



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

**FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO
DE LA REPÚBLICA (PROPAC)
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

**“Efecto del consumo de una botana horneada de maíz (*Zea mays* L.)
nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido en un modelo *in vivo*
de colitis crónica”**

TESIS

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

Presenta

M. en C. Iván Andrés Luzardo Ocampo

Dirigido por

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Querétaro, Qro., Agosto de 2020



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

**“Efecto del consumo de una botana horneada de maíz (*Zea mays* L.)
nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido en un modelo *in vivo*
de colitis crónica”**

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

Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta

I.A. Iván Andrés Luzardo Ocampo

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

SINODALES:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Presidente

Dra. Ma. Elvira González de Mejía
Secretario

Dra. Rocio Campos Vega
Vocal

Dr. Luis Alfonso Mojica Contreras
Suplente

Dr. Jorge A. Acosta Gallegos.
Suplente

Centro Universitario
México

DEDICATORIA

Dirección General de Bibliotecas UAQ

A mis padres, Alma Lucía y Álvaro

A mis abuelos, Jorge Alirio y Belly

A mis hermanas, Ana María y Laura Juliana

A mis tíos, Walter y Adriana, y mi primo Simón

A todas aquellas maravillosas personas que conocí en este trayecto

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, pero especialmente a mi madre y hermanas, ya que gracias a ella pude continuar con este proyecto desde mis estudios de maestría y me dio la fortaleza emocional para afrontar esta increíble experiencia académica lejos de mi país natal. A mis tíos Walter y Adriana por su apoyo económico, moral y logístico que ha sido clave para continuar con mi formación académica, personal y profesional.

A mi segunda familia en México, Martín, Flor, Juan Martín, Iván, Ivonne, Maritza, José Pablo, Lizbeth, Paulette, Sergio, Dhelia, Cory, Laura, Martín, Gerardo, Rocío y Mamá Lola por acogerme y hacerme sentir como uno más de ellos dentro de la familia Torres Martínez, por acogerme en diferentes momentos y espacios familiares y por integrarme como un hijo más.

A mis amigos: Alexa Rincón y Alexa Jarro, Diego, Arturo, Laura, Juliana, Astrid, Liceth, José Fernando, Laura, Víctor, Luis Miguel, Bruno, Angélica Godínez, Angélica Hernández, por acompañarme en esta travesía académica, por hacer de mi trabajo y mis días un momento más agradable y por darme compañía en la distancia. A todos mis amigos y maravillosas personas que conocí en mi estancia académica en la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign: Dra. Elvira González de Mejía y Dr. Luis Mejía, Miguel Rebollo Hernanz, Candice Mazewski, Mariana Grancieri, Crystal (Qiaozhi) Zhang, Regina Cortez, Luis Real Hernández, Subhiksha Chandrasekaran, Michael Paulsmeyer, Anna Waller, Jorge Mena, Dessirée Zerpa, Sergio Díaz, Nattaporn Jaroenchai, Forrest Lentz, Julie Nguyen, Josh Fingaál, Rex Miller, Ron Edquilang, Miriam Aguilar, Lupita Gómez-Lang, Susie Aguiñaga, Cecilia Moreno, Iván Téllez, Tiffany, Yuridia Ramírez y tantas otras personas que contribuyeron en mi formación. Gracias por ser ejemplo de una excelente relación de amistad y unión, y por ser un ejemplo para mí.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Bioquímica Toxicológica por el trabajo en equipo y todos sus aportes y colaboración. A la Dra. Flavia Loarca por su apoyo constante, guía, ánimo y paciencia para la culminación de este trabajo. Sin su paciencia y dedicación nada de esto habría sido

posible. Muchas gracias por depositar su confianza en mí y por haberme abierto las puertas a todo este mundo que era nuevo para mí. A la Dra. Elvira González de Mejía por recibirme y darme la oportunidad de estudiar, investigar, trabajar y contribuir a formarme como un investigador de primer nivel dentro de su grupo académico de investigación en la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign. A la Dra. Rocío Campos Vega por su dedicación y acompañamiento constante durante este trabajo doctoral. Gracias por su guía. A la Dra. Marcela Gaytán por sus conocimientos y ayuda en la utilización de equipos, así como el apoyo logístico para la obtención de las materias primas y la oportunidad de trabajar con ella. A los Dres. Luis Mojica y Dr. Jorge Acosta Gallegos por su apoyo incondicional durante mis estudios de doctorado.

Al Dr. Mario Rodríguez por su apoyo moral y acompañamiento durante estos dos años de estudios de doctorado, así como su apoyo en la realización de trámites de visa y llegada a este grandioso país.

A Carmelita, Paulina y Marigel por todo su apoyo y ayuda en documentación y labores administrativas de la Facultad de Química y la UAQ. A la Universidad Autónoma de Querétaro por recibirme en sus instalaciones para realizar mis estudios de posgrado y abrirme el campo de la ciencia e investigación mexicana.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), el Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro (CONCYTEQ) y los Dres. Gilberto Herrera Ruiz y la Dra. Teresa de Jesús García Gasca (Rectoría de la Universidad Autónoma de Querétaro), la Dra. Flavia Loarca y la Dra. Elvira González de Mejía por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto. A México por recibirme con brazos abiertos y darme la oportunidad de conocer excelentes personas, darme una excelente formación académica y profesional y contribuir a mi bienestar y educación personal.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS Y SIGLAS | 1 |
| RESUMEN | 5 |
| ABSTRACT | 7 |
| I. INTRODUCCIÓN | 9 |
| II. ANTECEDENTES | 12 |
| II.1 Maíz (<i>Zea mays</i> L.) | 12 |
| II.1.1 Generalidades | 12 |
| II.1.2 Estructura y Composición Química | 13 |
| II.1.3 Compuestos fenólicos | 15 |
| II.1.4 Nixtamalización | 16 |
| II.2 Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) | 17 |
| II.2.1 Generalidades | 18 |
| II.2.2 Estructura y Composición Química | 18 |
| II.2.3 Compuestos bioactivos | 20 |
| II.2.3.1 Flavonoides | 20 |
| II.2.3.2 Fibra Dietaria | 21 |
| II.3 Fracción no digerible y efectos asociados en la salud | 22 |
| II.4 Inflamación | 24 |
| II.4.1 Importancia y papel del óxido nítrico (NO) en la inflamación | 24 |
| II.4.2 Papel antiinflamatorio de polifenoles y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) | 28 |
| II.4.3 Enfermedades Inflamatorias Intestinales (EII) | 29 |
| II.4.3.1 Generalidades de la enfermedad inflamatoria intestinal | 29 |
| II.4.4 Colitis Ulcerosa (CU) | 32 |
| II.4.4.1 Generalidades de la colitis ulcerosa | 32 |
| II.4.4.2 Mecanismo de acción de colitis ulcerosa | 36 |
| II.4.5 Efectos biológicos del frijol común asociados a CU | 38 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| II.4.6 | Papel de las EROs y ERNs en CU y algunas estrategias terapéuticas en su tratamiento | 41 |
| II.4.7 | Marcadores en la enfermedad crónica inflamatoria intestinal y Colitis Ulcerosa (CU): | 45 |
| II.4.7.1 | Marcadores fecales de CU..... | 45 |
| II.4.7.2 | Otros marcadores de importancia en CU..... | 48 |
| II.4.8 | Mecanismo de acción del inflammasoma | 49 |
| II.5 | Modelo <i>in vivo</i> de inducción de colitis con dextrán sulfato de sodio (DSS) 52 | |
| II.5.1.1 | Mecanismo de acción del DSS | 52 |
| II.5.1.2 | Evidencias físicas y clínicas del DSS..... | 55 |
| II.5.2 | Influencia de otros factores en los modelos de colitis | 57 |
| II.5.2.1 | El papel de la microbiota en la colitis inducida por DSS | 57 |
| II.5.2.2 | Apoptosis del tracto epitelial y la proliferación | 58 |
| II.5.2.3 | Influencia de perfiles específicos de citocinas en la colitis inducida por DSS | 59 |
| II.6 | Botanas..... | 60 |
| II.6.1 | Generalidades de las botanas..... | 60 |
| III. | JUSTIFICACIÓN | 65 |
| IV. | HIPÓTESIS | 67 |
| V. | OBJETIVOS | 68 |
| V.1 | Objetivo general..... | 68 |
| V.2 | Objetivos específicos..... | 68 |
| VI. | METODOLOGÍA | 70 |
| VI.1 | Materiales | 70 |
| VI.1.1 | Reactivos | 70 |
| VI.1.2 | Material biológico..... | 70 |
| VI.1.2.1 | Materia Prima..... | 70 |
| VI.1.2.1.1 | Acondicionamiento de la materia prima | |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| VI.1.2.2 | Animales de experimentación | 72 |
| VI.1.2.3 | Cultivo celular..... | 72 |
| VI.2 | Métodos | 73 |
| VI.2.1 | Determinación de la composición nutracéutica de la botana horneada 73 | |
| VI.2.1.1 | Obtención del extracto metanólico..... | 73 |
| VI.2.1.2 | Análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por Microextracción en Fase Sólida (SPME) con análisis por Cromatografía de Gases acoplada a masas (GC-MS) en heces | 74 |
| VI.2.2 | Digestión gastrointestinal y fermentación colónica <i>in vitro</i> | 75 |
| VI.2.2.1 | Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 75 |
| VI.2.2.2 | Fermentación <i>in vitro</i> de la FND | 78 |
| VI.2.3 | Modelo <i>in vitro</i> : Monocultivo de macrófagos RAW 264.7 | 78 |
| VI.2.3.1 | Ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para viabilidad celular | 79 |
| VI.2.3.2 | IV.5.6.2 Determinación de la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos (LPS)..... | 80 |
| VI.2.3.3 | Cuantificación de la producción de peróxido de hidrógeno | 80 |
| VI.2.3.4 | Cuantificación del nivel de expresión de proteínas del proceso inflamatorio | 81 |
| VI.2.4 | Modelo <i>in vitro</i> : Co-cultivo de macrófagos humanos THP-1 y células Caco 2 | 82 |
| VI.2.4.1 | Simulación del estado sano de epitelio intestinal..... | 84 |
| VI.2.4.2 | Simulación del estado de inflamación del epitelio intestinal | 84 |
| VI.2.4.3 | Medición de la resistencia eléctrica transepitelial/endotelial (TEER) 85 | |
| VI.2.4.4 | Cuantificación del nivel de citocinas en el medio extracelular por ELISA | 86 |
| VI.2.4.5 | Cuantificación de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) | 86 |
| VI.2.4.6 | Citometría de flujo para evaluación de activación de caspasa-1 y muerte por piroptosis (apoptosis inducida por inflamación) | 87 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| VI.2.5 | Modelo <i>in vivo</i> | 87 |
| VI.2.5.1 | Caracterización y establecimiento del modelo <i>in vivo</i> | 89 |
| VI.2.5.1.1 | Medición del pH | 91 |
| VI.2.5.2 | Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)..... | 91 |
| VI.2.5.3 | Determinación de la actividad de β -Glucouronidasa. | 92 |
| VI.2.5.4 | Determinación de mieloperoxidasa fecal | 92 |
| VI.2.5.5 | Cuantificación de compuestos fenólicos libres en heces..... | 93 |
| VI.2.5.6 | Sacrificio de animales y obtención de muestras | 93 |
| VI.2.5.7 | Análisis de expresión de genes | 94 |
| VI.2.6 | Análisis estadístico | 95 |
| VII. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 96 |
| VII.1 | Caracterización nutracéutica de la botana horneada..... | 96 |
| VII.2 | . Caracterización del extracto fermentado de la fracción no digerible de la botana (EFFND) | 98 |
| VII.2.1 | Identificación de metabolitos presentes en el EFFND..... | 98 |
| VII.3 | Efecto del EFFND en la modulación de factores de inflamación en un monocultivo de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS..... | 107 |
| VII.3.1 | Efecto del EFFND sobre la viabilidad celular y la producción de óxido nítrico (NO) y peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) en un monocultivo de macrófagos RAW 264.7..... | 108 |
| VII.3.2 | Efecto del EFFND sobre el nivel de producción de proteínas del proceso inflamatorio..... | 110 |
| VII.4 | . Caracterización del modelo <i>in vivo</i> de colitis crónica | 114 |
| VII.4.1 | Parámetros morfológicos de la caracterización del modelo <i>in vivo</i> de colitis crónica..... | 114 |
| VII.5 | . Efecto del consumo de la botana horneada de maíz-frijol sobre un modelo <i>in vivo</i> de colitis crónica | 121 |
| VII.5.1 | Efecto del consumo de la botana sobre parámetros morfológicos. | 121 |
| VII.5.2 | Efecto del consumo de la botana sobre parámetros enzimáticos .. | 128 |

| | |
|---|------------|
| VII.5.2.1 Actividad de β -glucuronidasa fecal | 128 |
| VII.5.2.2 Actividad de mieloperoxidasa colónica | 131 |
| VII.5.3 Efecto del consumo de la botana sobre la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en ciego y heces..... | 132 |
| VII.5.4 Efecto del consumo de la botana en la modulación de proteínas séricas | 136 |
| VII.5.5 Efecto del consumo de la botana en la expresión de genes en colon asociados al proceso inflamatorio..... | 137 |
| VII.6 . Efecto <i>in vitro</i> del EFFND en la modulación del inflamasoma NLRP3 en un co-cultivo de células Caco-2 diferenciadas (dCaco-2) y macrófagos humanos THP-1 (MΦ) | 142 |
| VIII. CONCLUSIONES..... | 154 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA..... | 155 |
| X. ANEXO I | 175 |
| X.1 Manejo y manipulación de animales..... | 175 |
| X.2 Características de las dietas y administración de tratamientos | 176 |
| X.3 Justificación de la selección del modelo | 176 |
| X.4 Monitoreo de conducta | 177 |
| X.5 Condiciones de sacrificio | 177 |
| X.6 Recolección de muestras biológicas..... | 177 |
| X.7 Desecho de animales y material quirúrgico..... | 178 |
| X.8 Referencias Anexo 1..... | 178 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | Página |
|--|---------------|
| Cuadro 1. Composición química porcentual del maíz discriminado por fracciones (%)..... | 15 |
| Cuadro 2. Composición química del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)..... | 18 |
| Cuadro 3. Proporciones de medio de cultivo de células Caco-2 y THP-1 en el cultivo..... | 83 |
| Cuadro 4. Composición proximal de las dietas de los animales..... | 88 |
| Cuadro 5. Consumo calórico total murino y consumo calórico murino equivalente a partir de botanas (hasta el 30% del consumo calórico diario)..... | 88 |
| Cuadro 6. Dosis de botanas utilizadas en la caracterización del modelo in vivo de colitis crónica a fin de evaluar el efecto de su consumo..... | 89 |
| Cuadro 7. A) Contenido de compuestos fenólicos libres de dos botanas horneadas 70:30 elaboradas con dos cosechas diferentes (2014 y 2015) de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido; B) Contenido de compuestos fenólicos ligados de la botana 70:30 (Cosecha 2015)..... | 96 |
| Cuadro 8. Perfil de metabolitos del extracto fermentado de la fracción no digerible del totopo, cuantificado por cromatografía de gases acoplado a masas..... | 99 |
| Cuadro 9. Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), relación molar e índice de fermentabilidad del EFFND durante los diferentes tiempos de fermentación colónica..... | 104 |
| Cuadro 10. Puntajes asignados para el cálculo del Índice de Actividad de la Enfermedad (DAI)..... | 116 |
| Cuadro 11. Peso de órganos (colon, hígado y bazo) y longitud de colon de los ratones para los diferentes grupos evaluados en la inducción del modelo de colitis crónica..... | 117 |
| Cuadro 12. Genes diferencialmente modulados en cada grupo del modelo <i>in vivo</i> de colitis crónica..... | 140 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Corte longitudinal (a) y transversal (b) del grano de maíz (Delcour & Hosney, 2010)..... | 13 |
| Figura 2. Producción de Óxido Nítrico (ON) a partir de L-arginina y con participación de la enzima Sintetasa de Óxido Nítrico (SON) (Griffiths <i>et al.</i> , 2017). | 25 |
| Figura 3. Principales fenotipos de colitis de acuerdo con la clasificación de Montreal. Los síntomas y la estrategia de tratamiento podrían variar de acuerdo a la extensión de la enfermedad (Ungaro <i>et al.</i> , 2017)..... | 35 |
| Figura 4. Vista general del sistema intestinal inmune en el estado sano y de colitis ulcerosa con un enfoque en objetivos terapéuticos promisorios (Ungaro <i>et al.</i> , 2017)..... | 37 |
| Figura 5. Diagrama representativo de los efectos del DSS en el epitelio colónico (Kiesler <i>et al.</i> , 2015). | 53 |
| Figura 6. Mecanismo de acción del dextrán sulfato de sodio (DSS) (Chassaing <i>et al.</i> , 2014). | 54 |
| Figura 7. Intestino grueso y partes del epitelio intestinal y diferencias entre el intestino delgado y el grueso (Caceci, 2014). | 56 |
| Figura 8. Esquema general del co-cultivo de células Caco-2 y monocitos humanos THP-1. Adaptado de Kämpfer <i>et al.</i> (2017)..... | 83 |
| Figura 9. Estrategia experimental de la caracterización del modelo <i>in vivo</i> | 90 |
| Figura 10. Evaluación del efecto del consumo de la botana horneada una vez caracterizado el modelo de colitis crónica. | 90 |
| Figura 11. Principales rutas metabólicas asociadas a los Compuestos obtenidos por el análisis de cromatografía de gases del extracto fermentado de la fracción no digerible de la botana (Luzardo-Ocampo <i>et al.</i> , 2018)..... | 106 |
| Figura 12. Efecto del Extracto Fermentado de la Fracción No Digerible (EFFND) de la botana sobre la inhibición de la producción de óxido nítrico (ON), peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) y viabilidad celular (%). IC ₅₀ : Concentración inhibitoria media; | |

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta; CF: Compuestos fenólicos. Los resultados han sido expresados como la media \pm DE. Los asteriscos representan diferencias respecto al control por la prueba de Dunnett ($p < 0.05$). Letras diferentes expresan diferencias estadísticamente significativas por la Prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.05$) 108

Figura 13. Asociaciones funcionales y predichas de las citocinas diferencialmente expresadas, involucradas en el proceso inflamatorio mediado por el EFFND. 112

Figura 14. Evolución semanal del peso de los ratones para los diferentes grupos experimentales evaluados en la inducción del modelo de colitis crónica. ... 114

Figura 15. Evolución semanal del peso de ratones machos y hembras de la cepa ICR (CD-1) (ENVIGO, 2017). 115

Figura 16. Evolución del Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE) de los ratones para los diferentes grupos evaluados en la inducción del modelo de colitis crónica. 116

Figura 17. A) Relación de peso de colon/longitud de colon de los ratones para los diferentes grupos de implementación del modelo de colitis crónica; B) Peso relativo de hígado de los ratones para los diferentes grupos de implementación del modelo de colitis crónica. 118

Figura 18. Cortes histológicos representativos de las secciones de colon de los ratones de la inducción del modelo de colitis crónica. 119

Figura 19. Cortes histológicos representativos de las secciones de hígado de los ratones de la inducción del modelo de colitis crónica. 120

Figura 20. Evolución semanal del peso de los animales durante el modelo in vivo de colitis crónica. 122

Figura 21. Evolución del Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE) durante el modelo in vivo de colitis crónica. 123

