concentraciones de 0.4, 0.9 y 5.8 % respectivamente), pero sin llegar a ser significativa.

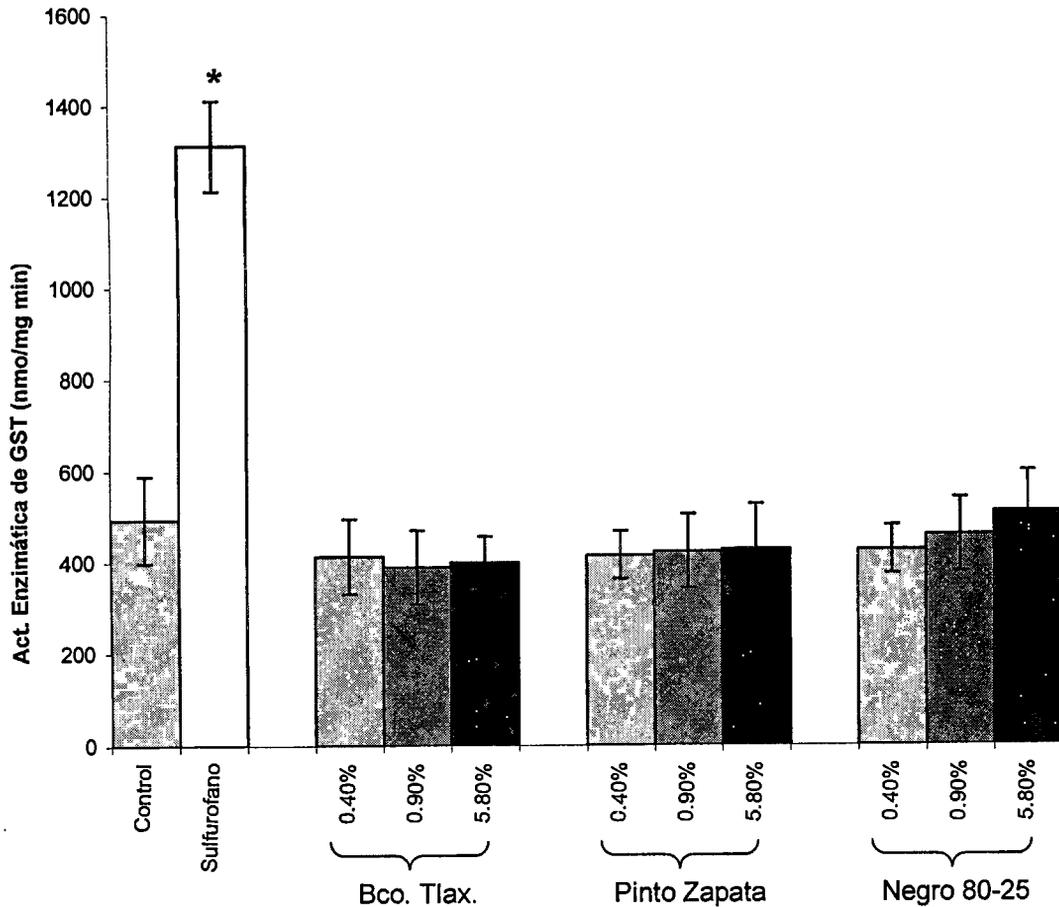


Figura 8. Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa en hígado de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 5 días con diferentes concentraciones y variedades de harinas de frijol cocido

* Indica diferencia estadística significativa con respecto al control de acuerdo a la prueba estadística de Dunnett ($\alpha= 0.05$). La gráfica representa la media de dos experimentos independientes con 4 repeticiones cada uno. Los animales fueron alimentados durante 5 días con las harinas de frijol cocido adicionadas a la dieta y sacrificados al final de este período.

El compuesto que se utilizó como control positivo (sulfurofano), a una concentración de 500 μM , tuvo la capacidad de inducir la actividad de GST hasta en un 265% (1311.98 ± 99.68 nmol/mg min) con respecto al control negativo (493.38 ± 95.9 nmol/mg min).

Una de las explicaciones por las cuales en este estudio no se observó un aumento en la actividad de GST fueron posiblemente las bajas concentraciones de compuestos fenólicos presentes en las dietas que consumieron los animales. En un estudio realizado por Appelt y Reicks (1999) donde evaluaron el efecto de los compuestos fenólicos daizeína y genisteína de la soya durante dos semanas de tratamiento, encontraron un aumento significativo de la actividad hepática de GST a dosis tres veces más alta que las que consumen la población.

V.1.2 Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa en colon distal

En un estudio llevado a cabo en el laboratorio de Bioquímica Molecular del Posgrado de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro se observó que la incorporación de harina cocida de frijoles pigmentados en la dieta de los animales tratados con el carcinógeno dimetilhidrazina, tuvo un mayor efecto protector sobre el desarrollo del cáncer de colon. Puesto que el colon fue el órgano blanco en dicho estudio, se decidió el evaluar la actividad enzimática de GST en este órgano.

En la Figura 9 se observa el efecto que tuvieron las diferentes variedades de harinas de frijol a las diferentes concentraciones estudiadas sobre la actividad enzimática de GST. Se encontró que las harinas de frijol Blanco Tlaxcala y Pinto Zapata a las diferentes concentraciones, no aumentan la actividad de esta enzima con respecto al control (80.13 ± 9.53 nmol/mg min). La variedad Negro 80-25, al adicionar a la dieta de los animales concentraciones de 0.4 y 0.9 %, (11 y 23 kg/año), no aumentaron la actividad de GST (65.57 ± 17.55 y 72.23 ± 18.54 nmol/mg min, respectivamente). Sin embargo, la dosis más alta (5.8 %), considerada como consumo rural, sí tuvo un aumento significativo en la actividad de GST en un 42% (113.99 ± 99.68 nmol/mg min) más con respecto al control.

Una vez más, el control positivo sulfurofano mostró un aumento significativo de hasta un 380% (384.013 ± 63.09 nmol/mg min) más con respecto al control negativo. Estos resultados indican que tanto en el hígado como en colon distal, el consumo actual de frijol en zonas urbanas no aumenta la actividad de esta enzima. Sin embargo, cabe señalar que el frijol Negro 80-25 a la concentración más alta (zonas rurales), sí tuvo un aumento significativo.

Estos resultados podrían sugerir que el mecanismo evaluado en esta sección, muy en específico la glutatión-S-transferasa y el consumo de 146 kg/año (5.8 %) de la variedad de frijol Negro 80-25, tienen un efecto protector sobre el cáncer de colon en la población rural únicamente.

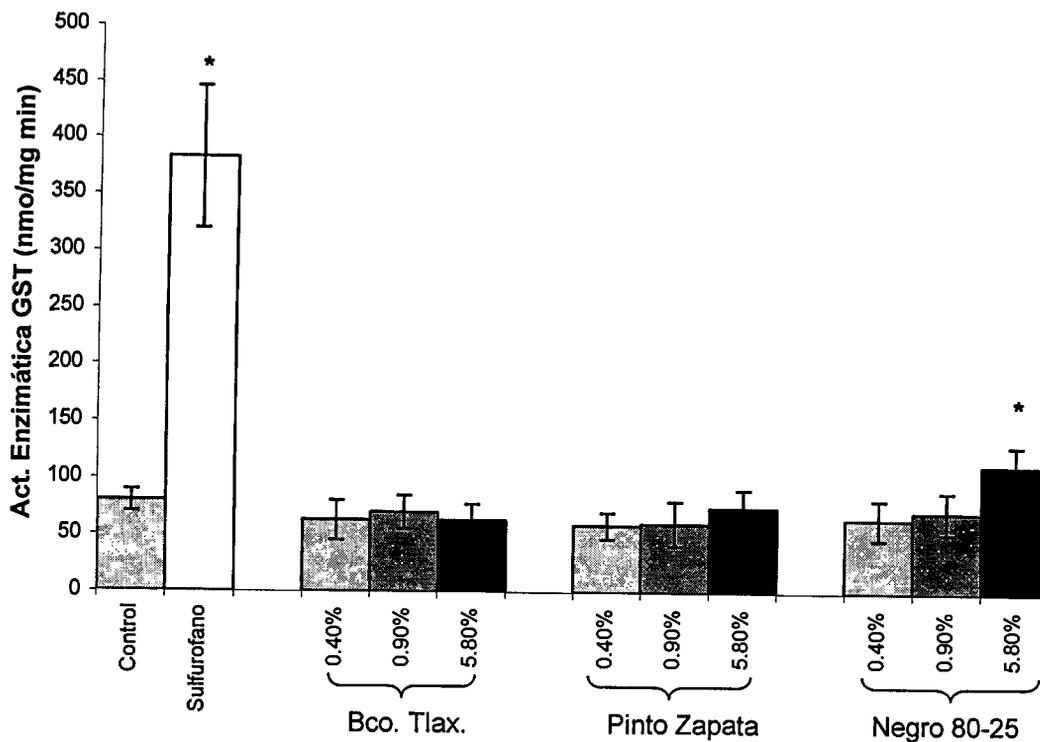


Figura 9. Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa en colon distal de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 5 días con diferentes concentraciones y variedades de harinas de frijol cocido

* Indica diferencia estadística significativa con respecto al control de acuerdo a la prueba estadística de Dunnett ($\alpha = 0.05$). La gráfica representa la media de dos experimentos independientes con 4 repeticiones cada uno. Los animales fueron alimentados durante 5 días con las harinas de frijol cocido adicionadas a la dieta y sacrificados al final de este período.

V.1.3 Actividad enzimática de quinona reductasa en hígado

La enzima quinona reductasa, es una enzima que reduce quinonas y mantiene el balance redox (Begleiter y col., 2003). En la Figura 10 se puede observar que a las dosis más altas de las tres variedades de harinas de frijol cocido (0.9 y 5.8 %), disminuye significativamente la actividad de esta enzima en el hígado de los animales tratados con respecto al control negativo (14.65 ± 2.71 nmol/mg min). Las actividades de QR fueron para Blanco Tlaxcala de 9.80 ± 2.06 y 9.80 ± 1.78 nmol/mg min para las concentraciones de 0.9 y 5.8 % respectivamente. Para Pinto Zapata, 8.65 ± 0.79 y 8.62 ± 1.23 nmol/mg min para 0.9 y 5.8 % respectivamente y para la variedad Negro 80-25 fueron de 12.86 ± 1.38 y 8.47 ± 0.81 nmol/mg min para 0.9 y 5.8 % respectivamente. El compuesto sulfurofano una vez más, aumentó la actividad de quinona reductasa de hasta un 140% (35.22 ± 2.42 nmol/mg min).

Los resultados presentados por las harinas de frijol fueron similares a los encontrados por Appelt y Reicks (1999), quienes reportaron que los compuestos de la soya no tuvieron un efecto significativo en la actividad de las enzimas GST y QR al alimentar a los animales durante dos semanas con dichos compuestos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para la concentración más baja utilizada para todas las variedades de frijol evaluadas.

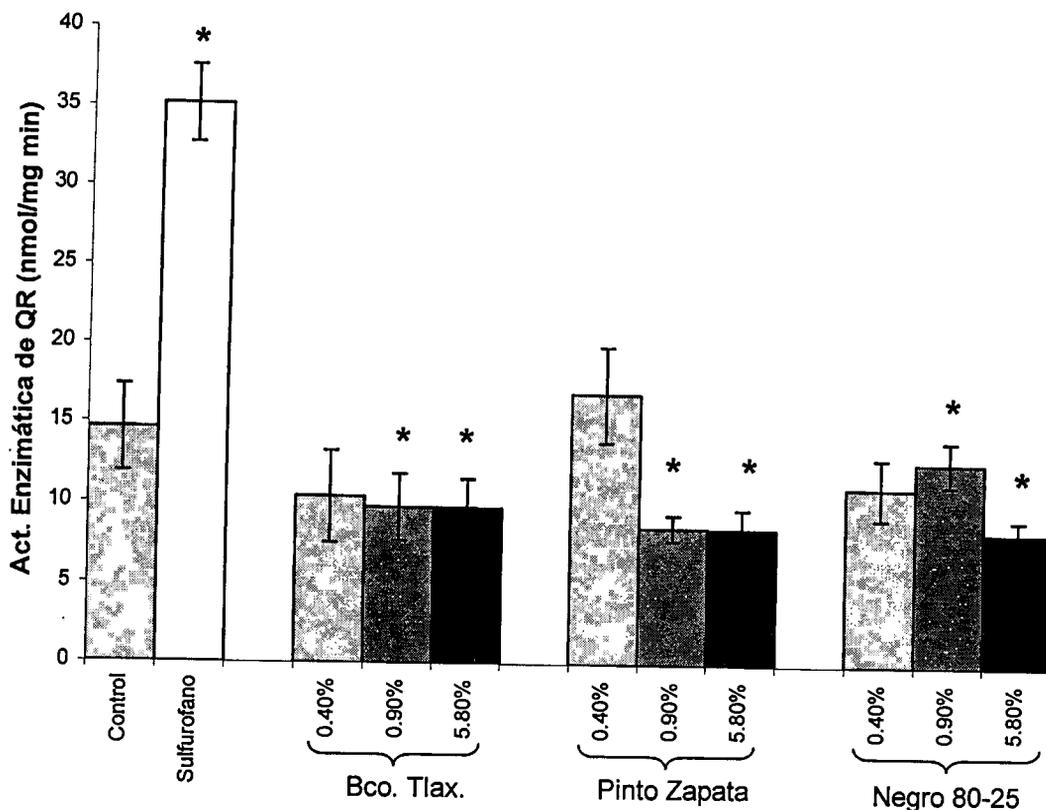


Figura 10. Actividad enzimática de quinona reductasa en hígado de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 5 días con diferentes concentraciones y variedades de harinas de frijol cocido

* Indica diferencia estadística significativa con respecto al control de acuerdo a la prueba estadística de Dunnett ($\alpha = 0.05$). La gráfica representa la media de dos experimentos independientes con 4 repeticiones cada uno. Los animales fueron alimentados durante 5 días con las harinas de frijol cocido adicionadas a la dieta y sacrificados al final de este período.

Por otro lado, Krajka-Kùzniak y Baer-Dubowska (2003) evaluaron el efecto de un compuesto fenólico, el ácido tánico, el cual al ser administrado a animales a diferentes concentraciones desde 0.5 mg hasta 2.0 mg disminuyó la actividad enzimática de quinona reductasa hasta en un 60% con respecto al control a medida que aumentaba la concentración de dicho compuesto, indicando un mecanismo suicida de la inhibición de la enzima, aunque aún no se conoce en detalle el mecanismo de inhibición. Los autores concluyen, además, que al administrar el compuesto fenólico se disminuye la actividad del citocromo

CYP2E1, la cual es una de las enzimas principales para la bioactivación de carcinógenos, por lo que esto tendría un efecto benéfico en la protección contra el cáncer.

En base a los resultados obtenidos con las harinas de frijol cocido, se sugiere que pudieran estar ejerciendo una acción similar a la anteriormente mencionada para el ácido tánico en relación a la enzima QR.

Como parte global del proyecto, se realizó la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos de las harinas de frijol, empleando varios estándares. Los resultados de este análisis muestra que el contenido de taninos presentes en las variedades de frijol evaluadas en este estudio fueron de 0.046 hasta 1.04 mg para frijol Pinto Zapata y Negro. Debido a que esta concentración es similar a la evaluada por Krajka-Kùzniak y Baer-Dubowska (2003), se sugiere que el frijol pudo tener un efecto similar al presentado por el ácido tánico, inhibiendo la actividad de QR en hígado.

Por otro lado, Helsby y col. (2002) al evaluar la actividad de quinona reductasa en ratas alimentadas con dietas adicionadas con 0, 10 y 20 % trigo, encontraron una disminución significativa en esta enzima, comparada con el grupo control. Los autores atribuyen esta disminución de la actividad al contenido de ácido fítico presente en las dietas. Este compuesto presenta capacidad quelante hacia algunos minerales, los cuales son necesarios para el mantenimiento endógeno de las enzimas de fase II. Por lo tanto una remoción de minerales conlleva a la regulación negativa de la esta actividad enzimática. Este mismo fenómeno pudiera estar ocurriendo en las dietas adicionadas con harinas de frijol, lo que explicaría esta disminución en la actividad.

V.1.4 Actividad enzimática de quinona reductasa en colon distal

En la Figura 11 se muestra la actividad de la quinona reductasa en el colon distal de los animales tratados durante 5 días con diferentes concentraciones y variedades de harinas de frijol cocido. Se pudo observar que la actividad de dicha enzima aumentó significativamente con respecto al control negativo (30.99 ± 5.83 nmol/mg min). En esta región del colon al alimentar a los animales con la concentración de 0.4 % de las variedades de frijol Blanco Tlaxcala y Pinto Zapata la actividad reduce de 42.04 ± 4.26 y 43.89 ± 4.41 nmol/mg min, respectivamente. Por el contrario, para estas mismas variedades, el aumento en la concentración hasta 0.9 % y 5.8 %, disminuyó la actividad de esta enzima (para Blanco Tlaxcala 35.88 ± 4.06 y 34.80 ± 3.15 nmol/mg min; para Pinto Zapata, 31.83 ± 5.66 y 29.72 ± 3.23 nmol/mg min). El sulfurofano usado como control positivo, aumentó significativamente hasta un 139% la actividad de quinona reductasa con respecto al control negativo (74.281 ± 4.16 nmol/mg min).

Aún cuando en el frijol Blanco Tlaxcala no se detectó la presencia de taninos, esta leguminosa contiene otros compuestos fenólicos que pudieran aumentar la actividad enzimática para las dosis más bajas probadas.

Cabe mencionar además que cuando en Pinto Zapata y Blanco Tlaxcala al aumentar la concentración de frijol en el alimento, disminuye la actividad, todo lo contrario ocurre con la variedad Negro 80-25, ya que al aumentar la concentración de 0.4 % a 0.9 %, aumenta la actividad de QR, aunque no estadísticamente significativa. Esto nos indica que los mecanismos de inducción de esta enzima son diferentes para la variedad Negro 80-25.