Figura 22. A) Peso relativo de bazo para cada uno de los grupos al finalizar el modelo in vivo de colitis crónica; B) Peso relativo de hígado para los diferentes tratamientos al finalizar el modelo in vivo de colitis crónica. 125

| | |
|---|-----|
| Figura 23. Imágenes representativas del colon de los animales de cada grupo al finalizar el modelo <i>in vivo</i> de colitis crónica. | 126 |
| Figura 24. Relación peso/longitud de colon (en g/cm) de los diferentes tratamientos al finalizar el modelo <i>in vivo</i> de colitis crónica..... | 127 |
| Figura 25. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina de tejido colónico al finalizar el modelo <i>in vivo</i> de colitis crónica..... | 128 |
| Figura 26. Evolución de la actividad de β -glucuronidasa fecal durante el desarrollo del modelo <i>in vivo</i> de colitis crónica..... | 129 |
| Figura 27. Comparación de la actividad enzimática de β -glucuronidasa entre el inicio y el final del modelo <i>in vivo</i> de colitis crónica.. | 130 |
| Figura 28. Actividad de mieloperoxidasa (MPO) colónica a los 120 min para todos los grupos al finalizar el modelo <i>in vivo</i> de colitis crónica..... | 131 |
| Figura 29. Cantidad de A) Ácido Acético; B) Ácido Propiónico; C) Ácido Butírico. | 133 |
| Figura 30. Cantidad de ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico, butírico y totales) cecales, para los diferentes tratamientos, al finalizar el modelo <i>in vivo</i> de colitis crónica. | 135 |
| Figura 31. Producción de citocinas séricas en los animales (en pg/mL) al finalizar el modelo <i>in vivo</i> de colitis crónica..... | 137 |
| Figura 32. Mapa de calor (<i>Heatmaps</i>) de la modulación de genes asociados al proceso de inflamación en los diferentes grupos del modelo <i>in vivo</i> de colitis crónica..... | 138 |
| Figura 33. Mapa de calor (<i>Heatmaps</i>) de la modulación de genes asociados a la interacción huésped microbiota y la remodelación epitelial intestinal en los diferentes grupos del modelo <i>in vivo</i> de colitis crónica.)..... | 139 |
| Figura 34. Mecanismo de acción propuesto para el efecto del consumo de la botana en el modelo <i>in vivo</i> de colitis crónica..... | 141 |
| Figura 35. Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en la zona basolateral del co-cultivo, para los diferentes tratamientos ensayados en el co-cultivo de macrófagos (M Φ) y células Caco-2 diferenciadas (dCaco-2). | 143 |

| | |
|--|-----|
| Figura 36. Producción de nitritos en la zona basolateral del co-cultivo, para los diferentes tratamientos ensayados en el co-cultivo de macrófagos (MΦ) y células Caco-2 diferenciadas (dCaco-2)..... | 145 |
| Figura 37. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (en unidades relativas de fluorescencia o <i>RFU</i> por sus siglas en inglés) en la zona basolateral del co-cultivo, para los diferentes tratamientos ensayados en el co-cultivo de macrófagos (MΦ) y células Caco-2 diferenciadas (dCaco-2). | 146 |
| Figura 38. Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) en macrófagos luego del co-cultivo. La mezcla de estándares corresponde a la mezcla de ácido gálico, ácido butírico y verbascosa en las proporciones ensayadas (1:1:1)..... | 147 |
| Figura 39. Actividad de óxido nítrico sintetasa total (NOS) en macrófagos luego del co-cultivo. | 148 |
| Figura 40. Actividad de caspasa-1 en macrófagos luego de la activación del inflammasoma y después de co-cultivo. | 149 |
| Figura 41. Macrófagos en proceso de apoptosis inducida por la activación del inflammasoma, después del co-cultivo..... | 150 |
| Figura 42. Producción de IL-1β en macrófagos tras activación del inflammasoma, y después del co-cultivo..... | 151 |
| Figura 43. Producción de IL-18 en macrófagos tras activación del inflammasoma, y después del co-cultivo..... | 151 |
| Figura 44. Mecanismo de acción propuesto para el modelo <i>in vitro</i> de inflamación intestinal utilizando un co-cultivo de macrófagos THP-1 y células Caco-2 diferenciadas (dCaco-2) a enterocitos. | 152 |

ABREVIATURAS Y SIGLAS

5-ASA: Mesalazina.

AACC: Asociación Americana de Químicos de Cereales (*American Association of Cereal Chemists*).

ABTS: Ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).

AGCC: Ácido graso de cadena corta.

AOM: Azoximetano.

APC: Células presentadoras de antígenos (*Antigen presenter cell*).

ATCC: *American Type Culture Collection*.

BSA: Albúmina de suero bovino.

CARD: Dominios de reclutamiento y activación de caspasas (*Caspase activation and recruitment domain*).

CBS: Botana horneada de maíz nixtamalizado y frijol común cocido.

COX: Ciclooxygenasas.

CU: Colitis ulcerosa.

CUCI: Colitis ulcerosa crónica idiopática.

DAD: Detector de arreglo de diodos.

DAI: Índice de actividad de la enfermedad (*disease activity index*).

DAMPs: Patrón molecular asociado a daños (*Damage-associated molecular patterns*)

DB: Dieta basal.

DB: Dieta basal.

dCaco-2: Células Caco-2 diferenciadas.

DE: Desviación estándar.

DMEM: Medio Dulbecco modificado de Eagle (*Dulbecco modified Eagle's medium*)

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

DSS: Dextrán sulfato de sodio.

EC: Enfermedad de Crohn.

EII: Enfermedades inflamatorias intestinales.

ELISA: Ensayo inmuno-absorbente vinculado a enzima.

eNOS: Sintetasa endógena de óxido nítrico.

ENSOD: Estrategia Nacional para la Prevención y el Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes.

ENTs: Enfermedades inflamatorias intestinales.

ER: Retículo endoplásmico.

ERNs: Especies reactivas de nitrógeno.

EROs: Especies reactivas de oxígeno.

FDR: False discovery rate.

FND: Fracción no digerible.

GALT: Tejido linfoide asociado a mucosa intestinal (*Gut-associated lymphoid tissue*).

GC-MS: Cromatografía de gases-espectrometría de masas.

GSH: Glutati6n.

HDAC: Histona deacetilasa.

HPLC: Cromatografía líquida de alto desempeño (*High-performance liquid chromatography*)

IC₅₀: Concentraci6n inhibitoria media.

ICR: Instituto de Investigaci6n del C6ncer (*Institute of Cancer Research*).

IEPS: Impuesto especial sobre producci6n y servicios.

IFN- γ : Interfer6n gamma.

IL: Interleucina

INIFAP: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

iNOS: Sintetaza inducible por óxido nítrico.

JAK: Cinatas tirosín de Janus.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LPS: Lipopolisac6rico.

LTB4: Leucotrieno B4.

MAdCAM: Molécula asociada a células de mucosa.

MAPK: Cinasas de proteína activadas por mit6geno (*Mitogen-activated protein kinases*).

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1.

MEM: Medio mínimo esencial de Eagle.

Mf: Macrófago.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

MLN: Módulo linfático mesentérico.

MMP: Metaloproteasa de matriz.

MPO: Mieloperoxidasa.

MPO: Mieloperoxidasa.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

NF- κ B: Factor nuclear κ B.

NK T: Célula T asesina natural (*natural killer*).

NLRP3: Proteína 3 contenedora de los dominios NACHT, LRR y PYD.

NO: Óxido nítrico.

NOD: Oligomerización enlazada a nucleótido (*Nucleotide oligomerization binding*).

NOM: Norma Oficial Mexicana.

ONOO⁻: peróxidonitrito.

PAMPs: Patrón molecular asociado a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*).

PBN: Población Blanca del Noroeste.

PC: Peso corporal.

PCR: Proteína C reactiva.

PGE₂: Prostaglandina E2.

RFU: Unidades relativas de fluorescencia.

RPM: Revoluciones por minuto.

RPMI: Medio Roswell-Park Memorial Institute (RPMI)

RT-PCR: Reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa reversa.

SFB: Suero fetal bovino.

SOD: Superóxido dismutasa.

SPME: Microextracción en fase sólida (*solid-phase microextraction*).

TEER: Resistencia eléctrica transepitelial.

TGF: Factor de crecimiento transformante.

T_H: Célula T cooperadora.

TLR4: Receptor similar a Toll 4.

TNB: Reactivo reducido de Ellman (ácido 2-nitrobenzoico).

TNBS: Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TNFR1: Receptor de TNF- α

T_{reg}: Célula T reguladora.

TUNEL: Transferasa de marcado final de corte de dUTP de terminal desoxinucleotidil.

UHPLC: Cromatografía líquida de ultra alto desempeño (*Ultra-high performance liquid chromatography*).

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

RESUMEN

Las condiciones inflamatorias intestinales son enfermedades no transmisibles vinculadas a factores de riesgo como la dieta. Botanas elaboradas con maíz (*Zea mays* L.) y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) podrían ser una alternativa de consumo por su contenido de compuestos bioactivos (compuestos fenólicos y componentes de la fibra, entre otros) con potencial antiinflamatorio. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto antiinflamatorio de una botana horneada de maíznixtamalizado y frijol común cocido (CBS) en modelos *in vitro* e *in vivo* de inflamación intestinal. El efecto de CBS fue evaluado en un monocultivo de macrófagos RAW 264.7 y en co-cultivo de macrófagos THP-1/células Caco-2 diferenciadas. Asimismo, se utilizaron ratones macho CD-1 (6-8 semanas de edad, n=9/grupo), a los que se les indujo colitis crónica (dextrán sulfato de sodio, DSS 2%, 6 semanas, G2-G5) y fueron distribuidos en cinco grupos: G1 (dieta basal, DB), G2 (2% DSS+DB), G3 (20 g CBS/kg peso corporal, PC+DB), G4 (40 g CBS/kg PC + DB), G5 (60 g CBS/kg PC + DB). La botana presentó compuestos fenólicos (ácidos: gálico, clorogénico, cafeico), oligosacáridos (verbascosa) y su extracto fermentado de fracción no digerible (EFFND), presentó diferentes metabolitos, entre ellos los ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, propiónico y butírico) (0.16-0.22 mM). En el monocultivo, en comparación con los macrófagos en el proceso proinflamatorio, EFFND redujo producción de óxido nítrico (72 %), H₂O₂ y citocinas (TNF- α , IFN- γ). En el co-cultivo, comparado con el estado proinflamatorio, EFFND redujo lactato deshidrogenasa (37.27 %), óxido nítrico sintetasa total (7.60 %), incrementó superóxido dismutasa (228.24 %); redujo producción de IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-18; y disminuyó apoptosis (17.85 %). Comparado con G2, el consumo de la botana (G4) previno pérdida de peso corporal (11.5 %) e incremento del índice de actividad de la enfermedad, evitó acortamiento del colon, redujo actividad de β -glucuronidasa fecal (8.6 %) y mieloperoxidasa colónica (10.4 %), proteínas proinflamatorias séricas (TNF- α , IL-1 β , MCP-1), y modulación de genes de la vía de TNF- α , TLR4 e IL-1. Concluyendo, el consumo de CBS tiene potencial antiinflamatorio modulando vías de inflamación vinculadas a TNF- α y el inflamasoma (IL-1 β).

Palabras Clave: Maíz (*Zea mays* L.), frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), inflamación intestinal, inflammasoma, TNF- α , IL-1

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ABSTRACT

Intestinal inflammatory conditions are non-communicable diseases linked to risk factors such as the diet. The proposal of healthy consumption choices like snack made from corn (*Zea mays* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (CBS) might be an adequate strategy for its content of bioactive compounds (phenolics and fiber components, among other) with anti-inflammatory potential. This project aimed to assess the anti-inflammatory effect of a baked nixtamalized corn and cooked common bean on *in vitro* and *in vivo* models of intestinal inflammation. The anti-inflammatory effect of CBS was evaluated on a RAW 264.7 monoculture and THP-1/differentiated Caco-2 cells co-culture. Likewise, chronic colitis was induced in male CD-1 mice (6-8 weeks age, n=9/group) using dextran sodium sulfate (2 % DSS, 6 weeks, G2-G5) and were distributed in 5 groups: G1 (basal diet, BD), G2 (2% DSS+BD), G3 (20 g CBS/kg body-weight, BW + BD), G4 (40 g CBS/kg BW + BD), G5 (60 g CBS/kg BW + BD). The snack contained phenolic compounds (gallic, chlorogenic, caffeic, and *p*-coumaric acids), and oligosaccharides (verbascose, stachyose). Furthermore, the snack extract derived from an *in vitro* gastrointestinal digestion exhibited several metabolites, short-chain fatty acids among them (acetic, propionic, and butyric acids). In the monoculture and compared with pro-inflammatory macrophages, FND reduced the production of nitric oxide (72 %), H₂O₂, and cytokines production (TNF- α , IFN- γ). In the co-culture, compared with the pro-inflammatory state, FND reduced lactate dehydrogenase (32.27 %), total nitric oxide synthase (7.60 %), increased superoxide dismutase (228.24 %); reduced the production of IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-18, caspase-1 activation, and apoptosis (17.85 %). Compared with G2, snack consumption (G3, G4) prevented body weight loss (11.5 %), colon shortening, the production of fecal β -glucuronidase (8.6 %) and colonic myeloperoxidase (10.4 %), pro-inflammatory seric proteins (TNF- α , IL-1 β , MCP-1), and the modulation of genes from TNF- α , TLR4 e IL-1 pathways. In conclusion, CBS consumption had anti-inflammatory potential modulating inflammatory pathways associated to TNF- α and the inflammasome (IL-1 β).

Keywords: Corn (*Zea mays* L.), common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), intestinal inflammation, TNF- α , IL-1

Dirección General de Bibliotecas UAQ

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ENTs) son un conjunto de padecimientos heterogéneos que agrupan diferentes condiciones como el sobrepeso, la obesidad, la diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares y cáncer, entre otras condiciones, que en conjunto constituyen la primera causa de muerte en el mundo (Bennett *et al.*, 2018). Tradicionalmente esta clase de patologías tienen mayor prevalencia en el medio urbano, en tanto que la desnutrición y las enfermedades agudas, principalmente infecciosas, son las de mayor incidencia en la población rural. Sin embargo, en México, en el medio rural cada vez son mayores los casos de ENTs: la diabetes es hoy uno de los principales problemas de salud en México, cuya prevalencia pasó entre 2000 y 2012 de 4.6 % (2.1 millones de personas) a 9.2 % (6.4 millones) en la población de 20 años o más; la hipertensión arterial en adultos mayores de 20 años se ha mantenido relativamente estable, si bien en 2012 el 47.3 % de esta población manifestaba síntomas de la enfermedad (Gutiérrez *et al.*, 2016).

Entre los diferentes factores de riesgo que han sido vinculados al padecimiento de las ENTs, la dieta y el estilo de vida asociados al ingreso económico han sido establecidos como los elementos más influyentes que alteran el curso de estas condiciones (Allen *et al.*, 2017). Esto ha motivado la necesidad de buscar alternativas dietarias, ya que la misma podría ser fuente de compuestos bioactivos que ayuden a reducir el efecto de las ENTs.

Dentro de esta perspectiva, el uso del maíz (*Zea mays* L.) y el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) podría tenerse en cuenta, puesto que es indiscutible el papel que han desempeñado en la historia de Mesoamérica, llegando a convertirse en los dos alimentos más importantes de la nutrición de grandes grupos poblacionales de América Latina (García-Lara & Serna-Saldivar, 2019; Luzardo-Ocampo *et al.*, 2018a). Hoy en día, el consumo de estos dos productos aporta importantes

nutrientes, haciendo relevante su ingesta, especialmente por el potencial nutracéutico que tienen (Loarca-Piña *et al.*, 2018).

La nixtamalización es un proceso de cocción térmico alcalina del maíz que permite hacer más accesible y biodisponible la proteína del grano e incorpora minerales a la matriz alimenticia como el calcio, permitiendo cambios fisicoquímicos que ayudan a la elaboración de una alta variedad de productos tradicionales en la dieta del mexicano (Santiago-Ramos *et al.*, 2018). Entre estos productos, las botanas son de alto consumo en México, pero tienen fama de ser consideradas productos de bajo nivel nutricional debido principalmente a técnicas de procesamiento como la fritura, que añaden cantidades considerables de aceite, relacionándose así con problemas de salud (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2018b).

Sin embargo, la alta demanda mundial de botanas hace relevante investigación en ingredientes saludables que permitan no solo satisfacer un antojo, sino aportar beneficios a la salud. Las combinaciones de maíz y frijol común podrían conformar una combinación saludable gracias a su perfil nutracéutico complementario, en el que las deficiencias en aminoácidos esenciales del maíz son cubiertas por un mayor y mejor perfil de aminoácidos de frijol, así como el aporte conjunto de compuestos bioactivos (polisacáridos, compuestos fenólicos, oligosacáridos, etc.) (Treviño-Mejía *et al.*, 2016).

Se ha reportado que gran parte de estos compuestos participan en la modulación de procesos inflamatorios, punto de partida de todas las enfermedades no transmisibles (Shivappa, 2019). Dentro de este grupo de patologías, las enfermedades inflamatorias intestinales ocupan un lugar especial como grupo de condiciones médicas de constante y rápido crecimiento, no sólo en México sino en muchos países. Entre estas condiciones, el tratamiento de la colitis crónica presenta el reto de ser una enfermedad de difícil diagnóstico, recurrente, y con tratamientos enfocados en prevenirla (Uhlir & Powrie, 2018).

La dieta podría generar un resultado diferencial en el tratamiento de la colitis ulcerosa. Se ha sugerido que las dietas altas en fibra como aquella aportada por las leguminosas podrían llevar al agravamiento de la colitis gracias a experimentos *in vivo* que han mostrado contribución de las mismas al agravamiento del daño de la mucosa colónica (Zhang *et al.*, 2014). A pesar de ello, estudios realizados en los últimos años han reportado que el consumo de frijol común cocido podría llevar a una reducción de numerosos biomarcadores de inflamación y el mejoramiento de la condición de colitis aunque igualmente han sido observados efectos adversos en colitis (Zhang *et al.*, 2014). No obstante, estos estudios no han profundizado del efecto preventivo del consumo de leguminosas, ni existen reportes relacionados con el tratamiento de colitis crónica a partir del consumo de botanas. Asimismo, se requiere investigar los efectos en la salud, validar el potencial nutracéutico de alternativas saludables de botanas y establecer mecanismos de acción derivados del consumo de matrices alimentarias.

II. ANTECEDENTES

II.1 Maíz (*Zea mays* L.)

II.1.1 Generalidades

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cereales más cultivados en el mundo, y junto con el arroz y el trigo comprenden casi el 60% de la ingesta energética mundial a partir de productos vegetales. Cerca de 2.5 millones de agricultores en México, uno de los mayores productores mundiales, se dedican al cultivo de maíz en forma de agricultura de subsistencia o a baja escala y la mayoría de ellos no tienen acceso a las variedades mejoradas de maíz, manteniendo incluso técnicas tradicionales de cultivo y el sistema de redes de intercambio de semillas (Ross-Ibarra *et al.*, 2017). Los múltiples usos que tiene el maíz lo han convertido en un alimento conveniente para un gran número de personas, principalmente en los países en vías de desarrollo de América Latina, África y Asia (Rosas-Castor *et al.*, 2014). Gracias a su alto valor nutricional, el maíz conforma cerca del 50 % al 70 % de la ingesta proteica y calórica diaria, respectivamente, si bien estos valores pueden variar de acuerdo con el país (García-Lara & Serna-Saldivar, 2019). Asimismo, su contenido de almidón (cerca del 72 %), 10 % de proteínas y 4 % de lípidos, proporcionan una densidad energética aproximada de 365 kcal/100 g, ayudando a integrar el grano dentro de la dieta humana (Ai & Jane, 2016).

México tiene uno de los mayores consumos *per cápita* en el mundo de maíz, casi 10 veces mayor que el de Estados Unidos de Norteamérica, haciendo que sea el cultivo, desde el punto de vista alimentario, político, económico y social, más importante del país (Rosas-Castor *et al.* 2014). Esto coincide en parte con que el país en mención sea el centro de origen, domesticación y diversificación del maíz, llegando a existir hasta 59 razas o variedades registradas, un porcentaje significativo del total de 220 a 300 razas de maíz que existen en el continente americano (Arteaga *et al.*, 2016).

En México el 60 % de la producción total de maíz es utilizada en el consumo humano, con un promedio *per cápita* de consumo de tortillas que en 2010 fue estimado como 217.9 g/día en zonas rurales y 155.4 g/día en zonas urbanas (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014), y se mantiene como un producto de la alimentación básica tanto en zonas urbanas y rurales, aunque es importante considerar que en estas últimas, el consumo de maíz depende de la producción local (Moreno *et al.*, 2016). Esto ha hecho de la tortilla el segundo producto más importante de la canasta básica de consumo (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2014).

II.1.2 Estructura y Composición Química

El grano de maíz, botánicamente hablando, es una cariósida formado por cuatro estructuras principales: el pericarpio o cáscara, el germen o embrión, el endospermo y la pilorriza (pedicelo o pedúnculo) como se muestra en la Figura 1 (Paredes-López *et al.*, 2013).

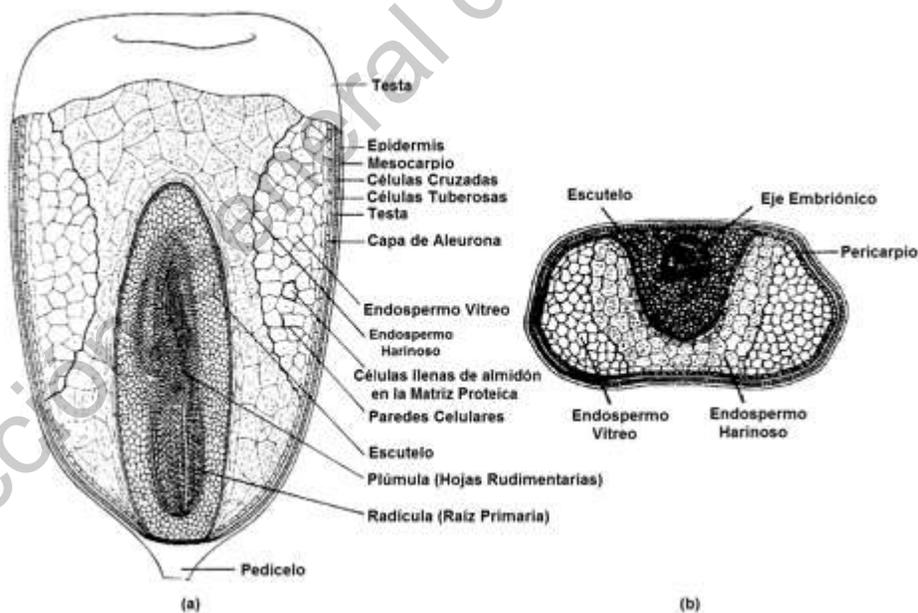


Figura 1. Corte longitudinal (a) y transversal (b) del grano de maíz (Delcour & Hoseney, 2010)

El pericarpio, cáscara o salvado tiene un elevado contenido de fibra cruda (87 %) constituida fundamentalmente de celulosa y hemicelulosa, que conforman una red que protege y contiene a las demás estructuras del grano. El resto de la composición química de la misma son cenizas, proteínas y azúcares (Paredes-López *et al.*, 2013).

El germen del grano contiene aproximadamente 34 % de lípidos, 19 % de proteínas y 28 % de materiales solubles (azúcares, proteínas hidrosolubles, vitaminas y minerales) y algunos materiales insolubles en menor proporción. En ésta sección del grano se encuentra cerca del 65 % del contenido total de albúminas y el 25 % del total de globulinas. El endospermo se clasifica en: duro (córneo y vítreo) y suave (opaco y harinoso); en el primero de ellos los gránulos de almidón están densamente empaquetados por una gruesa matriz proteica, mientras que en el segundo la matriz proteica es delgada. La piloriza es la sección que conecta al grano con la mazorca, actuando como vía de paso de nutrientes de la mazorca al grano (Paredes-López *et al.*, 2013).

Esta conformación estructural del grano es responsable del contenido nutricional del maíz, que va a depender de la variedad y condiciones ambientales donde se cultive, aunque en términos generales la composición química del grano se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición química porcentual del maíz discriminado por fracciones (%)

| Fracción del Grano | Grano | Proteína | Carbohidratos | | Lípidos | Cenizas |
|--------------------------------------|-------|----------|---------------|----------|---------|---------|
| | | | Almidón | Azúcares | | |
| Piloriza (Pedúnculo, Pedicelo) | 0.8 | 9.1 | 5.3 | 1.6 | 3.8 | 1.6 |
| Pericarpio | 5.3 | 3.7 | 7.3 | 0.3 | 1.0 | 0.8 |
| Germen | 11.5 | 18.8 | 8.2 | 10.8 | 34.5 | 10.1 |
| Endospermo | 82.3 | 9.4 | 86.4 | 0.6 | 0.8 | 0.3 |
| Grano Entero | 100 | 10.3 | 81.5 | 2.0 | 4.8 | 1.4 |

(Paredes-López *et al.*, 2013).

II.1.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son considerados como una de las más importantes fuentes de antioxidantes en cereales. La mayoría de los compuestos fenólicos conjugados son los flavonoides, donde los fenoles se encuentran enlazados principalmente a ácidos fenólicos (Singh & Sharma, 2017). Los compuestos fenólicos tienen uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo y son generalmente clasificados como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas y taninos. Estos son productos del metabolismo secundario de las plantas y proveen funciones esenciales en la reproducción y crecimiento de las mismas; actúan como mecanismos de defensa contra diferentes patógenos, enfermedades, parásitos y depredadores y contribuyen al color de las plantas (Stuper-Szablewska & Perkowski, 2019)

Entre los flavonoides, de los cuales se han identificado más de 4000, han sido descritos las flavonas (apigenina, luteolina), flavonoles (quercetina, miricetina), flavononas (naringenina, herperidina), catequinas (epicatequina, galocatequina), antocianidinas (cianidina, pelargonidina) e isoflavonas (genisteína, daidzeína), cuya principal diferencia química es la estructura genérica del anillo C o anillo heterocíclico oxigenado que tienen todos los flavonoides en su estructura (Stuper-

Szablewska & Perkowski, 2019). En cuanto a los ácidos fenólicos, éstos pueden ser subdivididos en dos grandes grupos: ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos. Algunos derivados de los primeros son el ácido *p*-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico y gálico (Heleno *et al.*, 2014). Respecto los ácidos hidroxicinámicos, se encuentran derivados de importancia como el *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, presentes en forma esterificada y unidos a los componentes de la pared celular estructural como celulosa, lignina y proteínas (Stuper-Szablewska & Perkowski, 2019).

El ácido ferúlico, o ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico, es uno de los fitoquímicos importantes del maíz y otros cereales y está presente principalmente en forma ligada a la pared celular de la planta. Los mayores contenidos de ácido ferúlico se encuentran en las variedades coloreadas de maíz, y se conoce que éste compuesto inhibe la oxidación de lípidos y protege a las células del daño oxidativo, es antiinflamatorio y se ha informado que tiene efectos antidiabéticos a través de la estimulación de la secreción de insulina. Tanto el ácido ferúlico como el ácido *p*-cumárico y sus derivados han sido relacionados con un amplio intervalo de bioactividad, entre los que destacan los efectos antioxidantes y anticarcinogénico. Gracias a la mayor permanencia del ácido ferúlico libre en la sangre que otros antioxidantes, es por ello que sus efectos benéficos son más duraderos y protege adecuadamente contra el ataque de radicales libres (Lao *et al.*, 2017).

II.1.4 Nixtamalización

Se denomina nixtamalización al proceso consistente en someter el maíz a un proceso térmico alcalino que lleva a la transformación del mismo en diversos productos, entre los que el más conocido es la tortilla, razón por la cual el proceso se realiza especialmente en los países que consumen ésta última. En algunas áreas de México y Centroamérica el procedimiento descrito se sigue llevando a cabo de manera doméstica, implicando un esfuerzo físico que requiere altas cantidades de energía y agua, proceso que permite obtener la apreciada tortilla, pero con un alto costo ambiental por el alto poder contaminante del proceso, lo que

ha llevado a nivel industrial a buscar alternativas más eficientes como la producción de harinas nixtamalizadas de forma comercial (Escalante-Aburto *et al.*, 2019).

El proceso básico de nixtamalización parte de maíz entero, el cual se mezcla con dos a tres partes de solución acuosa al 1% de hidróxido de calcio (Ca(OH)_2). La mezcla luego es calentada a 80 °C durante 20 a 45 minutos (con agitación) y se deja reposar durante la noche por espacio de 8 a 14 horas. Al día siguiente, el agua de remojo del maíz es descartada y el maíz remojado es lavado de dos a tres veces con agua limpia, removiendo la cáscara, la cápsula, eliminando el exceso de cal y posibles impurezas que pudiera haber tenido el grano. El agua de remojo se denomina “agua de nixtamal” (nejayote) y al maíz cocido obtenido “nixtamal”. Posteriormente, éste nixtamal es pasado por un proceso de molienda que permite obtener la harina, de la que se requieren sólo 50 g que al cocerse sobre un plato caliente o de barro (el “comal”) permite obtener las tortillas (Escalante-Aburto *et al.*, 2019).

El procedimiento antes descrito induce cambios en la estructura del grano del maíz, su composición química, propiedades funcionales y valor nutritivo. En términos generales, la nixtamalización permite el rompimiento parcial del pericarpio (facilitando el descascarado del grano e incrementando su suavidad y plasticidad), incrementa la concentración de calcio en el maíz a consecuencia de la ligadura entre el almidón y éste mineral y aumenta el porcentaje proteico (por la pérdida de la cáscara). Del mismo modo, produce pequeñas pérdidas de almidones y azúcares, pérdida del extracto etéreo del maíz, reducción del contenido de fibra cruda, pérdida de algunas vitaminas del complejo B e incremento del valor nutricional del maíz (por la liberación de aminoácidos y reducción del contenido de ácido fítico) (Paredes-López *et al.*, 2018).

II.2 Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

II.2.1 Generalidades

El frijol común se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, jugando un papel importante como cultivo tradicional y en la dieta de muchas personas (Loarca-Piña *et al.*, 2018b). Por su alto contenido proteico (20 – 25 %), entre las leguminosas constituye el tercer cultivo más importante del mundo luego de la soya y el cacahuate y es la leguminosa de mayor consumo humano en México, representando hasta un 36 % de la ingesta diaria de proteínas (Lara-Flores, 2015).

II.2.2 Estructura y Composición Química

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una importante fuente de proteínas, carbohidratos complejos, minerales y fibra dietaria (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2018b) En comparación con otros cultivares de frijol, se ha reportado que el cultivar Bayo Madero presenta bajos contenidos de lípidos (0.8 %) y proteínas (14.2 %), pero altos contenidos de fibra total (31 %). Asimismo, del cultivar Negro 8025, se ha reportado alto contenido de minerales (4.7 %) y mayores contenidos de fibra total en relación con otras variedades (37.7 %) (Suárez-Martínez *et al.*, 2016). La composición química y nutrimental del frijol destaca por su alto contenido de carbohidratos, entre los que la fibra constituye uno de sus mayores componentes (Paredes-López *et al.*, 2013) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición química del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

| | Aspecto Indicador | Contenido |
|-------------------------|-------------------|---------------|
| Composición Química (%) | Proteína | 14.00 – 33.00 |

| | | |
|------------------------|---|---------------|
| | Lípidos | 1.50 – 6.20 |
| | Total | 14.00 – 19.00 |
| | Fibra | |
| | Soluble | 3.10 – 7.60 |
| | Insoluble | 10.10 – 13.40 |
| | Cenizas | 2.90 – 4.50 |
| | Carbohidratos | 52.00 – 76.00 |
| Calidad de Proteína | Digestibilidad | 52.00 – 75.00 |
| | Relación de Eficiencia Proteínica | 0.70 – 1.50 |
| Aminoácidos Esenciales | Fenilalanina + Tirosina | 5.30 – 8.20 |
| | Isoleucina | 2.80 – 5.80 |
| | Leucina | 4.90 – 9.90 |
| | Lisina | 6.40 – 7.60 |
| | Metionina + Cisteína | 1.20 – 1.50 |
| | Treonina | 4.40 – 7.00 |
| | Triptófano | - |
| | Valina | 4.50 – 6.70 |
| Vitaminas (mg/100 g.) | Tiamina (B1) | 0.86 – 1.14 |
| | Riboflavina (B2) | 0.14 – 0.27 |
| | Niacina (B3) | 1.16 – 2.68 |
| | Piridoxina (B6) | 0.34 – 0.64 |
| | Ácido Fólico | 0.17 – 0.58 |
| Minerales (mg/100 g.) | Calcio | 9.00 – 200.00 |
| | Fósforo | 460.00 |
| | Cobre | 0.70 – 1.20 |
| | Hierro | 3.80 – 7.60 |
| | Magnesio | 200.00 |
| | Zinc | 2.20 – 4.40 |
| Otros Componentes | Taninos (mgeq.cat/g) ^a | 9.60 – 131.40 |
| | Inhibidores de Tripsina (UIT/mg) ^b | 13.00 – 29.00 |
| | Ácido Fítico (%) | 0.60 – 2.70 |

^a Miligramos equivalentes de catequina por gramo

^b Unidades de inhibición de tripsina por miligramo

(Paredes-López *et al.*, 2013)

Las proteínas del frijol común (Cuadro 2) tienen adecuada composición de aminoácidos aromáticos y algunos básicos pero es deficiente en algunos

aminoácidos esenciales como son los azufrados (metionina, cistina y triptófano), situación que puede ser compensada al combinar el frijol con cereales como el maíz o arroz. Otros componentes importantes del frijol lo constituyen las vitaminas del complejo B, algunos minerales como el hierro y otros componentes, considerados bioactivos, tales como antioxidantes y polifenoles (Paredes-López *et al.*, 2013).

II.2.3 Compuestos bioactivos

Los ácidos fenólicos son uno de los más importantes componentes bioactivos de los frijoles asociados a beneficios a la salud. El color de la cubierta de los frijoles se atribuye a la presencia y cantidad de polifenoles como los flavonoles, glicósidos, taninos condensados y antocianinas, y muchos de ellos dependen de los cultivares y las clases comerciales. Los frijoles blancos contienen significativamente menos compuestos fenólicos que los coloreados, los cuales tienen cantidades en orden decreciente: rojo pequeño, pinto, red kidney oscuro, negro, Great Northern y blanco. De los polifenoles del frijol común se ha reportado su importante efecto antioxidante, antiproliferativo e inductor de apoptosis en diferentes líneas de cáncer (Campos-Vega *et al.*, 2017; Monk *et al.*, 2015)

II.2.3.1 Flavonoides

Los flavonoides son los constituyentes monoméricos de los taninos condensados, aunque también es muy común encontrarlos como monómeros libres (Shahidi & Chandrasekara, 2017). Se ha reportado que los compuestos flavonoides en frijol tienen actividad biológica tanto *in vitro* como *in vivo*. Los principales compuestos flavonoides extraídos de frijol son las antocianinas y proantocianidinas, que han mostrado actividad antioxidante (principalmente debido a su capacidad para formar complejos con metales) y antimutagénica. Estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de alimentos ricos en flavonoides protege contra enfermedades asociadas al estrés oxidativo (Chavez-Santoscoy *et al.*, 2014).

II.2.3.2 Fibra Dietaria

La fibra dietaria es definida por la Asociación Americana de Químicos de Cereales (AACC) como las partes comestibles de plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión, conformando la fracción no digerible (FND) y absorción en el intestino delgado humano con una fermentación completa o parcial en el intestino grueso. Está conformada de polisacáridos (como celulosa, hemicelulosa y pectinas), oligosacáridos, lignina, compuestos fenólicos y péptidos, entre otros. La celulosa es el mayor componente de la fibra cruda en frijoles (red kidney, navy, pinto, rosado y caupí, *Vigna unguiculata*), mientras que el contenido de fibra dietaria total depende de la variedad de frijol que se considere (Campos-Vega *et al.*, 2017).

La fibra, por su solubilidad, puede clasificarse en soluble o insoluble. La fibra soluble se constituye de gomas, pectinas, mucílagos, insulina, almidón resistente y oligosacáridos como rafinosa, estaquiosa y verbascosa. Al entrar en contacto con el agua conforma un retículo en donde queda atrapada, participando en la generación de soluciones de alta viscosidad, que tiene importancia metabólica al ayudar en la estabilización de los niveles de glucosa en sangre y concentración de insulina postprandial, además de que contribuye a la reducción de colesterol sérico asociado a la pérdida de ácidos biliares a través de la materia fecal. Respecto a la fibra insoluble, se ha establecido un enlace metabólico entre su consumo y efectos sistémicos en la salud, por ejemplo, en la reducción del riesgo de diabetes tipo 2 gracias a la mejora de la sensibilidad a la insulina y la modulación de marcadores inflamatorios así como influencia directa e indirecta en la microbiota del tracto gastrointestinal e incremento del tiempo de tránsito alimenticio (Campos-Vega *et al.*, 2017).

En su fermentación por la microbiota colónica, la fibra soluble es sustrato de la microbiota colónica para la producción de ácidos grasos de cadena corta (principalmente ácidos acético, propiónico y butírico) que conforman nutrientes importantes para las células colónicas al ayudar a la absorción de agua y minerales y conferir protectores en cáncer de colon (Loarca-Piña *et al.*, 2018). Se ha reportado

que los productos derivados de la fermentación colónica *in vitro* de frijol común Bayo Madero ha demostrado ejercer efecto antiproliferativo en células de adenocarcinoma colónico HT-29. De estos productos, los ácidos grasos de cadena corta, especialmente el propiónico y el butírico eran los responsables de esta inhibición en un 35 %, siendo el efecto producido de manera dosis-dependiente (Campos-Vega *et al.*, 2017).

Además, los autores reportaron que el extracto de la fermentación colónica estimulaba la apoptosis celular por medio de la inducción de la Caspasa 3 y reduciendo la mutación de la proteína supresora de tumores p53 (medida por la técnica de TUNEL). Asimismo, el estudio encontró evidencia significativa de mayor expresión de la molécula p21CIP1 (uno de los inhibidores de quinasas ciclino dependientes), inhibición de la actividad del factor de transcripción pro inflamatorio NF- κ B y de HDAC1 (Histona Deacetilasa, involucrada en el crecimiento de las células HT-29 de cáncer de colon) (Campos-Vega *et al.*, 2017).

II.3 Fracción no digerible y efectos asociados en la salud

La fracción no digerible es aquella porción de los alimentos que resiste el paso por el tracto gastrointestinal, esto es, el ataque enzimático y cambios de pH y temperatura, para pasar al colon y ser factible de ser fermentada por la microbiota colónica para así generar diferentes metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC: acético, propiónico y butírico). Está compuesta principalmente por carbohidratos no digeribles tales como oligosacáridos de la familia de la rafinosa (rafinosa, estaquiosa y verbascosa), celulosa, lignina, pectina, galactosa, arabinosa, mucosa y xilosa (Campos-Vega *et al.*, 2017). Otros componentes de la fracción no digerible o indigerible son proteína (péptidos resistentes), algunos polifenoles (ácidos fenólicos, taninos condensados y flavonoides, entre otros) y compuestos asociados, así como almidón resistente, algunos minerales fuertemente unidos a la pared celular vegetal (aunque son una fracción menor o de baja importancia analítica) (Campos-Vega *et al.*, 2017).

Se han asociado varios efectos a la salud gracias a la fracción no digerible (FND). Por ejemplo, los productos de la FND de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido var. Bayo Madero generó reducción del desarrollo de fosas crípticas aberrantes en ratas con cancer colorectal inducido químicamente con azoximetano, regulando la expresión de genes involucrados en proliferación celular, arresto al ciclo celular y apoptosis tales como β -catenina, p53, p21, Rb, Bax y caspasa-3. Asimismo, dicha FND proveyó protección contra etapas tempranas de cáncer de colon inducido químicamente al suprimir fosas crípticas aberrantes y atenuar la actividad de β -glucuronidasa, enzimas que están involucradas con la hidrólisis de conjugados glucurónidos, permitiendo la potencial liberación de carcinógenos activos en el lumen intestinal (Campos-Vega *et al.*, 2017).