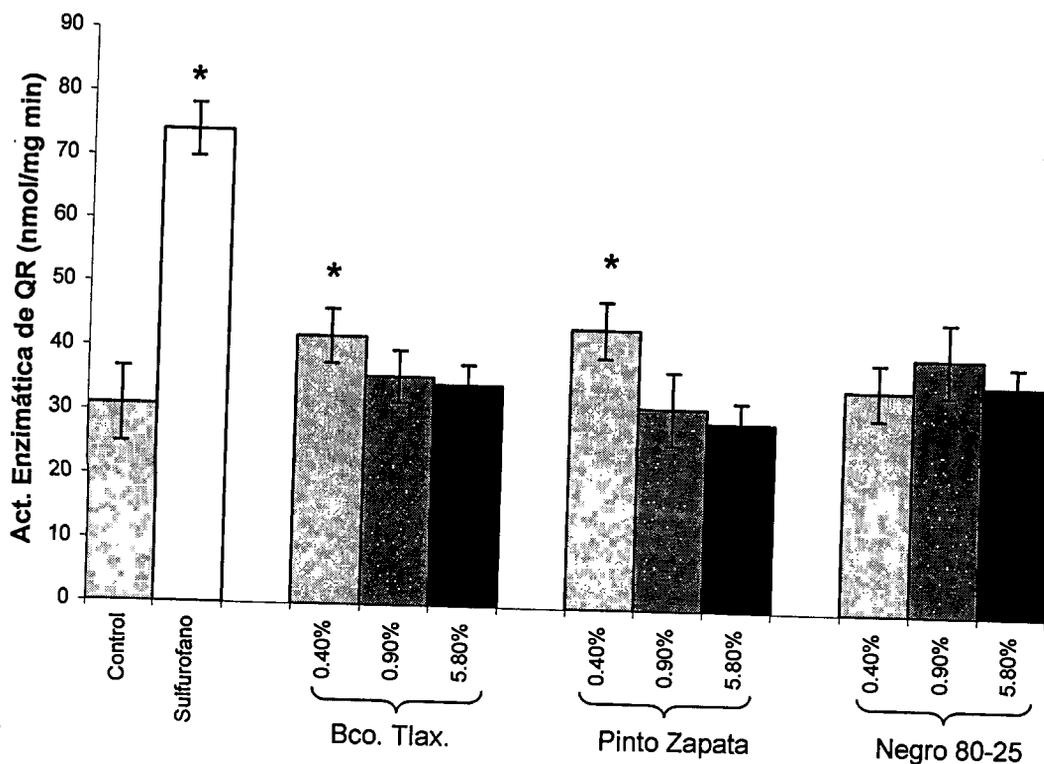


Figura 11. Actividad enzimática de quinona reductasa en colon distal de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 5 días con diferentes concentraciones y variedades de harinas de frijol cocido

* Indica diferencia estadística significativa con respecto al control de acuerdo a la prueba estadística de Dunnett ($\alpha = 0.05$). La gráfica representa la media de dos experimentos independientes con 4 repeticiones cada uno. Los animales fueron alimentados durante 5 días con las harinas de frijol cocido adicionadas a la dieta y sacrificados al final de este período.

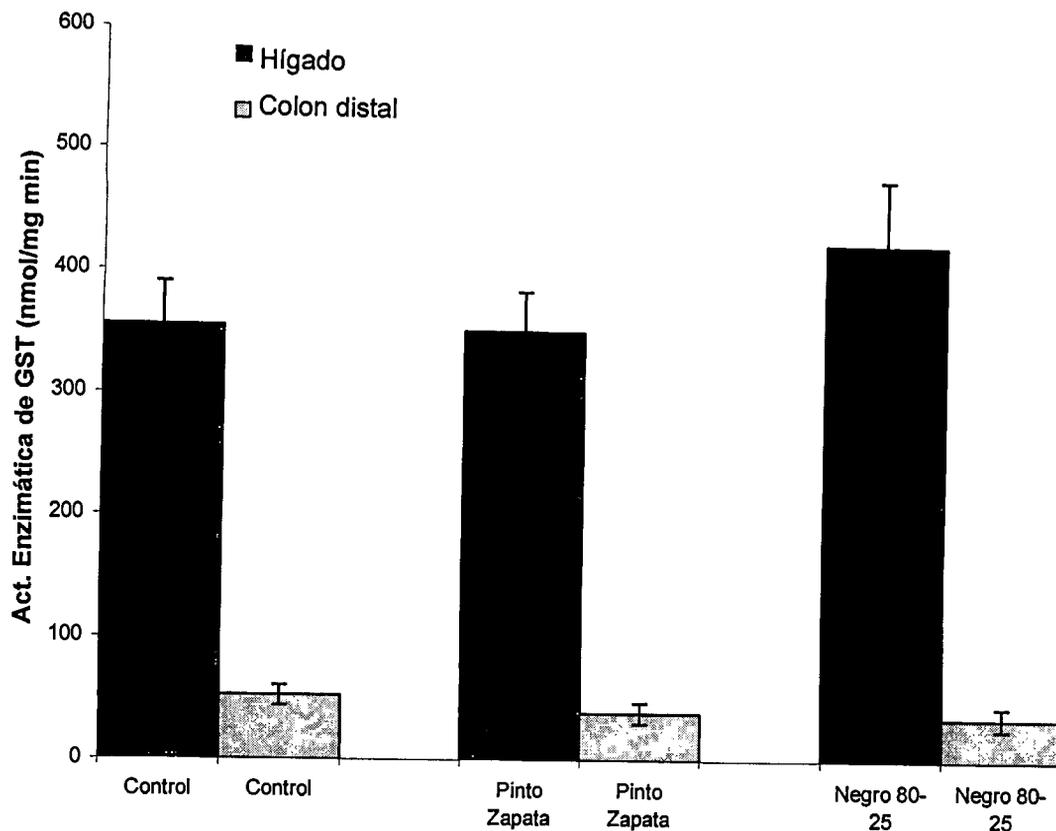


Figura 12. Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa en hígado y colon distal de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 14 semanas a una concentración de 0.4 % con diferentes variedades de harinas de frijol cocido

La gráfica es representa la media de dos experimentos independientes con 4 repeticiones cada uno. Los animales fueron alimentados durante 5 días con las harinas de frijol cocido adicionadas a la dieta y sacrificados al final de este período.

la protección contra carcinógenos, a excepción de GST en colon distal para la variedad Negro 80-25 a la dosis considerada como rural.

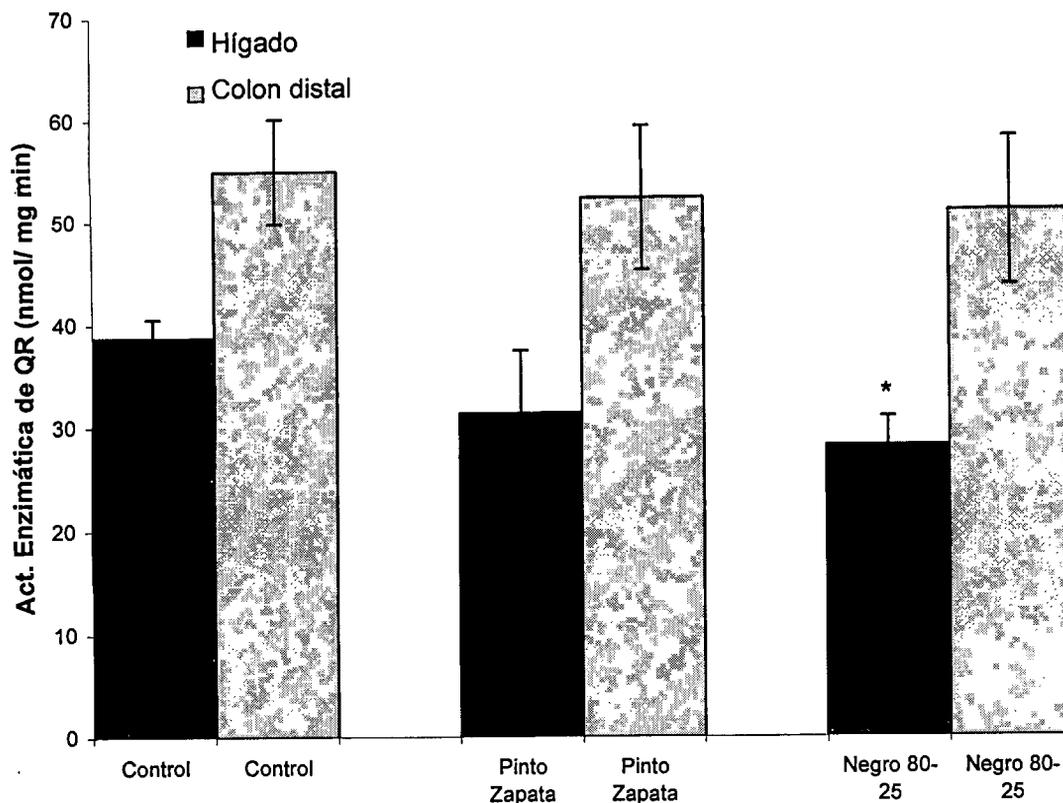


Figura 13. Actividad enzimática de quinona reductasa en hígado y colon distal en ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 14 semanas con una concentración de 0.4 % y con diferentes variedades de harinas de frijol cocido

* Indica diferencia estadística significativa con respecto al control con la prueba estadística de Dunnett ($\alpha= 0.05$). La gráfica representa la media de dos experimentos independientes con 4 repeticiones cada uno. Los animales fueron alimentados durante 5 días con las harinas de frijol cocido adicionadas a la dieta y sacrificados al final de este período.