Estos componentes del extracto fermentado de FND también han demostrado tener efectos transcripcionales en el perfil de expresión de genes del tejido de colon distal mediante la transducción de señal de Tp53, como fue demostrado en un modelo *in vivo* de etapa temprana de cáncer de colon, mostrándose diferencias significativas en 72 genes de la señalización mediada por Tp53, vías involucradas en apoptosis, regulación y arresto del ciclo celular (etapas G1/S y G2/M), inhibición de la proliferación e inflamación, así como reparo del ADN (Campos-Vega *et al.*, 2017).

En células HT29 tras exposición a extracto fermentado de FND de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido, var. Bayo Madero, se encontraron diferencias significativas en 72 de 84 genes de transducción de respuesta mediada por p53, involucrados en apoptosis, ciclo regular y proliferación celular. Genes apoptóticos, SIAH1, PRKCA y el gen de la regulación negativa del ciclo celular MSH2 fueron los genes mayormente regulados de forma positiva, en tanto que CHEK1 y GADD45A fueron los mayormente regulados de forma negativa (genes del ciclo celular) (Campos-Vega *et al.*, 2017).

II.4 Inflamación

La inflamación es un proceso fisiológico que inicia como respuesta a la infección bacteriana o daño en tejidos. Los macrófagos son la primera línea de defensa del sistema inmune contra el ataque de agentes nocivos en los que estímulos inflamatorios como los lipopolisacáridos (LPS) activan a estos para que produzcan citocinas variadas pro inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL-1 β o IL-6) así como mediadores pro inflamatorios como prostaglandina E₂ (PGE₂) y óxido nítrico (NO), que son sintetizados por la familias de ciclooxigenasas (COX) y la sintetasa inducible por óxido nítrico (iNOS), respectivamente (García-Lafuente *et al.*, 2014)

II.4.1 Importancia y papel del óxido nítrico (NO) en la inflamación

El óxido nítrico es una molécula señalizadora gaseosa que regula varias respuestas fisiológicas y patofisiológicas en el cuerpo humano, incluyendo la circulación y función sanguínea, función de plaquetas, defensa del huésped y neurotransmisión en el sistema nervioso central y nervios periféricos. Desde ello, un gran número de reportes de los efectos del óxido nítrico en las respuestas inflamatorias han sido publicados. Se producen altos niveles de óxido nítrico en respuesta al estímulo inflamatorio y median en los efectos proinflamatorios y destructivos. Sin embargo, como otros mediadores inflamatorios, el NO también tiene efectos protectores en algunas de las respuestas inflamatorias (Förstermann *et al.*, 2017)

El óxido nítrico es sintetizado de la L-arginina en una reacción catalizada por las enzimas de la familia de la Óxido Nítrico Sintetasa (NOS). Las NOS activas son un tetrámero formado por dos proteínas NO y dos moléculas de calmodulina. La conversión de L-arginina a NO y L-citrulina requiere igualmente NADPH y O₂ como co-substratos y 6R-tetrahidrobiopterina (BH₄), FAD, FMN y protoporfirina IX de hierro (hemo) como co-factores. Las tres isoformas diferentes de NOS han sido caracterizadas; la neuronal (nNOS o NOS I) se expresa predominantemente en neuronas del cerebro y en el sistema periférico central; la NOS endotelial (eNOS o NOS III) se expresa principalmente en las células endoteliales (aunque tanto eNOS

como nNOS se expresan de forma constitutiva y están inactivas en las células en reposo). El incremento en las concentraciones de calcio (Ca^{2+}) estabiliza el enlace de calmodulina con eNOS e nNOS y activa a la enzima para producir NO. El estímulo que incrementa el aumento del calcio (por ejemplo: acetilcolona en las células endoteliales) desencadena la producción de NO, y cuando caen las concentraciones de calcio, cesa la producción de NO. La tercera isoforma de NO es la sintetasa inducida (iNOS o NOS II), cuya expresión se encuentra en la mayoría de las células en reposo. La exposición a productos microbianos como los lipopolisacáridos (LPS) y dsARN o citocinas proinflamatorias como IL-1, TNF- α e IFN- γ induce a la expresión del gen de iNOS en varios tejidos celulares. El enlace de calmodulina a iNOS es fuerte incluso en bajas concentraciones de calcio, y por tanto iNOS es también una NOS dependiente de calcio, y puede producir de forma constante altos niveles de NO por períodos prolongados (Griffiths *et al.*, 2017) (Figura 2).

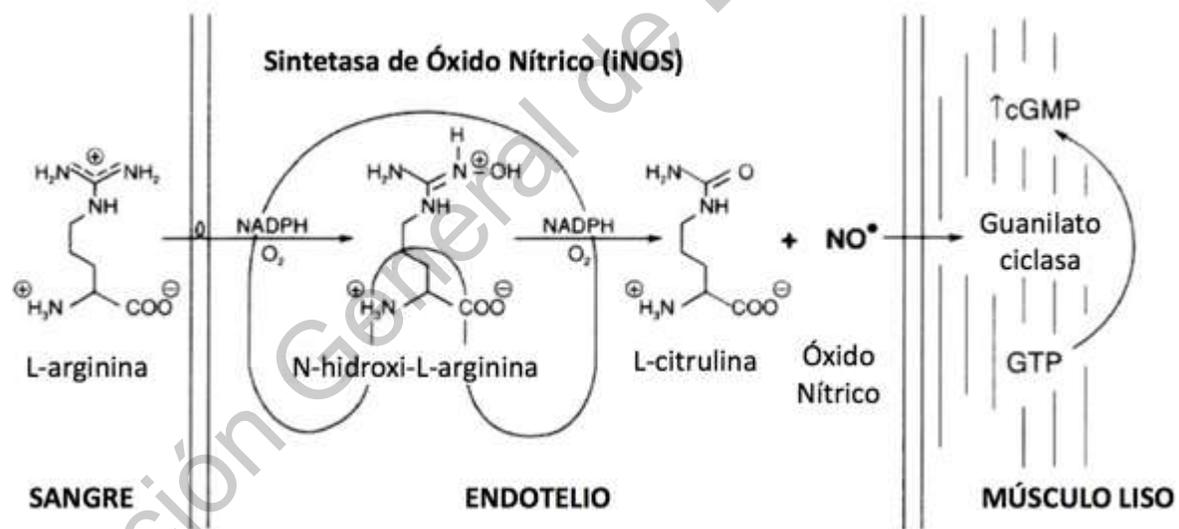


Figura 2. Producción de Óxido Nítrico (ON) a partir de L-arginina y con participación de la enzima Sintetasa de Óxido Nítrico (SON) (Griffiths *et al.*, 2017).

El ON producido por los macrófagos, debido a que actúa como un radical libre, es citotóxico para ciertos microorganismos y células tumorales ya que tiene la capacidad de oxidar grupos sulfhidrilos de las proteínas, así como reaccionar con el anión superóxido para formar dióxido de nitrógeno (NO_2) y radical hidroxilo (OH^\bullet),

sustancias fuertemente oxidantes (Bogdan, 2015). Es importante establecer que la producción de óxido nítrico no es necesariamente un indicador negativo. De hecho, a nivel vascular ayuda a la vasodilatación y tiene efectos antiinflamatorios (ya que inhibe la adhesión de leucocitos al endotelio vascular (modulando las moléculas de adhesión endotelial) y secuestra los aniones superóxido al reaccionar con ellos por su baja vida media al tener un par de electrones desapareado). Sin embargo, su producción irregular provoca cambios en la adhesión de dichos leucocitos, en la producción de moléculas de adhesión asociadas y estimula el proceso inflamatorio (Griffiths *et al.*, 2017).

El mecanismo molecular a través del cual el NO participa puede ser estructurado en tres partes, en su orden (Griffiths *et al.*, 2017):

- El óxido nítrico reacciona continuamente con metales de transición como hierro, cobre y zinc. Estos metales son abundantes en los grupos prostéticos de las enzimas y otras proteínas y por dicho mecanismo el NO regula la actividad de varias enzimas (efecto directo del óxido nítrico).
- El NO es capaz de inducir a la formación de S-nitrotioles a partir de residuos de cisteína en una reacción llamada S-nitrosilación, la cual puede modificar la actividad de varias proteínas involucradas en mecanismos reguladores (efecto indirecto del óxido nítrico).
- El NO reacciona muy rápidamente con el anión superóxido, provocando la formación de peróxidonitrito (ONOO^-), un agente nitrante y poderoso oxidante que modifica proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (efecto indirecto del óxido nítrico).

A bajas concentraciones de óxido nítrico ($< 1\mu\text{M}$) predomina el efecto indirecto, pero a mayores concentraciones ($> 1\mu\text{M}$) predomina el directo. La excesiva formación de peróxidonitrito provoca proteínas nitradas, inhibición de la respiración mitocondrial, agotamiento de la energía celular, daño al ADN, apoptosis y muerte celular por necrosis, provocando daño en tejidos. La nitración de proteínas y

enzimas modula su actividad catalítica, señalización celular y organización citoesquelética. Asimismo, es de interés que la actividad de iNOS es regulada por ONOO⁻ por medio de la nitración, disminuyendo su actividad catalítica, siendo esto un proceso regulatorio en pacientes con sepsis (Griffiths *et al.*, 2017).

iNOS sólo es detectado en el tejido inflamado y es el responsable por la excesiva generación de especies reactivas de nitrógeno (ERNs) en los macrófagos activados, leucocitos y células epiteliales de la mucosa intestinal. Se ha demostrado que en colitis ulcerosa, la activación de iNOS/ciclooxigenasa-2 (COX-2)/5-lipooxigenasa (5-LOX) aumenta y los contenidos incrementados de productos finales como NO, prostaglandina E2 (PGE2) y leucotrieno B4 (LTB4) contribuyen al daño de la mucosa intestinal por la sobreproducción de radicales libres y la discapacidad del sistema antioxidante. Además, el NO derivado de iNOS reacciona con tirosina para producir nitrotirosina, asociada a la infiltración de neutrófilos en el epitelio de pacientes con CU (Piechota-Polanczyk & Fichna, 2014)

El óxido nítrico también está involucrado en la modulación de varios factores de transcripción inflamatorios tales como (Griffiths *et al.*, 2017):

- **Vía de NF- κ B:** La familia de factores de transcripción de NF- κ B tiene un papel central en la regulación de las respuestas inflamatorias de las células de mamíferos, incluyendo la proliferación de células T y B, expresión de citocinas y moléculas de adhesión, así como la regulación de apoptosis. La activación de NF- κ B está involucrada en varios estados patológicos como asma, artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal. La activación de NF- κ B es esencial en la expresión de iNOS y NO regula varios puntos de la cascada de activación de NF- κ B. NO ha mostrado capacidad para inhibir la actividad de NF- κ B por medio de la S-nitrosilación de la subunidad p50. Además, NO puede positivamente modular NF- κ B afectando las cascadas que regulan a la activación de NF- κ B. Un objetivo de p21ras, que es activado por el estrés oxidativo y provoca un incremento en la actividad de NF- κ B. p21ras es activado

por el NO a través de la S-nitrosilación del residuo 118 de cisteína. La disociación de I κ B a través de NF- κ B provoca la activación de éste último y está regulado por la enzima IKK. La transcripción y degradación de IKK puede ser modulada por NO, donde bajas concentraciones NO tienen un efecto contrario.

- **Vía de AP-1:** AP-1 es un factor de transcripción heterodimérico que consiste en las unidades c-fos y c-jun. NO regula la actividad de AP-1 en los sistemas biológicos aunque parece ser específico de células y dependiente de la concentración. NO puede regular de forma positiva la expresión de c-fos por un mecanismo dependiente de cGMP. NO también puede mejorar la expresión de AP-1 dependiente de genes a través de la activación de JNK. Además, ha sido reportada la inhibición de la transcripción de AP-1 dependiente de la S-nitrosilación de c-fos y c-jun.
- **Vía Jak-STAT:** La familia de miembros de las Janus Tirosín cinasas (Jak1, Jak2, Jak3 y Tyk2) se expresan ubicuamente y están involucradas en la regulación de varias funciones celulares. En ellas convergen señales extracelulares de la superficie celular hacia las proteínas Stat, que en compensación activan respuestas transcripcionales dentro de las células, llevando a la adaptación hacia un ambiente extracelular alterado. NO participa en la inhibición de las actividades de Jak2 y Jak3.

II.4.2 Papel antiinflamatorio de polifenoles y ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Evidencia epidemiológica ha indicado que las dietas ricas en frutas y vegetales podrían reducir la incidencia de ENT que comparten un componente antiinflamatorio, efecto atribuido parcialmente a la presencia de diversos componentes antioxidantes, principalmente compuestos fenólicos, aunque gran parte de su actividad no puede ser explicada únicamente sobre la base de ésta capacidad antioxidante, ya que otras investigaciones han demostrado su acción como

secuestrantes de radicales, modulando procesos de señalización celular durante la inflamación (García-Lafuente *et al.*, 2014).

García-Lafuente *et al.* (2014) evaluaron en un modelo *in vitro* de macrófagos murinos 264.7 estimulados por lipopolisacáridos (LPS) el efecto anti oxidante y anti inflamatorio de extractos metanólicos ricos en compuestos fenólicos provenientes de frijol *white kidney* (WKB) y *round purple* (RPB), encontrando que RPB (con altas cantidades de proantocianidinas, glucósidos de catequina y ácido sinápico) exhibía mayor capacidad antioxidante y mejor efecto anti inflamatorio que WKB (conformado principalmente por ácidos fenólicos) al reducir la producción de óxido nítrico (NO) y de interleucinas IL-1 β y IL-6, y la expresión del dímero proteico NF- κ B p65, pero no ejercían efecto significativo en la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Moreno-Jiménez *et al.* (2015) evaluaron los efectos anti inflamatorios y antioxidantes de extractos metanólicos de cuatro variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Negro 8025, Bayo Victoria, Pinto Durango y Pinto Saltillo) al ser procesados por enlatado (*canning*) y ebullición en recipiente abierto, en un modelo *in vitro* de células de cáncer de colon (HT-29), encontrándose que éste proceso térmico en las variedades de frijol degrada parcialmente algunos compuestos fenólicos pero incrementa la producción de otros de un modo cultivar-dependiente. Asimismo, se encontró que los extractos reducen, de modo cultivar-dependiente, la expresión de la enzima COX-2 e inhiben la producción de las proteínas pro inflamatorias TNF- α , NF- κ B e IL-8 (especialmente en las variedades Negro 8025 y Pinto Saltillo), aunque también inducen la expresión de proteínas anti inflamatorias como IL-10 y COX-10 (principalmente Bayo Victoria).

II.4.3 Enfermedades Inflamatorias Intestinales (EII)

II.4.3.1 Generalidades de la enfermedad inflamatoria intestinal

Las Enfermedades Inflammatorias Intestinales (EII) son enfermedades reincidentes y crónicas cuyo elemento distintivo es una inflamación crónica no controlada de la mucosa intestinal y de acuerdo con la Sociedad Británica de Gastroenterología, las dos características más distintivas de una EII idiopática son (Ungaro *et al.*, 2017):

- **Deformación de la arquitectura colónica:** Es un parámetro cuyos criterios varían mucho entre autores, e incluyen elementos como criptas no paralelas, ramificación, variación del diámetro, aumento de la distancia entre criptas y la mucosa muscular.
- **Incremento de celularidad en la lámina propia:** Es la infiltración aumentada de neutrófilos en la fase temprana de inflamación, con presencia de plasmacitosis basal o agregados linfoides.
- **Plasmacitosis basal:** es la presencia de células plasmáticas alrededor de la lámina propia (profundidad a 1/5 de la lámina propia) o por debajo de las criptas, junto o penetrando la capa muscular de mucosa. La sensibilidad de este parámetro es baja porque sólo el 69% de los pacientes muestran esto en su primera biopsia, aunque es muy específico porque sólo el 3% de los pacientes con colitis aguda autolimitante la presentan.
- **Agregados linfoides:** son colecciones nodulares de linfocitos entre la base de la cripta y la capa doble muscular de la mucosa. Al menos se requieren dos agregados para que se considere anormal. Cerca de un 50% de los pacientes con la EII los presentan.
- **Cambios estromales:** Es el aumento del espesor muscular de la mucosa o de la capa doble muscular de la mucosa, siendo común en CU activa de larga duración.
- **Ileítis por reflujo:** Es la inflamación íleal, caracterizada por inflamación activa de las vellosidades y la lámina propia, junto al acortamiento y atrofia de las vellosidades.

Las EII agrupan principalmente dos condiciones, la Enfermedad de Crohn (EC) como la colitis ulcerosa crónica idiopática (CUCI) y afecta a millones de personas

alrededor del mundo (Ungaro *et al.*, 2017). Aunque la CU y la EC son generalmente aceptadas como condiciones clínicas distintivas con hallazgos diferentes a nivel clínico, anatómico e histológico, su diagnóstico aún sigue siendo difuso. Por ello, se ha dicho que las dos condiciones probablemente representan un espectro de enfermedad en que ambas corresponden a finales diferentes. Además, existe todo un conjunto de enfermedades para cada desorden que es llamado “colitis ulcerosas” o “enfermedades de Crohn” (Ungaro *et al.*, 2017).

La relevancia de muchos cambios observados en la EII aún sigue sin claridad. De modo general, se ha identificado que la enfermedad inflamatoria intestinal consta de cuatro fases (Neurath, 2014):

- En la **Fase I** o **Etapa Previa a la Enfermedad**, es aquella en la que la presencia de factores genéticos del organismo como las quimiocinas o citocinas propias del desarrollo microbiano; o factores ambientales como la dieta, los microorganismos naturalmente presentes, infecciones y estrés, entre otros elementos, actúan como alteradores de la función de la barrera intestinal.
- En la **Fase II** o de **Inflamación Intestinal Aguda**, la disrupción y destrucción de la función membranal provoca la traslocación de muchos de los metabolitos microbianos hacia el interior de los enterocitos. Esto lleva a una activación de las células del sistema inmune
- En la **Fase III** o de **Cronicidad o Resolución**, células del sistema inmune, tales como las Células Presentadoras de Antígenos (APC, por sus siglas en inglés) como los macrófagos, y las células T efectoras, producen mediadores proinflamatorios, que en su constante generación desencadenan cambios metabólicos.

La presencia de una inflamación activa en pacientes con Colitis Ulcerosa se asocia a una fase aguda de migración de leucocitos hacia el tracto gastrointestinal, lo que es transferido hacia la producción de varias proteínas, muchas de ellas detectadas en el suero o las deposiciones fecales. La evaluación de si la inflamación está presente o no en la mucosa, por tanto, es

importante en el manejo de pacientes con UC puesto que los tiempos de recaída son muy altos si incluso una inflamación mínima permanece en los pacientes que tienen una remisión clínica (Ungaro *et al.*, 2017).

- Para la última etapa, **Fase IV** o **Inflamación Crónica**, se pueden generar condiciones intestinales como fibrosis y cáncer colorrectal, entre otras.

II.4.4 Colitis Ulcerosa (CU)

II.4.4.1 Generalidades de la colitis ulcerosa

Las EII afectan a aproximadamente 1.4 millones de estadounidenses, siendo bastante comunes en personas entre los 15 y 30 años de edad. La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria idiopática que afecta al colon, generalmente de adultos entre los 30 y 40 años de edad, provocando su discapacidad. Se caracteriza por una inflamación reincidente en la mucosa, iniciando en el recto y extendiéndose hasta los segmentos proximales del colon (Ungaro *et al.*, 2017).