V.3 Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos metanólicos de harinas de frijol cocido Negro 80-25 y Pinto Zapata

Debido a que uno de los principales fitoquímicos del frijol son los compuestos fenólicos, éstos fueron cuantificados en los extractos metanólicos obtenidos de las harinas de frijol cocido variedad Pinto Zapata y Negro 80-25. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 11. Estos resultados expresados en mg de (+)catequina indican que el extracto metanólico de la variedad Negro 80-25, contiene una mayor cantidad de compuestos fenólicos en comparación con el Pinto Zapata.

Cuadro 11. Compuestos fenólicos en extractos metanólicos de harinas de frijol cocido expresados en mg (+)catequina

Extracto metanólico	Mg(+)catequina/g extracto
Negro 80-25	38.55 ± 2.14
Pinto zapata	20.52 ± 3.40

Shahidi y Naczk (1995) sugieren que la cantidad y la composición de los compuestos fenólicos en diferentes variedades de frijol están relacionadas con el color de la cascarilla, ya que variedades blancas tienen un menor contenido y diversidad de compuestos fenólicos que las variedades más oscuras. Otro punto importante es la pérdida de compuestos fenólicos durante cualquier procesamiento al que se exponga la semilla del frijol. Cabe mencionar que los procesamientos de remojo, cocción y descascarillado, disminuyen hasta un 60% el contenido de compuestos fenólicos en la semilla. En el presente trabajo, la pérdida de estos compuestos durante procesamiento para la obtención de las harinas de frijol no se cuantificó. El frijol cocido fue secado con el agua de cocción para evitar pérdidas importantes.

Guzmán-Maldonado y col. (2005) realizaron la caracterización de los compuestos de interés fitoquímico de seis variedades de frijol común en México, entre los que se encontraban las variedades utilizadas en este estudio. Estos autores informaron que las variedades cocidas de Pinto Zapata y Negro 80-25 contienen 132.69 y 147.57 mg ácido gálico/100 g muestra respectivamente. En cuanto a taninos, 0.25 y 0.38 mg equivalentes de catequina/g de muestra y de antocianinas, 1.73 y 32.33 mg C3G (cianidin 3-glucósidos)/100 g muestra. Cabe señalar que tanto en los resultados de estos autores, como los obtenidos en el presente estudio, la variedad Negro 80-25 muestra un mayor contenido de todos los compuestos comparado con Pinto Zapata.

Aparicio-Fernández y col., (2005), caracterizaron los compuestos fenólicos presentes en frijol Negro Jamapa realizando fracciones del extracto metanólico de la cascarilla. Observaron que la fracción con mayor cantidad de compuestos fenólicos contenía proantocianidinas y antocianinas como delphinidina, petunidina y malvidina (4.1, 3.9 y 4.6 %, respectivamente); además de los flavonoles kaempferol, quercetina y miricetina (5.8, 4.1 y 6.7 %, respectivamente).

Beninger y col. (2005), evaluaron la composición de compuestos fenólicos presentes en frijol Pinto, las variedades estudiadas fueron Pintium CDC y 1533-15; éstos autores encontraron proantocianidinas, con catequina o epicatequina como unidades terminales, y (epi)afzelequina en menor cantidad; además encontraron flavonoles como kaempferol.

Aún no siendo las mismas variedades de frijol utilizadas en este experimento, pudiera ser que las variedades estudiadas tuvieran una composición de compuestos fenólicos similar a la evaluada por estos autores, lo que pudiera indicar los compuestos que estarían actuando en la prevención de distintas patologías y para nuestro caso, el cáncer.

V.4 Efecto de los extractos metanólicos de diferentes variedades de harinas de frijol cocido en células de cáncer de colon CaCo2

Para evaluar el efecto del frijol sobre etapas tardías de un desarrollo de cáncer, se utilizó un modelo de células ya transformadas provenientes de cáncer de colon humano.

Las concentraciones evaluadas de los extractos metanólicos de frijol fueron de 1, 0.01, 0.0001 y 0.00001 mg de extracto/ml de medio de cultivo; estas concentraciones fueron de acuerdo a lo reportado en la literatura. En las Figura 14 y 15 se observa el efecto de dichos extractos de la variedad Negro 80-25 y Pinto Zapata en las células CaCo2. Las dos concentraciones más altas probadas para ambas variedades (1 y 0.01 mg/ml) tuvieron un efecto significativo en el número de células. En base al Cuadro 12, se observa que la concentración más alta de los extractos metanólicos induce hasta un 85% y 80% de muerte celular por el frijol Negro 80-25 y Pinto Zapata, respectivamente. Además, se observa que el extracto del frijol Pinto Zapata a la concentración más baja, induce una inhibición de la proliferación celular en comparación con el extracto Negro 80-25, el cual no muestra ningún efecto a dicha dosis.

Salucci y col. (2002) evaluaron el efecto de epicatequina, ácido gálico, quercetina y epigallocatequina galato, sobre la viabilidad en CaCo2. Los resultados muestran una disminución considerable en este parámetro con el aumento en la concentración de dichos compuestos, mostrando un 20 a un 60% de citotoxicidad. Además estos autores evaluaron el efecto de estos compuestos en la progresión del ciclo celular y observaron que los compuestos evaluados interfieren en el ciclo celular de las células CaCo2; Compuestos que se han identificado en algunas variedades de frijol, lo que nos podría sugerir que pudieran tener un efecto similar en este tipo de células.

Estos resultados nos pudieran indicar que la inhibición de la proliferación de las células Caco2 pudiera ser debida a los compuestos que se encuentran en los extractos metanólicos evaluados.

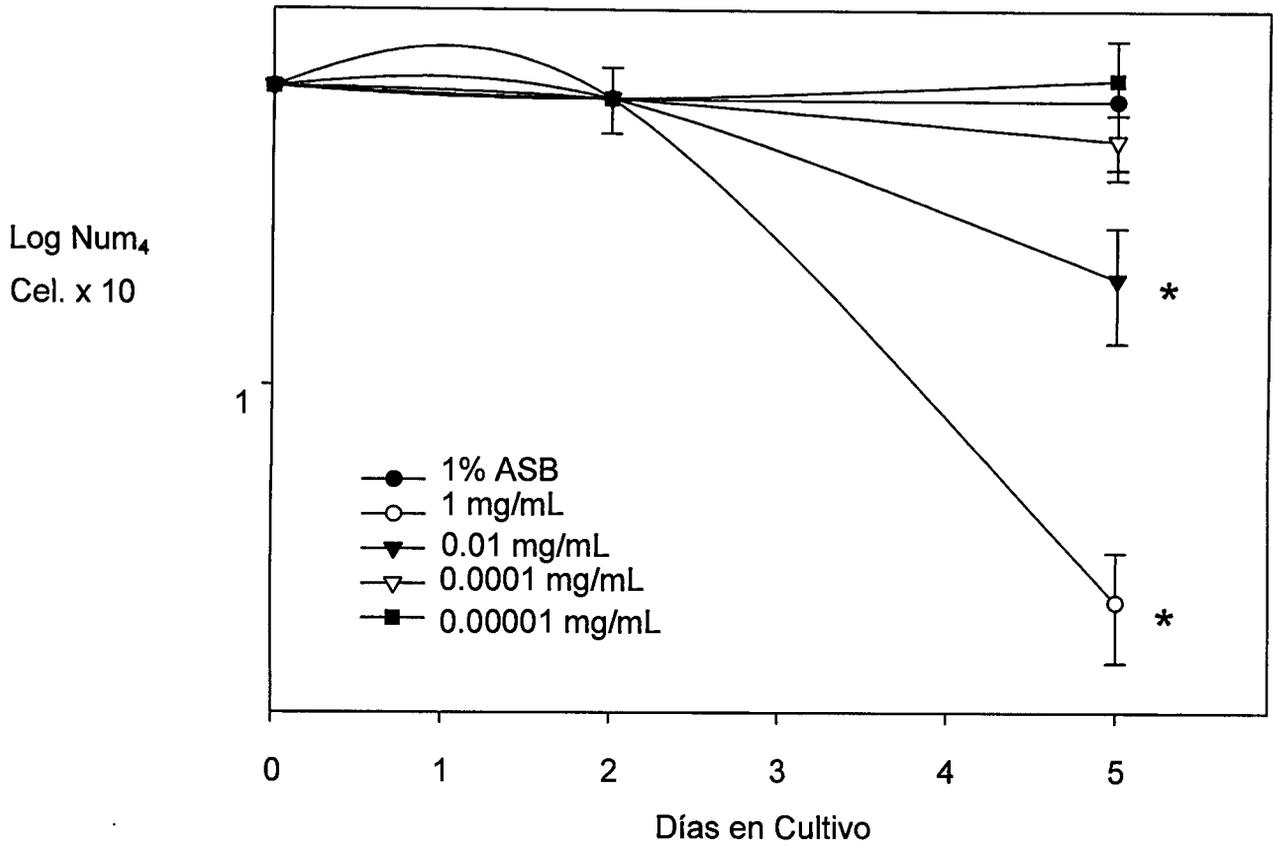


Figura 14. Efecto del extracto metanólico de la harina de frijol Negro 80-25 en células de cáncer de colon CaCo2.