El objetivo de la terapia en colitis es inducir y mantener una reducción de los efectos de la enfermedad a nivel clínico y endoscópico. Los aminosalicilatos son la principal selección de tratamiento para la colitis ulcerosa leve o moderada, aunque los esteroides tópicos y sistémicos pueden ser utilizados para el tratamiento de colitis benignas, mientras que los inmunosupresores y medicamentos biológicos son utilizados en la enfermedad moderada o severa. La colectomía es necesaria en cerca del 15% de los pacientes con CU. Los costos anuales e indirectos asociados a la CU se estiman que son entre 12.5 a 29.1 millones de euros en Europa y de 8,100 a 14,900 millones de dólares en Estados Unidos (Ungaro *et al.*, 2017).

No existe vinculación al género en colitis. Su incidencia se ha incrementado a nivel mundial, reportándose los mayores casos en el norte de Europa (0.02%), Canadá (0.019%) y Australia (0.017%). Su prevalencia tiene los mayores niveles en Europa (0.05%), Canadá (0.024%) y Estados Unidos (0.02%). Los casos están

aumentando también en otras regiones del mundo como Asia, Medio Oriente y Sudamérica (Ungaro *et al.*, 2017).

En México, no hay datos específicos para la enfermedad, pero para CU se estima que ha habido un aumento en estas patologías, llegándose a diagnosticar con ellas hasta 76 pacientes por año cuando para la década pasada la cifra promedio no sobrepasada por 28 (Bosques-Padilla *et al.*, 2011). Rodríguez-Leal (2001), para la década pasada, estimó la incidencia de CU entre el 0.2 % y 4.89 % de la población, mientras que para EC entre el 0.0008 % hasta 1.11 %. Yamamoto Furusho (2015) reporta que las tasas más altas de EII en el mundo se encuentran en América del Norte, reportando para CU y EC, respectivamente, 19.2 y 20.2 casos por cada 100 mil habitantes (Neurath, 2014).

La EC generalmente involucra el íleon y el colon, pero puede afectar cualquier región del intestino. La CU involucra el recto y podría afectar parte del colon, su totalidad (pancolitis) o hacerlo en un patrón ininterrumpido. Aunque es un reto la distinción entre las dos enfermedades, se sabe que la CU está condicionada por linfocitos cooperadores tipo 2 (T_H2), mientras que en EC son de tipo 1 (T_H1). Los pacientes que padecen estas enfermedades están en riesgo de padecer colangitis esclerosante primaria, espondilitis anquilosante y psoriasis, aunque se ha reportado que la CU está vinculada al desarrollo de cáncer colorrectal, una de las consecuencias más agravantes de esta enfermedad (Ungaro *et al.*, 2017).

La farmacoterapia para EII incluye el uso de medicamentos antiinflamatorios y anticuerpos monoclonales anti factor de necrosis tumoral α (TNF- α), pero estos tratamientos no curan la enfermedad. Asimismo, la colectomía es inadecuada para el control de la inflamación, por lo que varios estudios han investigado el papel de la dieta en la prevención de la EII y su tratamiento (Martin & Bolling, 2015).

Muchos de los factores de riesgo varían por países. Por ejemplo, la apendicectomía no parece disminuir el riesgo, mientras que el suministro de antibióticos fue protector cuando se comparan los países desarrollados con aquellos en vías de desarrollo de Asia o Medio Oriente. En países europeos no se encontraron

asociaciones entre el estrés y el inicio de la colitis. Los principales factores de riesgo son (Ungaro *et al.*, 2017):

- **Historial familiar de enfermedad inflamatoria intestinal (EII):** Se presenta del 8-14% de los pacientes. Los familiares de primer grado tienen cuatro veces mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad.
- **Componente étnico:** La población judía tiene mayores tasas de desarrollo de la enfermedad que otros grupos étnicos.
- **Análisis genómicos:** Se han identificado cerca de 200 locus de riesgo para EII hasta el momento, donde la mayoría de los genes contribuyen a fenotipos tanto de CU como EC. Los más reconocidos hasta el momento son los antígenos leucocitarios y los genes asociados a la función de barrera como HNF4A y CDH1. Sin embargo, la genética sólo explica el 7.5% de la variación de la enfermedad y tienen poca capacidad predictiva en el fenotipo, además de que su uso clínico es limitado.
- **Factores ambientales:** El historial de tabaquismo es uno de los mayores factores de riesgo asociados a CU, mientras que los fumadores activos tienen menor tendencia al desarrollo de CU en comparación con no fumadores y fumadores inactivos. Asimismo, presentan una evolución de la enfermedad más leve. La apendicectomía parece que confiere un efecto protector contra el desarrollo de CU, especialmente cuando ha sido hecha para apendicitis aguda en pacientes jóvenes. Los pacientes recientemente diagnosticados con CU generalmente coinciden con episodios de gastroenteritis. El consumo de medicamentos, como anticonceptivos orales, o de terapia de reemplazo hormonal y medicamentos antiinflamatorios no esteroideos han sido asociados con un incremento en el riesgo de desarrollo de la enfermedad, mientras que la exposición a antibióticos no lo es. La lactancia materna al parecer disminuye el riesgo, mientras que la vida urbana lo incrementa.

Los principales síntomas de colitis son la sangre en las heces y la diarrea. Cerca el 15% de los pacientes incluso presentan la severidad de estos síntomas al inicio de

la enfermedad. Otros síntomas pueden ser incontinencia, fatiga, aumento incrementado de los movimientos intestinales, descarga de mucosa, defecaciones nocturnas, incomodidad intestinal, a veces dolor abdominal. En el caso de severidad de la enfermedad, puede presentarse fiebre y pérdida de peso. Dependiendo de la extensión de la enfermedad, la colitis ha sido clasificada en tres tipos (Figura 3) (Ungaro *et al.*, 2017).

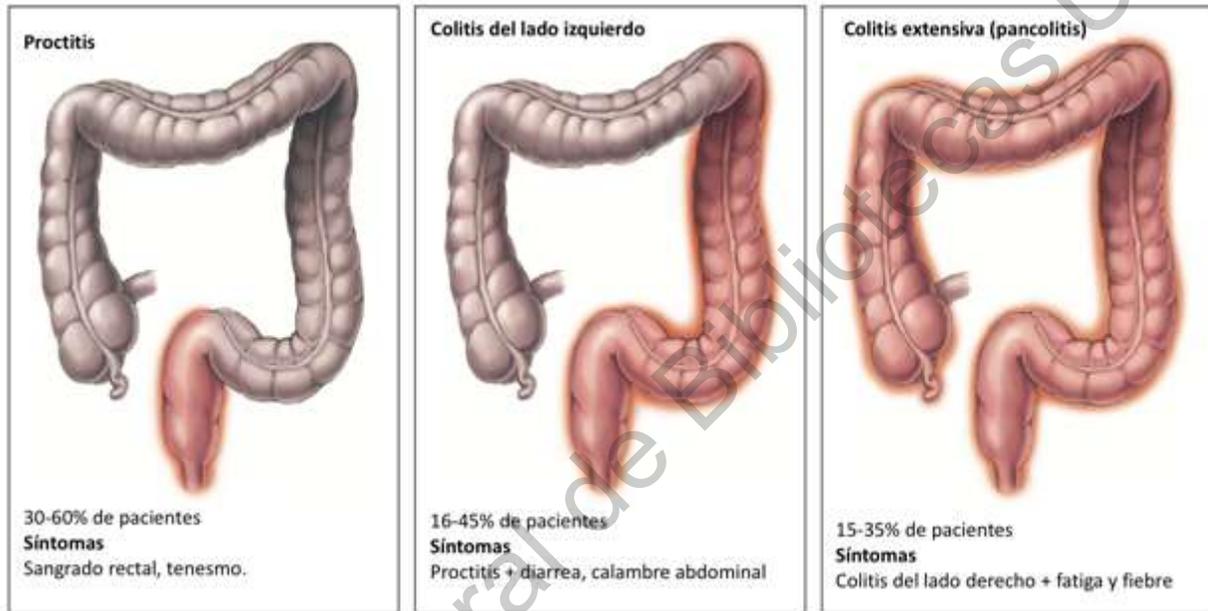


Figura 3. Principales fenotipos de colitis de acuerdo con la clasificación de Montreal. Los síntomas y la estrategia de tratamiento podrían variar de acuerdo a la extensión de la enfermedad (Ungaro *et al.*, 2017).

En estudios poblacionales diversos, hasta un 30-60% de pacientes presenta proctitis, 16-45% colitis del lado izquierdo y del 14-35% pancolitis extensiva. Hasta el 10% de los pacientes con proctitis o colitis del lado izquierdo puede sufrir de estreñimiento. La examinación física podría revelar signos de anemia, sensibilidad abdominal y sangrado rectal. La distensión abdominal podría ser indicadora de dilatación colónica, requirieron adecuada evaluación radiológica. Los pacientes con colitis ulcerosa pueden presentar fisuras anales o de piel debido a la irritación por diarrea (Ungaro *et al.*, 2017).

II.4.4.2 Mecanismo de acción de colitis ulcerosa

A menudo se describe la colitis junto a la EC, aunque existen diferencias importantes. La siguiente imagen muestra el sistema inmune intestinal en un estado sano y en un estado de colitis ulcerosa. Las células epiteliales colónicas (colonocitos), la barrera de mucosa y los elementos de la barrera epitelial están fuertemente implicados en la patogénesis de la colitis ulcerosa (Ungaro *et al.*, 2017).

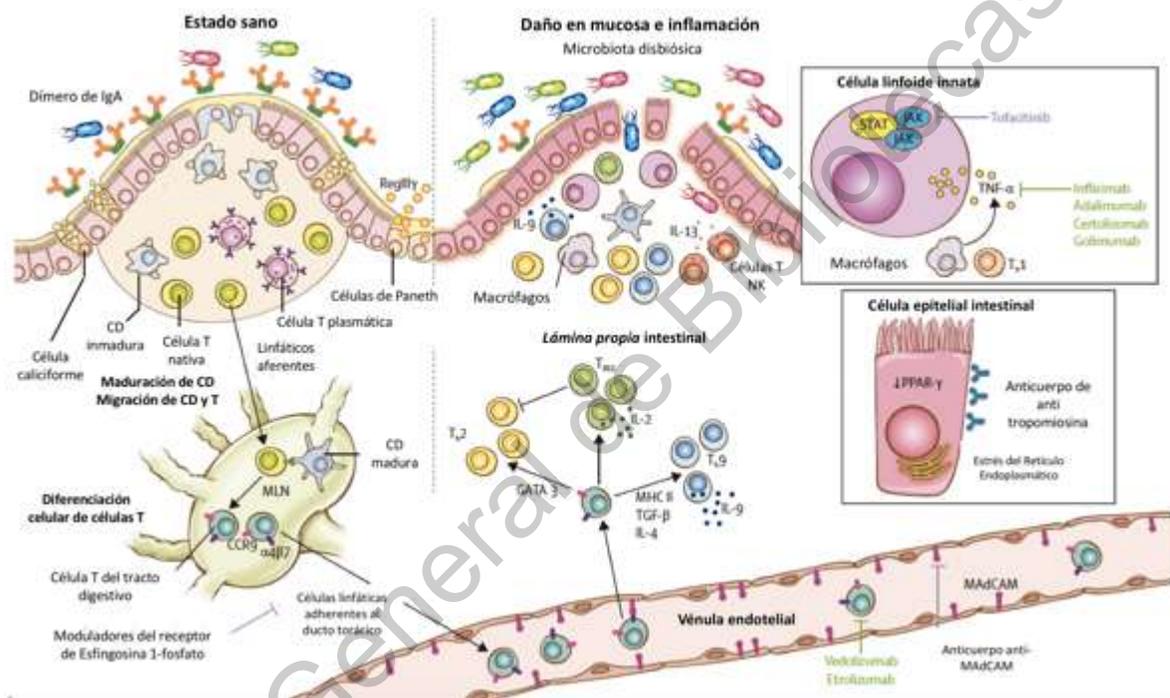
Durante el estado sano, la función de barrera es mantenida por la capa de mucosa y las células epiteliales atadas a través de uniones estrechas. Adicionalmente IgA y factores antimicrobiales como RegIII γ secuestran la microbiota luminal lejos del sistema inmune de la mucosa. Células presentadoras de antígenos especializadas como las células dendríticas procesan y presentan los antígenos a las células T y B dentro de los nódulos linfáticos de desagüe, que es lo que normalmente sucede en un fenotipo tolerante. Las células dendríticas intestinales también inducen a los linfocitos T y B a expresar moléculas intestinales como $\alpha 4\beta 7$ y CCR9. Los linfocitos, en consecuencia, ingresan en la circulación sistémica y alcanzan las vénulas superiores endoteliales del intestino (Ungaro *et al.*, 2017).

Los linfocitos que expresan $\alpha 4\beta 7$ se acoplan a MAdCAM expresado localmente y salen de la circulación para ingresar dentro de la *lámina propia* intestinal. La actividad coordinada entre las células de la inmunidad adaptativa e innata mantienen la homeostasis dentro de la mucosa intestinal en un nivel estable (Ungaro *et al.*, 2017).

Por su parte, en la situación de enfermedad, la CU se asocia con un daño a la barrera de mucosa, permitiendo a la microbiota luminal el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria sostenida y desinhibida. Entre las células inflamatorias, las T_H9 perpetúan la apoptosis de los enterocitos e inhiben el daño de la mucosa. La IL-13, producto por las células T NK también contribuyen al daño epitelial. Adicionalmente, las células linfoides innatas, homeostáticas en el nivel estable,

contribuyen a la producción de citocinas, prolongando la inflamación. El daño en la mucosa se asocia con la disbiosis, que probablemente contribuye con la cascada inflamatoria (Ungaro *et al.*, 2017).

Un mayor entendimiento del sistema inmune de la mucosa ha permitido la expansión de todo un grupo de objetivos terapéuticos. De ellos, los antagonistas del TNF- α son a menudo utilizados en la práctica clínica (Ungaro *et al.*, 2017).



IgA: Inmunoglobulina; **DC:** Célula dendrítica; **MAAdCAM:** Molécula asociada a células de la mucosa; **T_H:** Célula cooperadora; **Treg:** Célula T reguladora; **IFN:** Interferón; **M:** Macrófago; **TGF:** Factor de crecimiento transformante; **ER:** Retículo endoplásmico; **MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad; **NK T:** Célula T Natural Killer. **MLN:** Nódulo linfático mesentérico.

Figura 4. Vista general del sistema intestinal inmune en el estado sano y de colitis ulcerosa con un enfoque en objetivos terapéuticos promisorios (Ungaro *et al.*, 2017).

Los autoanticuerpos contra tropomiosinas asociadas a colonocitos también han sido descritos en CU, pero es escasa la evidencia conclusiva respecto a su

clasificación en CU como una enfermedad mediada por auto anticuerpos. Defectos asociados a los colonocitos asociados al gen XBP1, un componente clave de la vía de respuesta al estrés del retículo endoplasmático, también han sido reportados en CU (Ungaro *et al.*, 2017).

II.4.5 Efectos biológicos del frijol común asociados a CU

Los reportes más recientes del efecto del consumo de frijol sobre colitis lo constituyen diversos estudios que han evaluado el efecto *in vivo* de la adición de harina de frijol a dietas basales de animales. Monk *et al.* (2018) reportaron para ratones (C57BL/6J) alimentados con con frijol común de las variedades negro y alubia chica (*navy*) (20%) a los que se les indujo colitis aguda (DSS), por un período de 8 días (previo consumo de la dieta por 3 semanas), que el consumo de frijol previo a colitis en los animales no provocó cambios significativos en el peso corporal, índice de actividad de la enfermedad (DAI), relación peso/longitud de colon ni en el puntaje de daño en mucosa, aunque sí redujo el índice de proliferación celular en las criptas colónicas. Asimismo, los animales en las dietas suplementadas con frijol común mostraron reducción significativa en la expresión de STAT3 y NFκB-p65, citocinas clave en el proceso inflamatorio, así como reducción significativa en la concentración colónica de IL-1β, IL-6, MCP-1 y MIP-1β; e incrementos en la expresión de MUC3 y algunas galectinas (GAL2, GAL3 y GAL4), que promueven la migración celular y favorecen el cierre de heridas. Los autores concluyeron que el consumo de dietas con frijol común atenúan la inflamación colónica, con efectos que persisten hasta por 1 semana.

Power *et al.* (2016) reportaron que en ratones de la cepa C57BL/6 fueron alimentados con una dieta suplementada en un 20 % con harina de frijol común negro (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido por tres semanas, seguido de exposición con dextrán sulfato de sodio (DSS) (2 % p/v, 5 días), mostraron un incremento de extensión de fosas colónicas crípticas, número de células caliciformes y producción de mucosidad así como expresión mRNA de MUC1 y MUC3, Relmβ, REG3γ, IgA y

JAM-A y reducción de los niveles séricos de lipopolisacáridos (LPS); siendo esto indicador de mejora de la defensa antimicrobiana e integridad de la barrera intestinal. Asimismo, el consumo de frijol negro incrementó la producción de ácidos grasos de cadena corta (propiónico, acético y butírico) derivados de actividad microbiana colónica, alteró la estructura de la comunidad microbiana colónica (incremento de *Prevotellaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Peptococcaceae* y *Peptostreptococcaceae*), de genes promotores de la integridad de la barrera colónica (MUC1, Relm β y TFF3) y redujo la producción de mediadores colónicos pro inflamatorios (IL-1 β , IL-6, IFN γ y TNF- α).

Monk *et al.* (2016) evaluaron el efecto de dietas suplementadas en un 20% con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cranberry claro y oscuro en ratones de la cepa C57BL/6. Tras ser alimentados durante tres semanas con esta dieta y luego expuestos a DSS para inducir colitis, los autores reportaron, previo a la inducción de la enfermedad, incremento de producción de ácidos grasos de cadena corta propios de la actividad microbiana colónica, aumento de la extensión de fosas colónicas crípticas, aumento del número de células caliciformes y contenido de mucosidad e incremento de la expresión de genes relacionados con la mejora de la actividad microbiana y la función de la barrera intestinal (Muc1, Klf4, Relm β y Reg3 γ). Durante la colitis, los autores reportaron reducción en la severidad de la enfermedad y daño histológico colónico, incremento de los genes promotores de la protección de la barrera intestinal (Muc1, Muc3, Relm β y Reg3 γ) y reducción de las citocinas inflamatorias circulantes (IL-1 β , IL-6, IFN γ y TNF- α).

Monk *et al.* (2015) evaluaron el potencial protector a la salud intestinal de frijol rojo y blanco arriñonado (red y white kidney bean en inglés) en ratones sanos de la cepa C57BL/6 y su habilidad para atenuar la inflamación colónica tras exposición a DSS. Para ello, los ratones fueron alimentados durante tres semanas con una dieta suplementada en un 20 % con la harina de frijol cocido (producida a partir de frijoles remojados en agua, cocidos de forma lenta con 0.3 % de polvo de horneado, homogeneizados y secados en frío) y posteriormente les fue inducida colitis por

medio de dextrán sulfato de sodio (DSS), reportando que en los ratones se incrementó la expresión de los niveles de ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, propiónico y butírico), extensión de las fosas colónicas crípticas y los niveles de mRNA de MUC1, Relm β (Resistina similar a la molécula β) y TLR4, todos indicadores de mejora de la actividad antimicrobiana, integridad de la barrera intestinal y respuesta de defensa antimicrobiana. Asimismo, se redujo la expresión de mediadores pro inflamatorios en el tejido colónico (IL-1 β , IL-6, IFN γ , TNF- α y MCP-1) y los niveles séricos de IL-17A, IFN γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6.