* Indica diferencia estadística significativa con la prueba estadística de Dunnett ($\alpha= 0.05$).
ASB= albúmina sérica bovina.

Los datos son el promedio \pm la desviación estándar de por lo menos dos experimentos independientes. Las células se dejaron crecer hasta un 80% de confluencia y se adicionaron las diferentes concentraciones de la harina de frijol por un tiempo de 48 horas. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas y contadas.

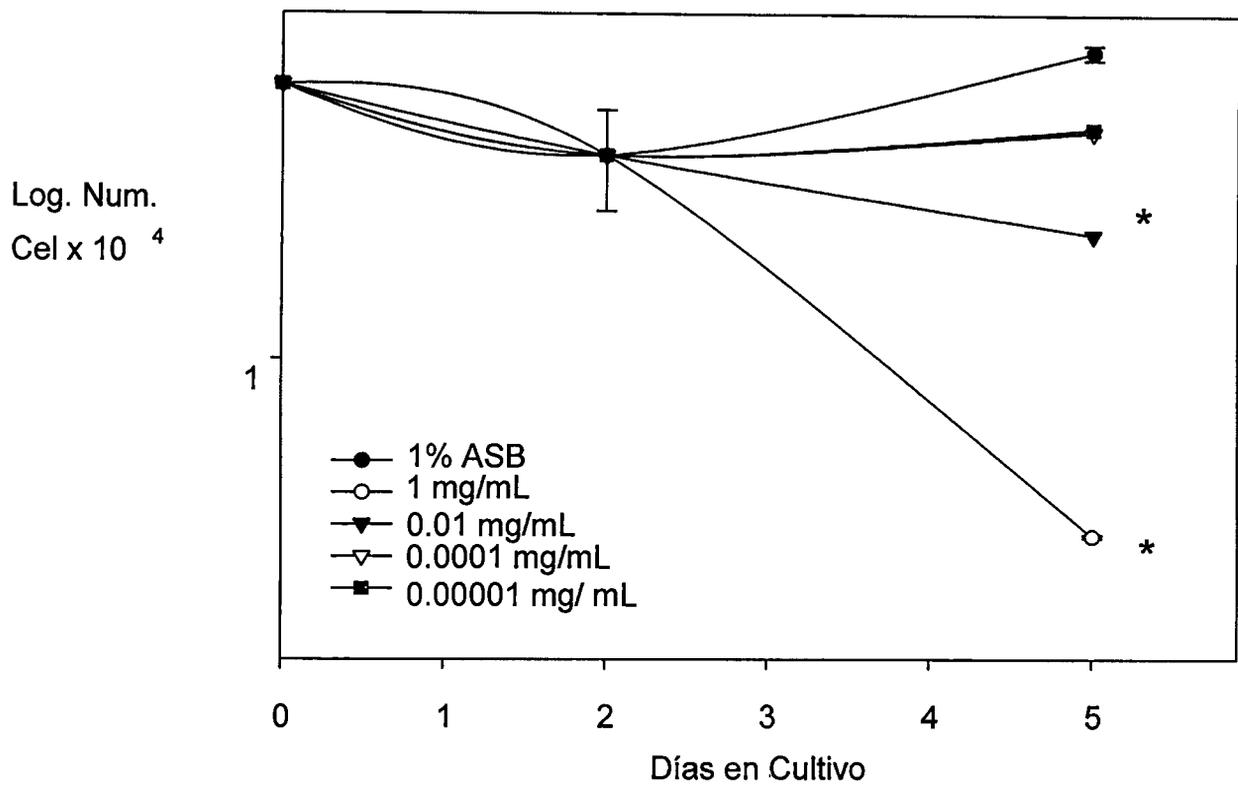


Figura 15. Efecto del extracto metanólico de la variedad Pinto Zapata en células de cáncer de colon CaCo2.

* Indica diferencia estadística significativa con la prueba estadística de Dunnett ($\alpha=0.05$).
 ASB= albúmina sérica bovina.
 Los datos son el promedio de \pm la desviación estándar de por lo menos dos experimentos independientes. Las células se dejaron crecer hasta un 80% de confluencia, se adicionaron las diferentes concentraciones de la harina de frijol por un tiempo de 48 horas. Posteriormente las células fueron tripsinizadas y contadas.

Cuadro 12. Efecto de los extractos metanólicos de las variedades de frijol Negro 80-25 y Pinto Zapata en la sobrevivencia y proliferación de células CaCo 2.

Extracto	Negro 80-25		Pinto Zapata	
	(%)		(%)	
	Sobrevivencia	Proliferación	Sobrevivencia	Proliferación
Control Inicial	100	NA	100	NA
1% ASB	100.5 ± 2.6	100	151.8 ± 4.5	100
0.00001 mg/ml	107.4 ± 0.0	107.9 ± 0.0	111.1 ± 0.6	75.9 ± 0.1**
0.0001 mg/ml	85.6 ± 8.6	86.1 ± 0.6**	110.1 ± 0.01	72.5 ± 0.5**
0.01 mg/ml	51.5 ± 10.9*	51.8 ± 11**	72.9 ± 0.01*	48.0 ± 0.01**
1 mg/ml	15.7 ± 3.2*	15.8 ± 3.2**	21.9 ± 0.1*	14.4 ± 0.1**

Los datos son el promedio ± desviación estándar de por lo menos dos experimentos independientes

*Indica diferencia estadística significativa con respecto al control inicial

**Indica diferencia estadística significativa con respecto a 1% ASB

ASB= albúmina sérica bovina.

NA no aplica para el experimento

Las células fueron cultivadas a un 80% de confluencia, se adicionaron los diferentes extractos metanólicos durante 48 horas, posteriormente fueron tripsinizadas y contadas.

De acuerdo a los resultados anteriores, se determinó la concentración letal media (CL₅₀) para las dos harinas de frijol estudiadas. La concentración necesaria para matar el 50% de las células con el extracto metanólico de la harina de frijol Pinto Zapata fue de 0.028 mg/ml, mientras que la CL₅₀ para la variedad Negro 80-25 fue de 0.009 mg/ml. Este resultado indica que Negro 80-25 es más citotóxico para las células CaCo2, ya que se necesita tres veces más la concentración de la variedad Negro 80-25 para lograr el mismo efecto en la variedad Pinto Zapata.

V.5 Expresión de Caspasa-3 en células de cáncer de colon CaCo2 tratadas con extractos metanólicos de harinas de frijol cocido Pinto Zapata y Negro 80-25

Uno de los mecanismos por los cuales se cree que los extractos metanólicos de las harinas de frijol cocido estén actuando sobre las células de cáncer de colon Caco2, es mediante la inducción de apoptosis. Dentro de las proteínas más importantes involucradas en este proceso está Caspasa-3 (30 kDa). En la Figura 16 se puede observar la expresión de la proteína Caspasa-3 en células control positivo, las cuales fueron tratadas con estaurosporina, un compuesto inductor de apoptosis, se incrementó ligeramente la expresión de dicha enzima comparada contra el control negativo. Cuando las células fueron tratadas con extractos de frijol Pinto Zapata se presentó una expresión de la proteína Caspasa-3 muy similar al control negativo, indicando con ello que a las 48 horas de tratamiento, no se induce el mecanismo de apoptosis, por lo menos no por la vía de caspasas. El tratamiento con el extracto metanólico de la harina de frijol Negro 80-25 muestra un efecto distinto al del Pinto Zapata, ya que la expresión de Caspasa-3 en este tratamiento fue menor comparada con el control negativo. Lo anterior sugiere que el mecanismo de acción del frijol Pinto Zapata y del Negro 80-25 es distinto en relación a la expresión de Caspasa-3.

Una de las posibles explicaciones a la disminución de la expresión de Caspasa-3 por efecto del tratamiento con Negro 80-25 podría atribuirse al tiempo en el cual fueron evaluadas las células. Olvera y col. (2003) demostraron que células Hela tratadas con extractos de flor de jamaica ricos en un compuesto fenólico denominado ácido protocatecuico, incrementaron la expresión de Caspasa-3 en tiempos cortos de 6 a 12 horas. Por el contrario, a tiempos más prolongados (24 horas) se disminuye significativamente esta enzima. Esto podría atribuirse a la degradación propia de la enzima, lo que pudiera estar provocando la disminución de la expresión de Caspasa; además de que el tipo de células estudiadas son distintas.

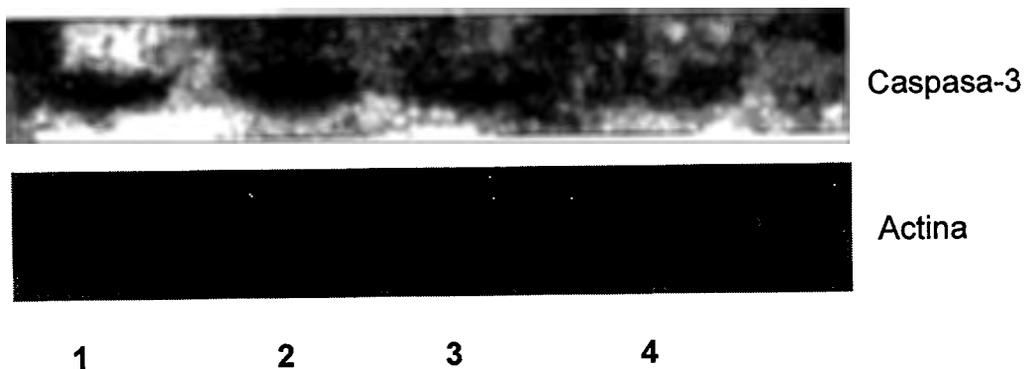


Figura 16. Expresión de Caspasa 3 en células CaCo2 tratadas con extractos de frijol Pinto Zapata (0.028 mg/ml) y Negro 80-25 (0.009 mg/ml)

La figura es representativa de al menos dos experimentos independientes.

Carril 1: control negativo, carril 2: control positivo, utilizando estaurosporina carril 3: células tratadas con el extracto metanólico de la harina de frijol Pinto Zapata y carril 4: células tratadas con el extracto metanólico de la harina de frijol Negro 80-25. Las células se hicieron crecer a un 80 % de confluencia y se trataron durante 48 horas con los extractos metanólicos de las harinas de frijol. Posteriormente, fueron tripsinizadas para realizar el extracto proteínico.

V.6 Expresión de Bax en células de cáncer de colon CaCo2 tratadas con extractos metanólicos de harinas de frijol cocido Pinto Zapata y Negro 80-25

Otra proteína involucrada en la inducción del proceso de apoptosis y que fue evaluada en este trabajo es Bax, la cual tiene un peso de 21-24 kDa. En la Figura 17 se presentan los niveles de expresión de Bax en células Caco2 tratadas con los extractos metanólicos de las harinas de frijol cocido Pinto Zapata y Negro 80-25 durante 48 horas. Se puede observar que las células tratadas con Pinto Zapata tuvieron un comportamiento similar al del control negativo. Mientras que las células tratadas con extractos de Negro 8025 se disminuye en su totalidad la expresión de Bax. Esto corrobora el resultado obtenido para Caspasa-3, el cual nos sugiere que el frijol ejerce su acción a través de diferentes mecanismos.

En cultivos celulares, una disminución de la proliferación celular se encuentra relacionada con muerte celular, la cual puede ser causada por diferentes mecanismos, entre ellos, apoptosis. Un aumento en el nivel de expresión de Bax se considera un indicador de apoptosis, pues la expresión de Bax se correlaciona con una mayor susceptibilidad celular a la apoptosis (Ramírez, 1999). Con el resultado obtenido sugiere que la muerte celular obtenida por los extractos metanólicos de las dos variedades de harinas de frijol cocido no está relacionada con el proceso de apoptosis.

Saleem y col. (2002), evaluaron el extracto metanólico de *Terminalia chebula* en varias líneas celulares de cáncer en la proliferación y en la muerte celular; encontraron que los compuestos fenólicos encontrados en esta fruta, ácido gálico, etilgalato, luteolina y ácido tánico, inhiben la proliferación celular e inducen apoptosis a bajas concentraciones, a altas concentraciones el mecanismo de muerte celular fue el de necrosis. Además observaron que las células que mueren vía apoptosis son degradadas como células necróticas.

Todo esto pudiera indicar que el mecanismo por el cual pudieran estar actuando los extractos metanólicos al tiempo de estudio, no es por apoptosis, pero tal vez estuvieran actuando a nivel de necrosis.

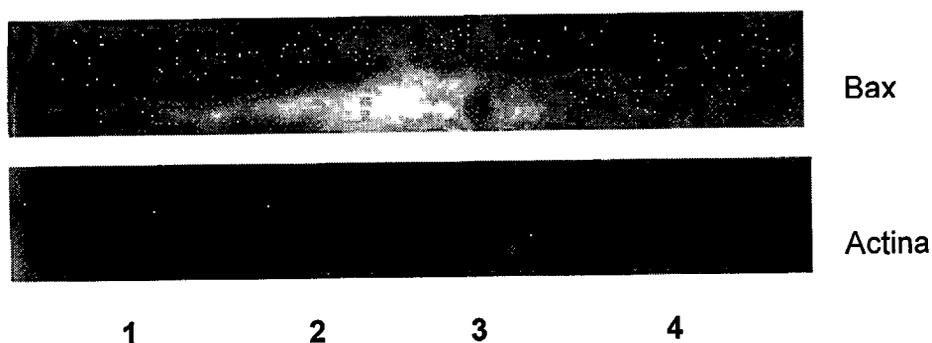


Figura 17. Expresión de Bax en células CaCo2 tratadas con extractos de frijol Pinto Zapata (0.028 mg/ml) y Negro 80-25 (0.009 mg/ml)

La figura es representativa de al menos dos experimentos independientes.

Carril 1: control negativo, carril 2: control positivo, utilizando estaurosporina carril 3: células tratadas con el extracto metanólico de la harina de frijol Pinto Zapata y carril 4: células tratadas con el extracto metanólico de la harina de frijol Negro 80-25. Las células se hicieron crecer hasta un 80% de confluencia, se trataron durante 48 horas con los extractos metanólicos de las variedades de frijol. Posteriormente fueron trispsinizadas para realizar el extracto proteínico.

V.7 Fragmentación de ADN en células de cáncer de colon CaCo2 tratadas con los extractos metanólicos de harinas de frijol cocido Pinto Zapata y Negro 80-25

Para corroborar si el efecto de los extractos metanólicos en las células CaCo2 fue mediante un mecanismo alterno al de apoptosis; se realizó la extracción del ADN de dichas células como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El resultado se muestra en la Figura 18, donde se observa que los carriles correspondientes a los tratamientos con los extractos metanólicos de las harinas de frijol Pinto Zapata y Negro 80-25 (carril 2 y 3 respectivamente), tienen el mismo patrón observado en el control negativo (carril 1).

Este resultado puede indicar que el efecto de los extractos metanólicos en las células Caco2, probablemente no es mediante el mecanismo de apoptosis. .

Cabe mencionar además que las células que fueron usadas como control positivo (carril 4), se les adicionó el compuesto estaurosporina a una concentración de 9 μ M durante 9 horas; condiciones utilizadas para inducir apoptosis en células Hela, sin embargo, en CaCo2 no se presentó ningún efecto, una de las posibles explicaciones es la susceptibilidad a la estaurosporina presentada por las células, aunque la concentración usada para Hela tampoco fue suficiente para presentar fragmentación.

Katsube y col. (2003) evaluaron el efecto del extracto de bilberri sobre células de cáncer de colon humano, no observaron fragmentación del ADN, pero sí encontraron dicha fragmentación en células de leucemia humana. En ambas líneas celulares, encontraron un efecto significativo en la inhibición del crecimiento, pero el mecanismo de dicha inhibición dependía de la línea celular estudiada.

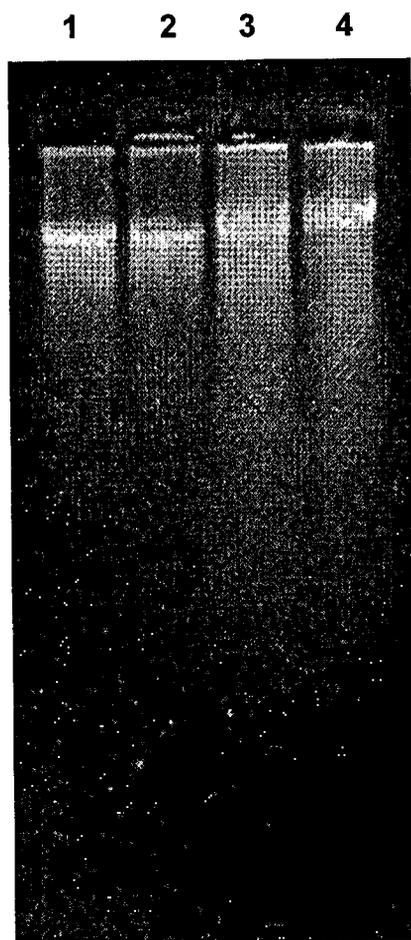


Figura 18. Patrón electroforético de ADN obtenido de células CaCo2 sometidas a extractos metanólicos de diferentes variedades de harinas de frijol cocido durante 48 horas.

La figura es representativa de por lo menos dos experimentos independientes.

Carril 1: control negativo. Carril 2: Extracto metanólico de harina de frijol Pinto Zapata. Carril 3: Extracto metanólico de harina de frijol Negro 80-25. Carril 4: Control positivo: células HeLa tratadas con $9\mu\text{M}$ del compuesto Estaurosporina durante 9 horas. Las células se hicieron crecer hasta un 80% de confluencia, se trataron durante 48 horas con los extractos metanólicos de las harinas de frijol. Posteriormente fueron tripsinizadas y se realizó la extracción de ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamilico.

VI. CONCLUSIONES

El tratamiento durante 5 días con frijol pinto Zapata y negro 8025 incorporado a la dieta a bajas concentraciones no induce la actividad de GST ni en hígado ni en colon, sin embargo la actividad de QR se incrementa en el colon de animales tratados con Pinto Zapata a bajas concentraciones;

En los estudios *in vivo* a largo plazo (14 semanas), el tratamiento con frijol no presento ningún cambio en la actividad de las enzimas GST y QR, esto sugiere que la cantidad de frijol actualmente consumida (11 Kg al año) ni a concentraciones mayores (23 y 146 Kg al año) protege al organismo a través de la inducción de enzimas de fase II.