El estudio de Zhang *et al.* (2014), en el que harinas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) blancos y negros cocidos fueron suministradas en proporciones únicas (20 %) a ratones de la cepa C57BL/6 a los que se les indujo colitis utilizando dextrán sulfato de sodio (DSS), reportó reducción en la expresión de mRNA de citocinas pro inflamatorias (IL-6, IL-9, IFN γ e IL-17A), incremento de la citocina antiinflamatoria IL-10, reducción de citocinas circulantes (IL-1 β , TNF- α , IFN γ e IL-17A) y el estrés inducido por DSS.

Aunque se ha sugerido reducir el consumo de frijol en pacientes que padecen enfermedades inflamatorias intestinales debido a la producción de gas, estos estudios sugieren que, hasta cierta dosificación y probablemente de forma preventiva y hasta cierta etapa del desarrollo de la enfermedad, el consumo de frijol podría mitigar el efecto de colitis. Se ha sugerido que para dietas controladas, el consumo de frijol podría reintroducirse a los tres meses de intervención dietaria, como en el uso de la Dieta Específica de Carbohidratos de Gottschall, donde se sugiere el consumo de carne, pescado, huevos y aves, así como la mayoría de vegetales, nueces, algunas frutas y ciertos azúcares; se permiten los productos libres de lactosa, panes formulados sin granos, galletas y productos de panadería elaborados de nuez (Hoffman, 2013).

II.4.6 Papel de las EROs y ERNs en CU y algunas estrategias terapéuticas en su tratamiento

Tanto las EROs (Especies Reactivas de Oxígeno) como las ERNs (Especies Reactivas de Nitrógeno), así como citocinas proinflamatorias tienen una importante implicación en la etiología y avance de la CU. Se han observado una infiltración significativa de neutrófilos y niveles incrementados de mieloperoxidasa (MPO) se han observado en la *lamina propia* de humanos con CU, cercana al epitelio intestinal. Se ha evidenciado también que en ratones el comienzo y la severidad de colitis es significativamente atenuada con la ablación génica de iNOS. En CU, iNOS es responsable de la producción aumentada de ON en el epitelio y en las fosas de inflamación, en asociación con nitrotirosina. El NO derivado de iNOS estimula la producción de TNF- α en el colon medio y distal, promoviendo la infiltración de neutrófilos a través del estímulo de la síntesis de la molécula de adhesión intracelular (ICAM) y P-selectina, permitiendo entonces el daño al tejido colónico. El reclutamiento de neutrófilos y la activación de vías transcripcionales clave como la de NF- κ B y AP-1 aumenta la respuesta inflamatoria y el daño a tejidos. Cuando se activa, NF- κ B se trasloca al núcleo, se enlaza al ADN y subsecuentemente activa la expresión de genes. Los genes activados involucrados en la inflamación de mucosa incluyen IL-6, IL-8, IL-19, TNF- α e ICAM, y se ha documentado un incremento en la activación de NF- κ B y altos niveles de expresión de los mRNA de IL-1 β e IL-8 en el tejido de CU humana (Piechota-Polanczyk & Fichna, 2014).

Aunque la CU es una enfermedad inflamatoria bien conocida, aún existe la búsqueda por marcadores confiables. Estudios han reportado altas concentraciones de serpina B1, un inhibidor de elastasas de neutrófilos que reduce el daño a tejidos inducido por peróxido de hidrógeno en pacientes con CU. Además, varios pacientes parecen tener un polimorfismo en la región promotora de catalasa (C-262T), que altera los niveles de expresión de la enzima. Asimismo, la caracterización proteómica del tejido colónico inflamado ha demostrado un alto nivel relativo de proteínas de estrés oxidativo como la proteína enlazante de selenio, superóxido dismutasa y la peróxido-reductasa dependiente de tioredoxina,

así como la expresión de proteínas implicadas en la generación de energía como la isocitrato deshidrogenasa, cadena B de la L-lactato deshidrogenasa, fosfatasa inorgánica o enoil-CoA-hidratasa, lo que podría indicar alteraciones inflamatorias asociadas al metabolismo energético. Estudios clínicos indican que el tratamiento de pacientes con CU con mesalamina oral (2.4 g/día) junto con N-acetil-L-cisteína (0.8 g/día) por 4 semanas muestra mejores respuestas clínicas, acompañado de la reducción en los niveles de IL-8 y MCP-1 (Piechota-Polanczyk & Fichna, 2014).

Lo anterior habla de algunas estrategias terapéuticas que se han utilizado en el tratamiento de la EII y CU con base en la influencia sobre rutas de inflamación y niveles de EROs y ERNs. Las más importantes son:

- **Sulfasalazina:** La sulfasalazina es un potente transportador e inhibidor de cisteína, compuesto por el ácido 5-aminosalicílico y sulfapirina, y ha sido rutinariamente utilizado en la terapia en general de EII. Tras su ingesta oral, la sulfalazina es separado por la microbiota intestinal en sulfapiridina y mesalazina. Como todos los salicilatos, el potencial antiinflamatorio de sulfalazina podría reflejarse en su influencia sobre la liberación de adenosina, que controla el potencial oxidativo, y por tanto el efecto de sulfalazina sobre compuestos proinflamatorios y la generación de radicales libres. Estudios clínicos han mostrado que el tratamiento con sulfalazina a pacientes con UC leve o moderadamente activa provocó una reducción significativa en la inflamación intestinal. Este efecto puede ser explicado por la influencia de sulfalazina en EROs y citocinas proinflamatorias, ya que disminuye la concentración de EROs. En pacientes con CU moderada, el tratamiento con sulfasalazina (2-4 g/día) por 8-36 semanas mostró una regulación negativa de la vía de NF- κ B acompañada de la disminución en la expresión del mRNA de la interleucina proinflamatoria IL-8 e IL-1 β . Cuando se estimula, la vía de NF- κ B activa genes como la producción de citocinas proinflamatorias. Por tanto, su regulación negativa bajo el tratamiento con sulfasalazina es deseada. Se ha observado que, en pacientes con CU moderada, la disminución en la concentración de NF- κ B era

dependiente de los niveles de $I\kappa B\alpha$, que es una proteína reguladora que inhibe a NF- κ B, atrapándolo en el citoplasma. En respuesta al estímulo, $I\kappa B\alpha$ es degradado y rápidamente regresa a sus niveles originales, manteniendo NF- κ B inactivo e inhibiendo sus efectos de forma indirecta (Piechota-Polanczyk & Fichna, 2014).

La desactivación de NF- κ B por sulfasalazina también ha sido descrita en modelos *in vitro*. Por ejemplo, la inhibición de NF- κ B mediada por sulfasalazina indujo apoptosis de linfocitos T y macrófagos. En macrófagos, la sulfasalazina también estimula la Fosfolipasa D, una enzima involucrada en la señalización celular y el estrés oxidativo, con la correspondiente generación de fosfatidato. Asimismo, la sulfasalazina ha mostrado inhibir la liberación extracelular de la proinflamatoria Fosfolipasa A2 (Piechota-Polanczyk & Fichna, 2014).

- **Mesalazina (5-ASA):** La mesalazina (5-ASA), un metabolito de la sulfasalazina, es ampliamente utilizada en el tratamiento de CU. A niveles celulares, 5-ASA reduce el estrés oxidativo inhibiendo la producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 así como previene la inhibición en las mucosas de GADPH. Ensayos clínicos han indicado que, en pacientes con CU, el tratamiento de 4 semanas con 5-ASA (2.4 g/día) sumado a N-acetil-L-cisteína (0.8 g/día) no sólo mejora la respuesta clínica, sino que también disminuye los niveles sanguíneos de TNF- α , IL-6 e IL8, así como mejora el contenido de GSH (glutatión). La administración de 5-ASA sola mejoró la respuesta clínica, pero no tuvo efectos en IL-6 e IL-8, y tampoco en GSH o TNF- α (Piechota-Polanczyk & Fichna, 2014).
- **Corticoesteroides:** Los corticoesteroides sistémicos son altamente efectivos en la remisión clínica de CU y EC. La segunda generación de estas sustancias utilizadas hoy en día, que incluye budesonida, prednisona o dipropionato de beclometasona parecen tener leves efectos en pacientes con CU y EC. La terapia con glucocorticoides es efectiva en la inhibición de la actividad de neutrófilos, reflejado en la disminución de los niveles séricos de MPO y la elastasa de neutrófilos en pacientes con EII. Esta actividad de los

glucocorticoesteroides se debe a su influencia sobre NF- κ B, donde se ha demostrado que, por ejemplo, niveles de prednisona de 0.75 mg/kg/día por tres semanas inhibieron fuertemente la activación de NF- κ B al estabilizar la activación citosólica de I κ B α en tejidos de pacientes con colitis. Los corticoesteroides no parecen reducir la expresión en mucosa de NOS en pacientes con CU, aunque el tratamiento con prednisolona (0.5 – 1.0 mg/kg oral, por 1 mes) redujo niveles mucosales de NOS y producción rectal de NO en pacientes con CU (Piechota-Polanczyk & Fichna, 2014).

- **Ciclosporina A:** La ciclosporina A, un inhibidor de la calcineurina, es un medicamento inmunosupresor que ha mostrado suprimir la producción de IL-2 e IL-3, inhibiendo la quimiotaxis de neutrófilos e induciendo apoptosis de células T en pacientes con CU. También disminuye el número de neutrófilos y células mononucleares en tejido colónico e inhibe la actividad citotóxica de células T y la actividad de quimiocinas de la mucosa en seres humanos. Cuando se administra, la ciclosporina A se une a ciclofilina A, cuya expresión génica regula de forma positiva el epitelio de las criptas en pacientes con CU. El complejo ciclosporina-ciclofilina A disminuye las concentraciones de TNF- α e IL-6, inhibiendo la actividad de señalización de NF- κ B y MAPK en monocitos, alterando los procesos inflamatorios. Sin embargo, no se han encontrado asociaciones entre la respuesta clínica y los niveles sanguíneos de ciclosporina A en pacientes que han recibido tanto dosis altas (>5 mg/kg/día) como bajas (<5 mg/kg/día) de ciclosporina A oral (Piechota-Polanczyk & Fichna, 2014).
- **Anticuerpos anti TNF- α :** Infliximab es un anticuerpo monoclonal contra TNF- α tanto sérico como de membranas, inhibiendo su concentración en la mucosa colónica de pacientes con CU. El tratamiento ha mostrado reducción en la inflamación con mejora del daño a mucosas en pacientes con CU gracias a la recuperación de las células caliciformes y la reducción en la formación anormal de mucosa y su secreción, permitiendo la recuperación de los componentes de las vellosidades. Estudios en pacientes (n=32) que sufrían de CU por cerca de 4 años que fueron tratados con Infliximab en varias infusiones intravenosas a las 0, 2 y 6 semanas de tratamiento expresaron menores mARN de TNF- α e

IFN γ . Además, la remisión de CU ha sido observada en pacientes tras el tratamiento con Infiximab. El colon de los pacientes con CU que han remitido se caracteriza por un bajo número de macrófagos y linfocitos, aunque el nivel de TNF- α en células permanece sin cambio. Estos cambios pueden atribuirse a la inhibición de la generación de TNF- α y la modulación de su vía de señalización. Además de reducir mRNA de TNF- α , Infiximab disminuyó linfocitos T y macrófagos y reguló negativamente la expresión de IFN γ sin afectar los mRNA de IL-10 e IL-4. Infiximab es introducido en pacientes a una dosis de 5 mg/día por 2-4 semanas para inhibir la actividad de neutrófilos, reflejado en los menores niveles de elastasa de neutrófilos, pero no es tan eficiente como el suministro de glucocorticoides (0.8 mg/kg/día). La terapia con Infiximab disminuye la regulación positiva de las moléculas de adhesión celular de leucocitos y el número de células inflamatorias en la *lamina propia* colónica.

II.4.7 Marcadores en la enfermedad crónica inflamatoria intestinal y Colitis Ulcerosa (CU):

II.4.7.1 Marcadores fecales de CU

Los marcadores fecales son un grupo heterogéneo de sustancias que son generados por la mucosa intestinal inflamada. Su principal uso es en el diagnóstico y evaluación de la actividad de la enfermedad en casos difíciles, así como juegan un papel en la evaluación de los efectos del tratamiento y la predicción de la recaída (Masoodi *et al.*, 2011). La mucosa inflamada y permeable en los pacientes que padecen EII se asocia con niveles altos de citocinas, así como marcadores de activación de neutrófilos, presentes en muestras fecales, marcadores que han podido ser identificados gracias a técnicas de etiquetado con materiales radioactivos, altamente sensibles (97 %) en comparación con los análisis radiológicos (79 %) o histología rectal (70 %), al menos en la identificación de leucocitos. Desafortunadamente, estas técnicas exponen a los pacientes a radiación e implican recolección de heces de por lo menos 4 días en instalaciones

dedicadas a ello. Incluso la colonoscopia no detecta inflamación en el caso de que sea mínima o localizada, por lo que es normal que las heces reflejen el estado de todos los sitios del tracto digestivo, puesto que las mismas se forman en su tránsito a partir del mismo. Los marcadores fecales llenan todos los criterios de ser no invasivos, simples, poco costosos, sensibles y específicos para la inflamación intestinal (Ungaro *et al.*, 2017).

La inflamación crónica en el intestino grueso comprende principalmente células plasmáticas y linfocitos, mientras que en la exacerbación aguda de la misma los neutrófilos migran y degranulan sustancias como la mieloperoxidasa, lactoferrina, factores quimiotácticos eosinofílicos, etc. Los niveles de dichas sustancias indican la activación de los neutrófilos a lo largo de la exacerbación de la mucosa gastrointestinal, sustancias que son estables en la materia fecal y cuya medida puede dar evidencia indirecta de la inflamación colónica de una forma no invasiva (Ungaro *et al.*, 2017).

Muchos marcadores potenciales han sido evaluados hasta el momento, aunque uno ideal aún está por ser identificado (Ungaro *et al.*, 2017):

- **Mieloperoxidasa fecal (MPO):** Otra enzima de importancia es la mieloperoxidasa, una constituyente de los gránulos azules de los neutrófilos e importante contra el ataque bacteriano y liberada junto a otros metabolitos citotóxicos de oxígeno. No se ha establecido aún los factores responsables del reclutamiento de neutrófilos en CU, aunque la MPO podría asociarse al número celular (desde al menos 500 células). En comparación a controles sanos, se han encontrado niveles elevados de esta enzima, la cual puede ser correlacionada con parámetros de laboratorios y grados endoscópicos de inflamación. La lactoferrina fecal se correlaciona con la mieloperoxidasa fecal pero su relación (razón o proporción entre las mismas) es diferente en EII en comparación con la diarrea infecciosa (Angriman *et al.*, 2007). La mieloperoxidasa hace parte de ese grupo de enzimas que son proteolíticas y pueden ser liberadas tras la

estimulación, junto con metabolitos citotóxicos de oxígeno, contribuyendo al daño tisular en el sitio de inflamación, por ejemplo, de la mucosa colónica. Sin embargo, los factores responsables del reclutamiento en la mucosa de neutrófilos en colitis ulcerosa aún no se han establecido con seguridad (Masoodi *et al.*, 2011).

La liberación de MPO se ha correlacionado con una liberación local mejorada de la interleucina 8 peptídica activadora de neutrófilos (IL-8), lo que ha permitido sugerir que la activación o el reclutamiento de neutrófilos en CU está mediada por un incremento en la síntesis de IL-8. TNF- α podría ser un factor relevante en el estímulo de la síntesis de IL-8. Se han reportado niveles de MPO en heces de 1.6×10^3 a 2.83×10^3 por gramo de heces en pacientes sanos. MPO ha demostrado ser un marcador temprano de la respuesta al tratamiento en pacientes con CU (Masoodi *et al.*, 2011).

- **β -glucuronidasa:** Esta enzima, producida en riñones, bazo, epitelio intestinal y órganos endocrinos y reproductivos, también es generada por ciertas bacterias intestinales, siendo los mayores productores *E. coli*, *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgaris*, *Bacteroides uniformis*, *Ruminococcus gnavus*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* y *Eubacterium* (Arul *et al.*, 2008). La enzima hidroliza β -glucurónidos en ácido glucurónico y la aglicona imina, tiol o alcohol. Sus niveles elevados en plasma son considerados un marcador del riesgo incrementado a desarrollar cánceres dependientes de hormonas, particularmente cáncer de mama y próstata.

En general en pacientes con EII, los niveles de actividad de esta enzima se han visto reducidos. En deposiciones fecales de 68 niños hospitalizados y diagnosticados con enfermedad inflamatoria intestinal, se han reportado niveles dos veces menores en los pacientes enfermos que en los sanos. Una explicación a este fenómeno es que, debido a la interrupción de la activación de

la respuesta inmune en la mucosa intestinal por EII, existen cambios en la pérdida de la propiedad secretora de las células intestinales. Los autores indican que en niños con EII los niveles enzimáticos son variados y pueden ir desde 2.42 a 81.63 mM/mg/h.

- **β -Glucosidasa:** Es la segunda enzima más intensamente producida por *Bacteroides uniformis*, *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium* y *Enterococcus faecalis*. El principal papel de esta enzima es la hidrólisis de glucósidos a agliconas y componentes azucarados. Los glucósidos no son hidrolizados en la parte superior del tracto gastrointestinal, pero son hidrolizados en el colon por las β -glucosidasas bacterianas, generando sustancias potencialmente tóxicas (como quercetina) que podrían formarse en el intestino grueso. Se cree que la producción de sustancias dañinas podría ser mayor en personas con alto consumo de vegetales por su alto contenido de glucósidos.

Mroczyńska *et al.* (2013), en deposiciones fecales de 68 niños hospitalizados y diagnosticados con enfermedad inflamatoria intestinal, no reportaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes enfermos y los sanos en los niveles de β -glucosidasa, aunque los mismos autores reportaron en un estudio anterior que, tras medir los niveles de esta enzima en cepas bacterianas seleccionadas, hubo un incremento del 32 % en niños sanos que en adultos, aunque no hubo correlaciones con la edad o el estado de la enfermedad, por lo que es un marcador menos valioso para la evaluación de la EII (Mroczyńska & Libudzisz, 2010).

II.4.7.2 Otros marcadores de importancia en CU

- **Proteína C reactiva (PCR):** Otros marcadores en colitis son los marcadores en suero, como es el caso de la proteína C reactiva (PCR), denominada así porque reaccionaba con el plasma de los pacientes durante la fase aguda de la neumonía neumocócica. La síntesis *de novo* de esta proteína inicia rápidamente en el hígado tras un estímulo simple, alcanzando niveles en suero

de 5 mg/L en las primeras 6 horas, y alcanza un pico alrededor de las 48 horas. Su vida media es de 19 horas y es constante en todas las condiciones de salud y enfermedad, por lo que los únicos determinantes de la concentración de PCR es la tasa de síntesis, que refleja de modo directo la intensidad del proceso patológico estimulante de su producción (Masoodi *et al.*, 2011).

II.4.8 Mecanismo de acción del inflammasoma

El balance homeostático es indispensable para el mantenimiento del estado saludable de los organismos multicelulares durante infección o daño a tejidos, configurando una respuesta de células o tejidos a fin de asegurar la supervivencia del organismo. Esta situación ha llevado a los investigadores a estudiar los mecanismos detrás de la restauración del balance homeostático (Rathinam & Chan, 2018).

Estudios recientes han sugerido que las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 podrían tener papeles críticos en la homeostasis del tejido y el epitelio colónico. Esta expresión es controlada por el inflammasoma, un complejo multicomponente que procesa IL-1 β e IL-18 en citocinas maduras. Por tanto, la alteración de su regulación ha sido implicada en la patogénesis de enfermedades inflamatorias intestinales y han sido sugeridos como blancos terapéuticos que han mostrado resultados prometedores en modelos murinos de colitis (Coll *et al.*, 2015; Youm *et al.*, 2015). Es por ello que el enfoque sistémico en el inflammasoma podría traer una nueva oportunidad para intervenciones clínicas novedosas que permita solucionar o aliviar los desórdenes inflamatorios intestinales (Lei-Leston *et al.* 2017).