En los estudios *in vitro* los extractos metanólicos de frijol pinto Zapata y Negro 8025 disminuyen proliferación celular y sobrevivencia de las células CaCo2, siendo éstos dos índices mayores para la variedad frijol Negro 80-25 que Pinto zapata. Al estudiar el mecanismo de apoptosis al tiempo de 48 horas, no se observó que la muerte celular fuera por este mecanismo. Además, se observó que las dos variedades de frijol actúan por diferentes mecanismos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aloysius Lambertus Antonia Sesink. 2001.** "Red meat and colon cancer: a possible role for heme". Tesis Doctoral.
- Aparicio-Fernández, X., Yousef, G., Loarca-Piña, G., De Mejía, E., Lila, M. 2005** "Characterization of polyphenolics in the seed coat of Black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris L.*)". J. Agric. Food Chem. 53: 4615-4622.
- Appelt, L., Reicks, M. 1999.** "Soy induces phase II enzymes but does not inhibit dimethylbenz(a)anthracene-induced carcinogenesis in female rats". J. Nutr. 129: 1820-1826.
- Bar-Am, O., Weinreb, O., Amit, T., Youdin, M. 2005.** "Regulation of Bcl-2 family proteins, neutrophic factors, and APP processing in the neurorescue activity of propargylamine". FASEB. 1-26.
- Begleiter, A., Sivanathan, K., Curphey, T., Bird, R. 2003,** "Induction of NADP(H) quinone oxidoreductase 1 inhibits carcinogen-induced aberrant crypt foci in colons of Sprague-Dawley". Cancer Epidemiol. Biomarkers Res. 12: 566-572.
- Beninger, C., Gu, L., Prior, R., Junk, D., Vandenberg, A., Bett, K. 2005.** "Changes in Polyphenols of the Seed Coat during de After-Darkening Process in Pinto Beans (*Phaseolus vulgaris L.*)". J. Agric. Food Chem. 53: 7777-7782.
- Bennink, M., Rondini, E. 2002.** Eat Beans to Improve Your Health: Part 1 of 4: Beans and Cancer. Food Sci. and Human Nutr.
- Bruce, R., Giacca, A., Medline, A. 2000.** "Possible Mechanisms Relating Diet and Risk of Colon Cancer". Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 9: 1271-1279.
- Cardador-Martínez, A., Loarca-Pina, G., Oomah, D. 2002.** " Antioxidant Activity in Common Beans (*Phaseolus vulgaris L.*)". J. Agric. Food Chem. 50: 6975-6980.
- Davies, M., Bowey, E., Adlererentz, H., Rowland, I., Rumsby, P. 1999.** "Effects of soy or rye supplementation of high-fat diets on colon tumour development in azoxynethane-treated rats". Carcinogenesis. 20: 927-931.
- De Flora, S., Izzotti, A., D'Agostini, F., Balanski, R., Noonan, D., Albini, A. 2001.** "Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases". Mutation Res. 9: 9-22.

- De Mejía, E., Guzmán-Maldonado, S., Acosta-Gallegos, J., Reynoso-Camacho, R., Ramírez-Rodríguez, E., Pons-Hernández, J., González-Chavira, M., Castellanos, J., Kelly, J. 2003.** "Effect of Cultivar and Growing Location on the Trypsin Inhibitors, Tannins, and Lectins of Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Grown in the Semiarid Highlands of Mexico". *J. Agric. Food Chem.* 51: 5962-5966.
- Finkel, T., Holbrook, N. 2000.** Review articles. *Nature.* 408: 239-247.
- FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura). 2005.** URL: <http://www.fira.gob.mx/Publicaciones/perspectivas%20frijol%202003.pdf>.
Fecha de actualización: 2005. Fecha de acceso: 20 de Julio de 2005
- Genetics Home Reference. 2005.** The apoptotic process. URL: http://www.ghr.nlm.nih.gov/ghr/picture/apoptosis_process. Fecha de actualización: 25 de Mayo de 2005. Fecha de acceso: 22 de Agosto de 2005
- Guzmán-Maldonado, S.H., Paredes-López, O. 1998.** Chapter 9: Functional Products of Plants Indigenous to Latin America: Amaranth, Quinoa, Common Beans and Botanicals in Functional Foods. *Biochemical & Processing Aspects.* Edited by G. Mazza, Ph. D. pp 308-312.
- Guzmán-Maldonado, H., Reynoso-Camacho, R., Torres-Pacheco, I., Acosta-Gallegos, J. 2005.** "Caracterización genética del frijol común y potencial nutracéutico de las especies cultivadas del género *Phaseolus*". Informe parcial. INIFAP.
- Halliwell, B., Aruoma, O. 1997.** Chapter 1: Free Radicals and Antioxidants: The Need for in vivo Markers of Oxidative Stress. En *Antioxidant. Methodology In vivo and in vitro Concepts.* AOCS Press. E.U.A. pp 3.
- Hangen, L, and Bennink, M. 2002.** "Consumption of Black Beans and Navy Beans (*Phaseolus vulgaris*) Reduced Azoxymethane-Induced Colon Cancer in Rats". *Nutr. Cancer.* 44: 60-65.
- Harem. R., Mak, T. 2001.** "Animal Models of Tumor-Suppressor Genes". *Ann. Rev. Genet.* 35: 209-241.
- Helsby, N., Zhu, S., Pearson, A., Tingle, M., Ferguson, L. 2000.** "Antimutagenic effects of wheat bran diet through modification of xenobiotic metabolizing enzymes". *Mutation Res.* 454; 77-88.
- Hughes, J., Ganthavorn, C., Wilson-Sanders, S. 1997.** "Dry Beans Inhibit Azoxymethane-Induced Colon Carcinogenesis in F344 Rats". *J. Nutr.* 127: 2328-2332.

- IHOME 2000.** URL: <http://ihome.cuhk.edu.hk/~b105122/image/0611.jpg>. Fecha de actualización: 2000. Fecha de acceso: 28 de Agosto 2005.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N, Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nabeshima, Y. 1997.** "An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236: 313-322.
- Jenab, M., Thompson, L. 2000.** "Phytic acid in wheat bran affects colon morphology, cell differentiation and apoptosis". *Carcinogenesis.* 21: 1547-1552.
- Johnson, I.T. 2001.** Chapter 6: Antioxidants and antitumor properties. En *Antioxidants in Food. Practical applications.* CRC Press. Boca Ratón, FL. pp 100-123.
- Kastan, M. 1999.** Capítulo 6: Biología Molecular del cáncer: el ciclo celular. En *Cáncer, principios y práctica de oncología.* Madrid.
- Katsube, M., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., Kobori, M. 2003.** "Induction of apoptosis in cancer cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins". *J. Agric. Food Chem.* 51: 68-75.
- Krajka-Kùzniak, V., Baer-Dubowska, W. 2003.** "The effects of tannic acid on cytochrome P450 and phase II enzymes in mouse liver and kidney". *Toxicol. Letters.* 143: 209-216.
- Langsch, A., Bader, A. 2001.** "Longterm Stability of Phase I and Phase II Enzymes of Porcine Liver Cells in Flat Membrane Bioreactors". *Biotech. Bioeng.* (76), 2: 115-126.
- Lira, K.I. 2004.** "Análisis de la expresión de las proteínas PKC β II durante la carcinogénesis del colon en ratas Sprague-Dawley". Tesis de Maestría. UAQ. Querétaro, México.
- Lowry, O.H., Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
- Madar, Z., Timar, B., Nysha, A., Zusman, I. 1993.** "Effects of high-fiber diets on pathological changes in DMH-induced rat colon cancer". *Nutr. Cancer.* 20: 87-96.

- Matusheski, N.V., Jeffery E. H. 2001.** Comparison of the Bioactivity of Two Glucoraphanin Hydrolysis Products Found in Broccoli, Sulforaphane and Sulforaphane Nitrile. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5743-5749.
- McCane, K., Roberts, L. 1994.** Chapter 10: Tumor Biology. En *Pathophysiology, the biologic basis for disease in adults and children*. 2a edición. Ed. Mosby. pp.322.
- McIntosh, G., Wang, Y.H., Royle, P. 1998.** "A Diet Containing Chickpeas and Wheat Offers Less Protection against Colon Tumors than a Casein and Wheat Diet in Dimethylhydrazine-Treated Rats". *J. Nutr.* 128: 804-809.
- Messina, M. 1999.** "Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects". *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (suppl): 439S-50S.
- Nishino, H., Murakoshi, M., Yang Mou, X., Wada, S., Masuda, M., Ohsaka, Y., Satomi, Y., Jinno K. 2005.** "Cancer Prevention by Phytochemicals". *Oncology.* 69 (supl 1); 38-40.
- Noguchi, N., Niké, E. 1999.** Chapter 1: Chemistry of Active Oxygen Species and Antioxidants. En *Antioxidants, Status, Diet, Nutrition and Health*. CRC Press. E.U.A.
- Olvera-García, V. 2003.** "Efecto y mecanismo de acción del extracto acuoso de flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) sobre la proliferación de células HeLa". UAQ. Tesis.
- Omaye, S.T. 2004.** *Food and nutritional toxicology*. CRC Press LLC. Boca Raton, FL.).
- Papas, A. 1999.** Chapter 5: Diet and Antioxidant Status. En *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*. Edited by Andreas Papas. pp. 91-93.
- Parkinson.** Chapter 6: Biotransformation of Xenobiotics. En: Casarett & Doulls. *Toxicology. The Basic science of poisons*. Edit. McGraw-Hill. 5 Edición. E.U.A. 1995. pp 113-186.
- Parra-Cabrera, S., Fernández-Ortega, M., Vandale-Toney, S., López-Carrillo, L. 1994.** "Fibra dietética y tumores gastrointestinales, implicaciones para la población mexicana". *Arch. Lat. Nutr.* 44: 76-81.
- Pérez, P., Esquivel, G., Rosales, R., Acosta-Gallegos, J. 2002.** "Caracterización física, culinaria y nutricional de frijoll del altiplano subhúmedo de México". *Arch. Lat. Nutr.* 52: 172-180.