El epitelio intestinal de los mamíferos no solo tiene una función relevante en el metabolismo de nutrientes sino también es una barrera crítica contra patógenos y microbiota. La coordinación de la acción de efectos inmunes, como los linfocitos T y B, linfocitos intraepiteliales, fagocitos mononucleares y células linfoides innatas que se encuentra en la capa epitelial y bajo la *lamina propia* es requerida para el mantenimiento de la función de barrera. Todas estas células se organizan dentro

del tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (*GALT* en inglés: *gut-associated lymphoid tissue*) como las placas de Peyer. La exposición constante a antígenos de los alimentos y microorganismos en el lumen requiere un complejo sistema homeostático que ayude a equilibrar la inflamación y la tolerancia, pero así mismo evitando patologías inflamatorias e invasión microbiana (Rathinam & Chan, 2018).

El sistema coordina varios eventos. Por ejemplo, se sabe que las células microplegables (células M) en las placas de Peyer capturan eficientemente antígenos luminales por medio de transcitosis para presentación de antígenos. Además, células secretoras especializadas como las células caliciformes y las células de Paneth secretan moco y péptidos antimicrobianos que ayudan a repeler los microorganismos. Adicionalmente, microorganismos comensales que residen en el lumen intestinal también contribuyen a la homeostasis del tejido produciendo metabolitos (como los ácidos grasos de cadena corta) que facilitan el desarrollo funcional de los efectores inmunes. Esos metabolitos microbianos son detectados por los receptores acoplados a proteínas G (como GPR42) en las células epiteliales, las cuales estimulan el flujo de potasio y la activación del inflamasoma NLRP3. La ruptura de cualquiera de estos mecanismos provoca susceptibilidad a infección o contribuyen a daños en el epitelio colónico, inflamación crónica o patologías como el cáncer (Rathinam & Chan, 2018).

En este sentido, los inflamasomas son andamiajes proteínicos intracelulares que regulan la ruptura de la familia de citocinas de IL-1, liderando una forma inflamatoria de muerte celular denominada piroptosis. También es posible necroptosis, una forma lítica de muerte celular (Rathinam & Chan, 2018). Al respecto, modelos animales murinos han mostrados que sensores específicos de inflamasomas que fueron inhibidos desempeñan un papel crítico en la homeostasis celular.

Además del mantenimiento homeostático, los inflamasomas también detectan daño agudo a través de los PAMP (Patrón Molecular asociado a patógenos, *PAMPs* en inglés), liberados por las células muertas en el intestino para desencadenar la

respuesta de reparo de tejido. Dichas actividades están mediadas por sensores de inflammasoma como NLRP3 en células hematopoyéticas y estromales en el intestino de mamíferos. Por lo tanto, los inflamasomas han surgido como una característica central de la inmunidad innata, y están involucrados en otras actividades como limpieza de microorganismos y estimulación de la respuesta inmune adaptativa que remueve células tumorales. Todos estos complejos citosólicos comprenden caspasas inflamatorias que llevan a cabo activación catalítica e inician cascadas de señalización que activan la proteasa Caspasa-1 y liberan citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18. Esta secuencia culmina con el inicio de la piroptosis, muerte programada por Gasdermina-D, un complejo proteínico (Perera *et al.*, 2018).

La caspasa-1 es activada por sensores de inicio del inflammasoma o por el reconocimiento de PMAP y PMAD (patrón molecular asociado a daño, DAMPs en inglés) (activación canónica del inflammasoma). En la vía independiente de caspasa-1 (activación no canónica del inflammasoma), caspasa-4, caspasa-5 y caspasa-11 son los activadores apicales a través de dominios CARD (dominios de reclutamiento y activación de caspasas), que directamente reconocen lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas en el citoplasma del huésped. Se ha sugerido que caspasa-4 es capaz de romper pro-IL-1 β y pro-IL-17 pero que también es capaz de inducir piroptosis independiente de caspasa-1 (Man, Karki, & Kanneganti, 2017).

Todas las caspasas asociadas a inflammasoma escinden un sustrato de 53 kDa llamado Gasdermina D, generando un fragmento N-terminal que inicia piroptosis y uno C-terminal de 22 kDa que se asocia con el plegamiento interno de la membrana celular, donde forma poros de 10-33 nm de diámetro. El fragmento N-terminal también activa el inflammasoma de caspasa-1 dependiente de NLRP3, probablemente requirieron un flujo de potasio causado por los poros membranales inducidos por Gasdermina D (Man *et al.*, 2017).

En este sentido, se ha demostrado que las dietas altas en fibra incrementan significativamente los niveles de IL-18 en la sangre en comparación con dietas bajas en fibra, el cual es producido por el inflammasoma. Altos niveles de fibra se asocian con producción de AGCC y GPR43/41, así como un incremento de IL-18 en la sangre. Por tanto, existe un vínculo entre GPCR y la activación del inflammasoma, donde niveles incrementados de IL-18 e IL-10 pueden ayudar a proteger de la severidad de las lesiones colónicas (Sun *et al.*, 2017).

II.5 Modelo *in vivo* de inducción de colitis con dextrán sulfato de sodio (DSS)

II.5.1.1 Mecanismo de acción del DSS

Tal vez uno de los modelos más comúnmente utilizados en modelos murinos de colitis es el que emplea dextrán sulfato de sodio (DSS), un colitogénico químico con propiedades anticoagulantes, a fin de inducir la enfermedad. Fue desarrollado Okayasu *et al.* (1990) y ha sido utilizado en miles de publicaciones para evaluar toda una variedad de ratones genéticamente modificados, así como la eficacia de un amplio número de terapéuticos.

El DSS es un polisacárido negativamente cargado y soluble en agua, con un peso molecular altamente variable, que va desde los 5 hasta los 1400 kDa. La colitis más severa, esto es, la que más se parece a la colitis ulcerosa (CU) humana proviene de la administración de DSS de 40 a 50 kDa en el agua de beber a los animales. El mecanismo a través del cual el DSS induce inflamación intestinal en los animales aún no está del todo esclarecido, pero se sabe que provoca el daño de la monocapa epitelial que recubre el intestino grueso, permitiendo la diseminación de los contenidos intestinales pro inflamatorios (como bacterias y sus productos) hacia el tejido debajo de ellos (Chassaing *et al.*, 2014).

El DSS tiene cargas negativamente cargadas que se distribuyen a lo largo de sus grupos sulfatos, por lo que es tóxico para el epitelio intestinal e induce erosión que compromete la integridad de la barrera intestinal, provocando un incremento en la

permeabilidad intestinal. Una explicación más específica de este proceso es que las cargas negativas del DSS, por la fuerza de repulsión, contribuye al daño de las membranas celulares negativamente cargadas (gracias a los fosfolípidos de membrana aniónicos). Asimismo, por sus propiedades anticoagulantes (similar a la heparina), agrava el sangrado intestinal. Por razones desconocidas, la patología inducida por DSS se limita al intestino grueso, específicamente al colon distal, donde un gran número de microorganismos viven, una especificidad que se sugiere que va en función de la absorción de agua y electrolitos por la presencia de este numeroso grupo de bacterias (Chassaing *et al.*, 2014). El mecanismo a través del cual pasa por la mucosa intestinal aún permanece sin claridad, pero se ha sugerido que se forman nano-lipocomplejos con ácidos grasos de cadena media en el colon (Figuras 5 y 6).

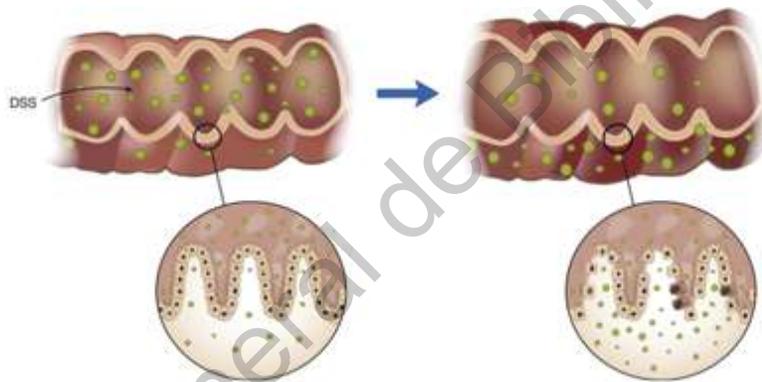


Figura 5. Diagrama representativo de los efectos del DSS en el epitelio colónico (Kiesler *et al.*, 2015).

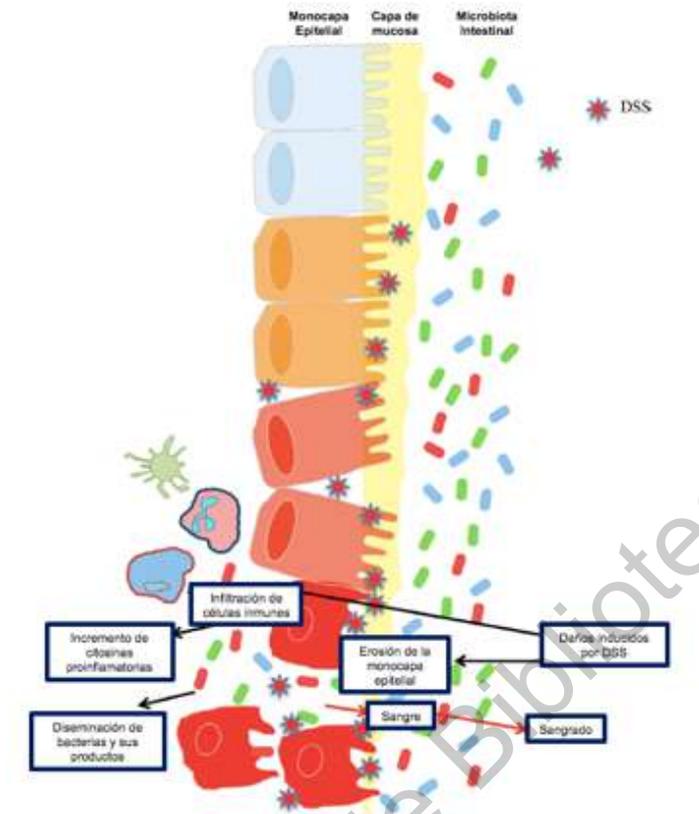


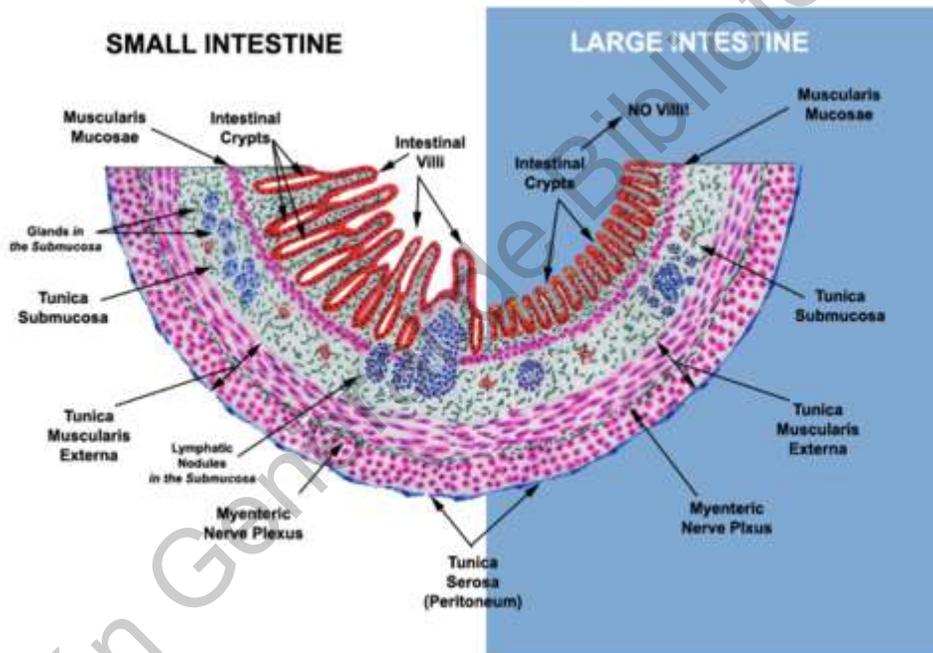
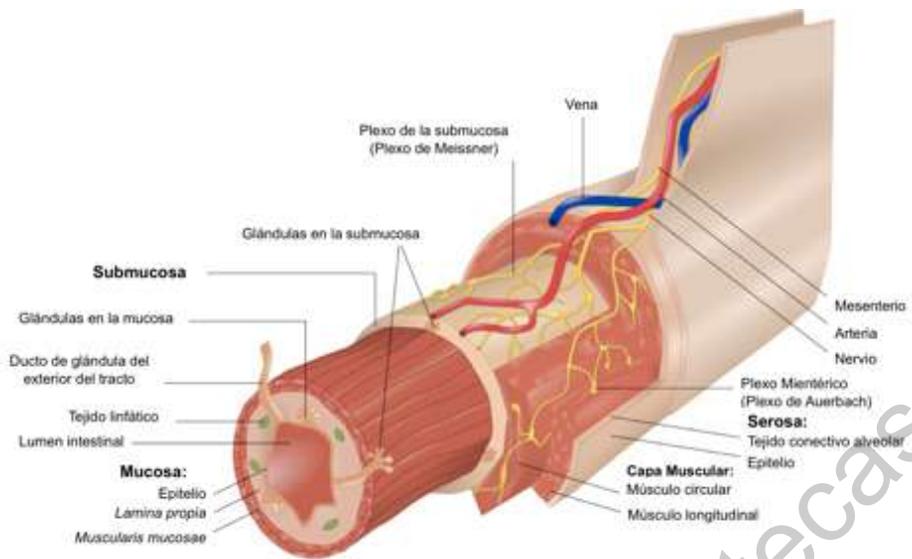
Figura 6. Mecanismo de acción del dextrán sulfato de sodio (DSS) (Chassaing *et al.*, 2014).

El modelo de colitis con DSS es muy popular en la investigación de EII gracias a su rapidez, simplicidad, reproducibilidad y controlabilidad. Los modelos de inflamación intestinal agudos, crónicos o de relapso puede ser alcanzados por medio de la modificación de las concentraciones de DSS y la frecuencia de su administración. No obstante, este modelo tiene una limitante, y es que, a diferencia de la enfermedad humana, las células T y B no son requeridas para el desarrollo de colitis, por lo que el modelo de colitis aguda con DSS es particularmente útil para el estudio de la contribución del sistema inmune innato en el desarrollo de la inflamación intestinal. Asimismo, las bacterias intestinales son esenciales en el desarrollo de una colitis robusta (Chassaing *et al.*, 2014).

II.5.1.2 Evidencias físicas y clínicas del DSS

La administración de DSS induce signos clínicos de enfermedad desde el día 1 de tratamiento con cambios en la expresión de proteínas de unión e incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias. Estos efectos iniciales considerados modestos son seguidos del incremento de síntomas drásticos como el aumento en la permeabilidad intestinal, sangrado severo y finalmente, la muerte. Las características clínicas e histológicas inducidas por DSS son parecidas a las de la EII intestinal, particularmente de la CU. Cambios agudos histológicos en el colon pueden ser inducidos por la exposición relativamente corta (4 – 7 días) de una alta dosis de DSS. Las lesiones crónicas pueden ser inducidas por un tratamiento continuo con una baja dosis de DSS o por la aplicación cíclica de DSS. Los cambios histológicos están acompañados de síntomas clínicos como pérdida de peso, diarrea, defecaciones sangrantes, encorvado del animal y muerte (Chassaing *et al.*, 2014).

Cambios histológicos típicos inducidos por DSS incluyen el agotamiento de células de mucina y caliciformes, erosión epitelial y úlceras. Además, el DSS induce un flujo de neutrófilos hacia la *lamina propia* y la submucosa. La migración transepitelial de neutrófilos (criptitis) y la migración extensiva de neutrófilos a través del epitelio de mucosa y dentro del lumen de las criptas (abscesos crípticos) están comúnmente asociados a la EII humana pero ocasionalmente han sido reportados en la patología inducida por DSS. La colitis crónica inducida por DSS provoca la infiltración de leucocitos mononucleares, desarreglo de la arquitectura de las criptas y ensanchamiento de la brecha entre la base de la cripta y la *muscularis mucosae* con profunda linfocitosis mucosal. La inflamación transmural está asociada con la colitis inducida por TNBS y es ausente en la colitis inducida por DSS (Chassaing *et al.*, 2014).



El intestino grueso carece de vellosidades intestinales (en su lugar, contiene criptas) y su función primaria es absorber agua del bolo fecal.

Figura 7. Intestino grueso y partes del epitelio intestinal y diferencias entre el intestino delgado y el grueso (Caceci, 2014).

Los ratones con alta susceptibilidad al DSS muestran severo sangrado rectal y pérdida de peso en los días 3 al 4 de la administración de DSS. Los ratones muestran signos visibles de la enfermedad, incluyendo encorvamiento, elevación del pelaje, síntomas de sepsis y movilidad reducida como consecuencia de la diarrea o anemia. A menudo los ratones pierden del 20 al 30 % de su peso corporal,

dependiendo de la concentración utilizada de DSS (por ello, los gráficos que representan el porcentaje de peso o ganancia de peso corporal son una forma estándar de representar el avance de la enfermedad en este modelo de colitis). La pérdida de peso y el sangrado rectal también se asocian con el adelgazamiento y acortamiento del colon, así como alargamiento de los nódulos linfáticos mesentéricos y del bazo. La colitis severa provoca inflamación superficial del colon, caracterizada por erosión del epitelio y ulceración, abscesos crípticos, pérdida de células caliciformes, pérdida de la capa de mucosa e infiltración sustancial de neutrófilos hacia la *lamina propia*. En la colitis crónica, células inmunes pro inflamatorias (células T y macrófagos) superan en número a los neutrófilos, un efector dominante del tipo celular en colitis aguda (Chassaing *et al.*, 2014).

II.5.2 Influencia de otros factores en los modelos de colitis

En varios modelos de colitis espontánea, se requiere el uso de microbiota intestinal y los animales pueden permanecer libres de colitis en el caso de que mantengan condiciones libres de microorganismos. *Helicobacter*, un microorganismo cuya presencia varía, ejerce una influencia sustancial sobre el desarrollo y severidad de colitis espontánea e inducida y podrían atribuírsele algunas discrepancias observadas entre modelos y laboratorios. Otro constituyente confuso de la microbiota son las bacterias segmentadas filamentosas (SFB), un grupo que puede inducir células T_H17 IL-17⁺. Se ha mostrado que la colonización de ratones libres de microorganismos con suero fetal bovino (SFB) con microbiota aislada de ratones BL6 induce diferenciación robusta de células T_H17 (Chassaing *et al.*, 2014).

II.5.2.1 El papel de la microbiota en la colitis inducida por DSS

Se ha observado que, para el correcto desarrollo inmune, la nutrición y la homeostasis intestinal requiere una microbiota completa. Un concepto emergente en la biología de mucosas mantiene que la adecuada interacción entre el sistema inmune innato, la microbiota y ligandos asociados es clave en la determinación del desarrollo y severidad de la colitis inducida por DSS. Se ha mostrado que el agotamiento del microbiota por antibióticos de amplio espectro agrava la colitis

inducida por DSS. De modo interesante, la administración de ligandos específicos a TLR2 y TLR4 (ácido lipoteicoico y LPS, respectivamente), solo con DSS, provee protección sustancial contra la colitis inducida por DSS en ratones con agotamiento de mucosa. Además, estos ligandos de TLR no protegieron en ratones con colitis inducida por DSS deficientes en sus respectivos TLR. De modo similar, la administración de flagelina, ADN CpG y dipéptido muramilo, respectivamente reconocidos por TLR 3, 5 y 9, así como NOD2, proveyó protección significativa contra la colitis inducida por DSS. Además, el desarrollo de colitis severa inducida por DSS es empeorado en ratones deficientes en MyD88 que carecen de toda la señalización de TLR (exceptuando la de TLR3), incluyendo la requerida para la producción de citocinas del inflamosoma (IL-1 β e IL-18). Estos resultados muestran la idea de que la interacción entre la inmunidad innata y la microbiota intestinal es determinante en el resultado de patogénesis microbial inducida por DSS. En modelos de inflamación intestinal inducida, la microbiota es un arma de doble filo porque, así como protege contra la inducción de la colitis química, también provoca más daño de la enfermedad por la diseminación de ligandos proinflamatorios (Chassaing *et al.*, 2014).