- Perkins, A., Stern, D. 2000.** Capítulo 4: Biología molecular del cáncer: oncogenes. En *Cáncer, principios y práctica de oncología*. Volumen 1. Editorial Panamericana. pp. 87.
- Piñols, C. 1998.** "Estudio de los cambios en la mucosa colónica de rata y cinética celular durante la carcinogénesis experimental inducida con 1,2-dimetilhidracina". Tesis Doctoral. Universidad de Lleida, Barcelona, España.
- Pool-Zobel, B., Abrahamse, S., Collins, A., Kark, W., Gugler, R., Oberreuther, D., Günther, E., Lishaut, S., Rechkemmer, G. 1999.** "Analysis of DNA Strand Breaks, Oxidized Bases, and Glutathione S-Transferase P1 in Human Colon Cells from Biopsies". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 8: 609-614.
- Prochaska, H., Santamaria, A., Talalay, P. 1992.** "Rapid detection of inducers of enzymes that Project against carcinogens". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 2394-2398.
- Raff, M. 1998.** "Cell suicide for beginners". *Nature.* 396: 119-122.
- Ramírez, R., Cariacedo, J., Moreno, C., Guerra, F. "Apoptosis y enfermedad"** Hospital Universitario Reina Sofía. Sumario. **1999**; Vol 14, 6: 367-374
- Rodríguez-Castillo, L., Fernández-Rojas, X. 2003.** "Los frijoles (*Phaseolus vulgaris*): su aporte a la dieta del costarricense". *Acta méd. costarric.* Vol 45, (3).
- SAGARPA 2003.** URL: <http://www.siea.sagarpa.gob.mx/Publicaciones/Archivos/Frijol90-00.pdf>. Fecha de actualización: 2003. Fecha de acceso: 15 de Mayo 2005.
- Saleem, A., Husheem, M., Härkönen, P., Pihlaja, K. 2002.** "Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit". *J. Ethnopharmacol.* 81: 327-336.
- Salucci, M., Stivala, L., Maiani, G., Bugianesi, R., Vannini, V. 2002.** "Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2)" *British J Cancer.* 86: 1645-1651.
- Shahidi, F., Naczki, M. 1995.** "Food Phenolics: sources, chemistry, effects, applications" Technomic Publishing, Co. Inc. Penns, EUA. pp 13-18.
- Talalay, P., De Long, M., Prochaska, H. 1988.** "Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that Project against chemical carcinogenesis". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 8261-8265.

- Talalay, P. 1991.** "Chemical protection against cancer by induction of electrophile detoxication (Phase II) enzymes". Department of Pharmacology and Molecular Sciences. The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland. 193-2005.
- Talalay, P., Fahey, J., Holtzclaw, W., Prester, T., Zhang, Y. 1995.** "Chemoprotection against cancer by Phase 2 enzyme induction". Toxicology Letters. 82/83: 173-179.
- Talalay, P. 2000.** "Chemoprotection against cancer by induction of Phase 2 enzymes". Mini-review. Biofactors. 12: 5-11.
- Takeoka, G., Dao, L., Full, G., Wong, R., Harden, L., Edwards, R., Berrios, J. 1997.** "Characterization of Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Anthocyanins". J. Agric. Food Chem. 45: 3395-3400.
- Thorup, I., Mayer, O., Kristiansen, E. 1994.** "Influence of a dietary fiber on development of dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci and colon tumor incidence in Wistar rats". Nutr. Cancer. 21: 177-82.
- Tsuda, H., Ohshima, Y., Nomoto, H., Fujita, K., Matsuda, E., Iigo, M., Takasuka, N., Moore, M. 2004.** "Cancer prevention by natural compounds". Drug Metab. Pharmacokin. 19 (4): 245-263.
- Trichopoulos, D. 1999.** Capítulo 12: Epidemiología del cáncer. En Cáncer. Principios y Prácticas de Oncología. Vol. 1. 5ª edición. Madrid. pp 231-256.
- WHO 2005.** URL: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>. Fecha de actualización: 2005. Fecha de acceso: 10 de Marzo 2005.
- Yin, L., Li, Y., Ren, J., Kuwahara, H., Kufe, D., 2003.** "Human MUC1 Carcinoma Antigen Regulates Intracellular Oxidant Levels and the Apoptotic Response to Oxidative Stress". J. Biol. Chem. 278: 35458-35464.
- Zhu, J., Yu, B., Ji, Y., Zheng, M., Li, D. 2002.** "Upregulation of vascular endothelial growth factor by hydrogen peroxide in human colon cancer". World J. Gastroenterol. 8: 153-157.
- Zorrilla, A., Eirez, M., Izquierdo, M. 2004.** "Papel de los radicales libres sobre el ADN; carcinogénesis y terapia antioxidante". Rev. Cubana Invest. Biomed. 22: 51-57.

VIII. APÉNDICE

VIII.1 Preparación de extractos citosólicos

Preparación de buffer Tris/Sacarosa: para un 1 L

7.9 g Tris HCl

2.1 g MgCl₂

1.9 g KCl

85.1 g sacarosa ultrapura

pH a 7.0

VIII.2 Determinación de Glutación S-Transferasa

Glutación S-Transferasa CDNB

Preparaciones

0.1 buffer de fosfato pH = 6.5

68.5 ml de NaH₂PO₄ (0.2M) o 1.89 g/68.5 ml.

31.5 ml Na₂HPO₄ (0.2M) o 0.895 g/31.5 ml

100 ml + 100 ml H₂O = 200 ml de volumen total.

Buffer GSH: 6.15 mg por 1.0 ml H₂O.

Buffer CDNB: 4.04 mg por 1.0 ml de EtOH.

1% BSA: 50 mg en 5 ml de H₂O

Cálculos

Cambiar en Abs por min/0.0096= nmol/mg/min.

Coefficiente de extinción CDNB: 9600/Mcm.

Glutación S-Transferasa en placa.

Soluciones para el ensayo GST:

Stock GSH - 150mM.

Stock CDNB – 12.2 mg/ml en 100% de Etanol.

Buffer GSH – 150 μ l stock GSH + 7.35 ml 0.1 M buffer de fosfato (dilución 1:50).

Buffer CDNB – 400 μ l stock CDNB + 11.6 ml 0.1 M buffer de fosfato (dilución 1:30).

VIII.3 Ensayo de Quinona Reductasa

Buffer de ensayo Tris/HCl:

1.97 g Tris-HCl

333 mg BSA

3.3 ml de Tween 20 1.5%

500 ml de H₂O

Parámetros de lectura:

Longitud de onda: 610 nm.

VIII.4 Preparación del buffer de lisis para extracto de proteínas de células (para 1 ml)

Sacarosa 70 mM: 100 μ l

EDTA 1 mM: 10 μ l

Hepes 10 mM: 20 μ l

Nonidet P-40 1 %: 10 μ l

Ortovanadato de Na 1 mM : 5 μ l

PMSF 1 mM : 16 μ l

Leupeptina 1 μ g/ml : 0.2 μ l

VIII.5 Geles y soluciones para electroforesis

Gel de condensación 3% (para un gel)

Acrilamida 30%-bisacrilamida 0.938%: 0.3 ml

Tris 3M-HCl 1M-SDS 0.3%: 0.75 ml

Agua: 1.95 ml

Persulfato de amonio 10%: 20 μ l

Temed: 2 μ l

Gel de separación 10% (para un gel)

Acrilamida 30 %-bisacrilamida 0.938 %: 2.5 ml

Tris-HCl 3M - SDS 1 M 0.3 %: 2.5 ml

Glicerol 79.5%: 1 ml

Agua: 1.5 ml

Persulfato de amonio 10%: 25 μ l

Temed: 2.5 μ l

Solución TBS (para 1 litro)

Tris-HCl pH = 8.0 1M: 10 ml

NaCl 5M: 30 ml

Aforar con agua.

Solución TTBS (para 1 litro)

Tris-HCl pH = 8.0 1M: 10 ml

NaCl : 30 ml

Tween 20: 10 ml

Aforar con agua.

VIII.6 Buffers para ADN

Buffer de digestión para ADN

NaCl 100 mM

Tris 10 mM pH = 8.0

EDTA 25 mM

SDS 0.5%

Proteinasa K 0.1 mg/ml

Buffer de extracción ADN (cloroformo:fenol:alcohol isoamílico) para 1ml

Cloroformo: 480 μ l

Fenol: 500 μ l

Alcohol isoamílico: 20 μ l