II.5.2.2 Apoptosis del tracto epitelial y la proliferación

El tracto gastrointestinal está bordado por una monocapa frágil de células epiteliales caracterizadas por su alto recambio. El mantenimiento de la función de la barrera intestinal requiere un delicado y dinámico balance entre la pérdida epitelial por apoptosis y la generación de nuevas células por proliferación. Cuando este balance es llevado al exceso o insuficiencia de apoptosis, un amplio rango de enfermedades gastrointestinales puede manifestarse. Durante la colitis inducida por DSS, el recambio de las células epiteliales puede ser influenciada por un amplio número de factores como la dieta, microbiota intestinal, varios factores de transcripción y citocinas proinflamatorias, así como sus interacciones. Por ejemplo, los ratones deficientes MyD88 son altamente susceptibles a la apoptosis celular epitelial inducida por DSS y muestran poca proliferación, agravándose su enfermedad (Chassaing *et al.*, 2014).

La citocina proinflamatoria más potente, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es el principal objetivo de las terapias de enfermedad inflamatoria intestinal humana y está altamente regulado de forma positiva durante la inflamación del tracto inducida por DSS. La señalización de TNF- α parte de dos receptores, TNFR1 y TNFR2. La señalización por TNFR1 está asociada con apoptosis y producción de citocinas, mientras que la señalización vía TNFR2 se asocia con la proliferación y mejora de la sobrevivencia celular. De modo interesante, la eliminación de TNFR2 agrava no sólo la colitis inducida por DSS sino igualmente la inducida por TNBS, mostrando esto la importancia tanto de los procesos de apoptosis y proliferación en la influencia de los resultados de la colitis inducida químicamente (Chassaing *et al.*, 2014).

II.5.2.3 Influencia de perfiles específicos de citocinas en la colitis inducida por DSS

Las citocinas producidas por las células T cooperadoras (T_H1, T_H2 y T_H17) tiene un gran impacto en la inflamación intestinal. El estudio de varios modelos animales, así como de EII humana muestran que la colitis es un proceso llevado a cabo por las células T_H1/ T_H17 (por la producción de IFN- γ e IL-12) y que la CU es llevada a cabo por las células T_H2 (por la producción de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13). La colitis inducida por DSS, mientras que no es un típico modelo de T_H1, se aproxima más a la CU humana. Se ha mostrado que en la colitis inducida por DSS, la secreción de IL-4 está regulada de forma positiva y la eliminación de la misma interleucina agrava la severidad de la enfermedad. A pesar de esto, la colitis inducida por DSS muestra la aproximación más confiable de una enfermedad humana. Se ha establecido que IL-18 e IL-12 juntas pueden inducir a IFN- γ . De modo más interesante, IL-18 en combinación con IL-2 es un fuerte inductor de la citocina de T_H2 IL-4 (Chassaing *et al.*, 2014).

El modelo de colitis inducida por DSS también ha mostrado diferencias entre las cepas de ratón basadas en el avance progresivo de la patología inducida por el

químico. Por ejemplo, en el modelo de colitis inducido por DSS los ratones C57BL/6 y Balb/c son T_H1 y T_H2 , respectivamente. Ambas cepas desarrollan colitis acompañadas de niveles incrementados de IL-1 α/β , IL-6, IL-18 y G-CSF. Sin embargo, tras la remoción del DSS, los ratones Balb/c se recuperan de los síntomas dentro de dos semanas y tienen una completa recuperación a las 4 semanas, tal como ha sido mostrado en histopatología y la producción local de citocinas. Por otro lado, la cepa C57BL/6 continúan con la pérdida de peso y muestran alta defecación y heces poco sólidas aún luego de 5 semanas tras la cesación del DSS. Además, la remoción de una dosis aguda de DSS de los ratones C57BL/6 han mostrado avance de inflamación aguda a crónica con manifestación de síntomas sistémicos (Chassaing *et al.*, 2014).

Para este proyecto de investigación, será utilizada la cepa CD1, un modelo de ratón de origen suizo y descendiente de dos ratones machos y siete hembras albinas no endogámicas, importadas por el Instituto Rockefeller en 1926 de Lausana (Suiza). Sus descendientes fueron distribuidos alrededor del mundo y la cepa fue establecida en 1948 en el Instituto de Investigación del Cáncer (ICR, por sus siglas en inglés) (ENVIGO, 2017).

II.6 Botanas

II.6.1 Generalidades de las botanas

Las botanas han definidas como aquellos alimentos que son consumidos entre las comidas de mayor tamaño o las tradicionales tres comidas diarias, son populares debido a su conveniencia y el efecto de saciedad que producen en los consumidores (Forbes, Kahiya, & Balderstone, 2016). Sin embargo, esta definición puede cambiar dependiendo de la distribución de alimentos entre los países. Por ejemplo, mientras que Australia tiene desayuno, *brunch*, almuerzo (*lunch*) y cena; México presenta 4 (desayuno, almuerzo, comida y cena), China 3 (desayuno, almuerzo y cena) y Estados Unidos de Norteamérica 4 (desayuno, *brunch*, almuerzo y cena o *supper*) (Wang *et al.*, 2018). Dentro de la normatividad mexicana,

son productos que cuentan con cuatro elementos dentro de su definición, a saber (NOM-187-SSA1/SCFI-2002):

- **Origen de materia prima:** Pastas de harinas, cereales, leguminosas, tubérculos o féculas; o granos, frutas y frutos, con o sin cáscara o cutícula.
- **Procesamiento:** Nixtamalizados, fritos, horneados, explotados, cubiertos, extruidos o tostados.
- **Aditivos:** Con o sin sal u otros ingredientes adicionales o aditivos alimentarios.

Dependiendo del mercado que se considere, las botanas pueden tener otros productos dentro de su clasificación. En países como Estados Unidos, por ejemplo, el mercado de botanas incluye las galletas, barras de caramelos, palomitas de maíz y pizza. En México, este mercado además de productos de frituras, incluye confitería, bizcochos, dulces y caramelos. Por volúmenes, el 36% del mercado de botanas nacional está conformado por frituras de harina de maíz y trigo, 27% por papas fritas, 19% por totopos y tostadas, 11% por otros productos inflados u horneados, 4% por cacahuates y semillas y 3% por otros productos generales (Limón Celorio & León Félix, 2014).

El mercado mundial de botanas (*snacks* en inglés) se estima que alcance en 2021 un cifra de USD \$ 75.7 mil millones (Mendoza, 2016). Esto ha provocado altas tendencias de consumo en diferentes países del mundo. Particularmente para México, cerca del 68 % de niños y adolescentes de 2-18 años consume botanas, y estas pueden representar hasta el 20 % de la ingesta calórica diaria (Wang *et al.*, 2018). Estudios nacionales en tendencias del consumo han indicado que cerca del 86 % de los adultos mexicanos compra botanas varias veces por semana (Gaona-Pineda *et al.*, 2018). El fuerte consumo de productos de este tipo hipercalóricos y pobre contenido nutricional ha estimulado esfuerzos industriales para generar productos más saludables, que cumplan los lineamientos nacionales de los productos bajos en grasa y altos fibra, indicados por la NOM-086-SSA1-1994 (Secretaría de Salud Pública de México, 1994):

- **Productos bajos en grasa:** Su contenido de grasa es menor a 3 g por porción o menor a 3 g por cada 50 g de producto.
- **Productos reducidos en grasa:** Su contenido de grasa es un 25 % menor en relación al contenido de grasa de un alimento original o su similar.
- **Productos adicionados con fibra:** Su contenido es igual o mayor de 2.5 g de fibra por porción en relación al contenido del alimento original o similar.
- **Producto sin calorías:** Contenido de calorías menor a 5 Kcal por porción.
- **Producto bajo en calorías:** Contenido de calorías menor o igual a 40 Kcal/porción (40 Kcal/50 gramos de producto).
- **Producto sin calorías:** Contenido de calorías un 25% menor en relación al contenido de grasa del alimento original o su similar.

Básicamente, la mala fama de la que gozan estos productos debido a su bajo contenido nutricional y el exceso de calorías porque son sometidas a procesos industriales tales como la fritura, favoreciendo el desarrollo de diversas condiciones en la salud (Forbes *et al.*, 2016). En respuesta a esto, desde 2013 el gobierno federal implementó la Estrategia Nacional para la Prevención y el Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes (ENSOD), que entre los pilares en los que se sustentó, se encontraba una sección dedicada a la regulación sanitaria y la política fiscal. Entre esta sección, se estableció un impuesto especial sobre producción y servicios (IEPS), tanto de bebidas azucaradas (1 peso por litro) como de los alimentos con alto contenido calórico (8% a alimentos de más de 275 kcal por cada 100 g.). La estrategia llamó el interés internacional por ser de tipo integral e intersectorial (Aburto *et al.*, 2017). Este impuesto ha sido efectivo en la reducción del consumo de bebidas azucaradas hasta un 12% para datos de diciembre de 2014 y del 3.4% del volumen de compra de botanas hipercalóricas. Sin embargo, estudios llevados a cabo por Alburto *et al.* (2017) indicaron que una estrategia más efectiva era limitar el número de porciones por empaque, algo que es difícil debido a la alta variedad de productos existentes, y que el bajo precio que tienen las

botanas en general no ha sido una limitante significativa para su consumo, por lo que se asume que un impuesto de al menos el 20% sí sería determinante para reducir el consumo de estos productos en un 10%.

Una estrategia pueden ser los mercados de botanas saludables, una tendencia que se fundamenta en los cambios de patrones de consumo de botanas que están experimentando los consumidores. La ya mencionada encuesta Nielsen de 2014 buscó realizar una proyección a futuro respecto a qué esperaban los consumidores del mercado de botanas en el futuro, donde el 45 % consideró que el uso de ingredientes naturales es muy importante, el 34 % que fueran bajas en sal, 32 % bajas en grasa y 37 % altos en fibra. Esto responde asimismo a la tendencia registrada en 2015 donde, respecto al año anterior, hubo un incremento del 33% en la tendencia del consumo de botanas saludables en Norteamérica y se estima que el 30 % de los padres de familia actuales sirven botanas saludables para sus hijos en la misma región (Mintel, 2015).

Esto nos lleva a otro gran mercado que está mostrando gran auge en la actualidad, como es el mercado de las botanas saludables, el cual utiliza nuevas alternativas de productos que incorporan toda una gama de ingredientes que responden a esta necesidad. Desde el año 2013 el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) ha propuesto estándares a fin de proveer opciones alimenticias saludables especialmente para los niños en edad escolar, indicando que estos alimentos tengan como características, entre otras (Forbes *et al.*, 2016)

- Promoción de botanas saludables que contengan granos enteros, vegetales o proteínas como ingredientes principales.
- Asegurarse que las botanas sean bajas en grasa, azúcar y sodio, y provean los nutrientes necesarios.
- Flexibilidad para comunidades locales, es decir, asegurar regímenes de autonomía locales. Dentro de esto puede incluirse el respeto a las tradiciones y significancia local de algunos productos alimenticios.

Estas características son coherentes con el consumo de leguminosas como el frijol y de cereales como el maíz, los cuales podrían fungir como alternativas de ingredientes saludables para la elaboración de botanas.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

III. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años ha habido un incremento de las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), adquiriendo relevancia la colitis ulcerosa crónica idiopática (CUCI), siendo la EII la más común y al estar directamente vinculada a patologías como el cáncer colorrectal (CR), tipo de cáncer que hoy ocupa el cuarto sitio en su incidencia en México, responsable de 700 mil muertes al año. Entre los numerosos factores de riesgo que se han vinculado a CUCI, cobra importancia la dieta como blanco terapéutico potencial no invasivo de reducción de diversos biomarcadores de inflamación.

La dieta y el estilo de vida son importantes en el desarrollo de la CUCI, es por ello que existe interés en la comunidad científica en proponer alternativas de alimentos funcionales. En este sentido el maíz (*Zea mays* L.) y el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) podrían ser una opción viable debido a su importancia cultural y alimenticia dentro de la dieta tradicional mexicana, ya que pueden ser incorporados como materia prima en la elaboración de botanas, de alto consumo a nivel nacional y mundial. Entre la gran diversidad de cultivares de frijol común comercializados en México, Bayo Madero se perfila como alternativa promisorio puesto que se ha reportado características químicas y nutrimentales destacables sobre otros cultivares, y efectos quimiopreventivos promisorios en cáncer de colon *in vitro* e *in vivo*. Asimismo, variedades modificadas de maíz que reúnan características nutricionales relevantes podrían ser incorporadas como ingredientes en la elaboración de productos alimenticios saludables.

Todos estos efectos son debidos a la alta cantidad y variedad de compuestos bioactivos que han sido reportados de los mismos, muchos de los cuales quedan retenidos en la fracción no digerible (FND), la cual alcanza el colon y es fermentada por la microbiota colónica, produciendo diversos metabolitos de los que no han sido estudiados a profundidad su efecto conjunto sobre la CUCI cuando son liberados de una matriz compleja como la botana horneada hipocalórica elaborada a partir de maíz nixtamalizado y frijol común cocido. Se busca que sea hipocalórica a fin de

estar acorde con los objetivos nacionales de reducir el consumo de productos de alto contenido calórico.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

IV. HIPÓTESIS

El consumo de una botana horneada de harina de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido var. Bayo Madero producirá diversos metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, propiónico y butírico), que generarán efectos antiinflamatorios *in vitro* disminuyendo promotores inflamatorios (óxido nítrico, peróxido de hidrógeno y proteínas del proceso inflamatorio) y modulará el inflamasoma NLRP3. En un modelo *in vivo* de colitis crónica en ratones macho de la cepa CD1 generará efectos protectores de la mucosa colónica regulando marcadores macroscópicos, bioquímicos (proteínas proinflamatorias en suero), enzimáticos (enzimas fecales y colónicas) y disminuirá la expresión de genes asociados al proceso inflamatorio diferentes marcadores pro inflamatorios (IL-1 β , IL-6, IL-17A, TNF- α e IFN- γ).

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

Estudiar el efecto antiinflamatorio del consumo de una botana horneada de harina de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en un modelo *in vivo* de colitis crónica.

V.2 Objetivos específicos.

1. Caracterizar nutracéuticamente la botana horneada de harina de maíz nixtamalizado y frijol común cocido.
2. Evaluar el efecto de compuestos fenólicos y ácidos grasos de cadena corta del extracto fermentado de la fracción no digerible de la botana sobre la inhibición en la producción de óxido nítrico, peróxido de hidrógeno, nivel de expresión de proteínas y modulación del inflammasoma NLRP3, en monocultivo de macrófagos murinos RAW 264.7 y un co-cultivo de monocitos humanos THP-1 diferenciados a macrófagos, y células Caco 2.
 - 2.1. Evaluar el efecto de los metabolitos del extracto fermentado de la fracción no digerible del totopo en la modulación de marcadores antiinflamatorios de un monocultivo de macrófagos RAW 264.7.
 - 2.2. Evaluar el efecto de los metabolitos del extracto fermentado de la fracción no digerible del totopo en la inhibición de la activación del inflammasoma NLRP3 en un modelo de inflamación intestinal de un co-cultivo de monocitos humanos THP-1 diferenciados a macrófagos, y células Caco 2.
3. Evaluar, en un modelo *in vivo* de colitis crónica, el efecto del consumo de la botana horneada de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido.

- 3.1. Evaluar el efecto del consumo de la botana horneada en un modelo de dosis-respuesta sobre parámetros como ingesta de alimento y ganancia de peso de animales.
 - 3.2. Medir actividad de β -glucuronidasa, mieloperoxidasa, calprotectina y lactoferrina; contenido de compuestos fenólicos, ácidos grasos de cadena corta, metabolitos y pH en las heces semanalmente, en respuesta al consumo de la botana.
4. Evaluar parámetros morfológicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos posterior al sacrificio de animales alimentados con diferentes dosis de la botana.
 - 4.1. Realizar mediciones morfológicas asociadas a colon, bazo e hígado.
 - 4.2. Estimar el grado de lesiones colónicas por medio de técnicas histopatológicas.
 - 4.3. Estimar si el daño colónico es por apoptosis y/o necrosis.
5. Cuantificar la expresión de genes y proteínas en plasma y colon relacionados con colitis en el modelo *in vivo* de colitis (IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ).

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Materiales

VI.1.1 Reactivos

Se utilizaron α -amilasa, proteasa, amiloglucosidasa, (+)-catequina, ácido ferúlico, vainillina, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), Trolox, reactivo de Folin-ciocalteu, ABTS (ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) y kit de glucosa (GAGO20-KT) de la marca Sigma-Aldrich, medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de American Type Culture Collection (ATCC, Manassa, Estados Unidos), Albúmina Sérica Bovina (Sigma-Aldrich, Canadá Ltd.), Plasmina Sérica Bovina (Sigma-Aldrich, Canadá Ltd.); 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), Dimetil Sulfóxido (DMSO), Suero Fetal Bovino (SFB), antibióticos y antimicóticos de la marca Gibco (Gibco, Grand Island, New York); Proteasa, α -amilasa, pepsina, pancreatina y bilis bovina; Dextrán Sulfato de Sodio (DSS) de la marca Sigma-Aldrich.

Del mismo modo, se utilizaron acetona, etanol, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, éter etílico, éter de petróleo, ácido bórico, ácido sulfúrico, acetato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de potasio, fosfato monobásico de sodio monohidratado y metanol; así como otros reactivos de la marca J.T. Baker.

VI.1.2 Material biológico

VI.1.2.1 Materia Prima

Se utilizó maíz (*Zea mays* L.) y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) producidos por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Bajío. Se utilizó frijol variedad Bayo Madero y maíz variedad PBN (Población Blanca del Noroeste), población de grano blanco adaptada a regiones subtropicales e integrada con germoplasma resistente a enfermedades

calidad de tallo; éste maíz tiene una textura de endospermo que varía de cristalina a semi-dentada y ha sido seleccionado para incrementar su contenido de aceite.

VI.1.2.1.1 Acondicionamiento de la materia prima

VI.1.2.1.1.1 Harina de maíz

VI.1.2.1.1.1.1 Proceso de Nixtamalización

Se llevó a cabo un proceso tradicional de nixtamalización de acuerdo a la metodología descrita por Serna-Saldívar *et al.*, (1990). Para la cocción, se utilizó una relación de maíz-agua de 1:2 (1 kg de maíz por cada 2 litros de agua). Se añadió una cantidad de hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) equivalente a 1% en base al peso inicial del grano, con un tiempo de cocción aproximado de 40 minutos. Se dejó reposar por 8 horas y se lavó para eliminar los componentes orgánicos liberados y el exceso de calcio.

El grano nixtamalizado fue sometido a molienda en un molino de piedras y se deshidrató en un secador tipo industrial Flash a una temperatura de $250 \pm 10^\circ\text{C}$ durante 10 segundos. La harina obtenida se dividió a la mitad y cada una de las partes se molió con un molino de martillo con mallas de 0.5 mm y 0.8 mm, respectivamente, con un tamaño de partícula donde al menos el 50% de las mismas atravesaban un tamiz de tamaño 250 μm . Finalmente, se integraron las dos partes de la harina y se almacenó a 4°C , protegiéndola de la luz.

VI.1.2.1.1.2 Harina de frijol

Se siguió la metodología descrita por Aparicio - Fernández *et al.* (2005), para lo que se tomó una relación de frijol-agua de 1:4. Se realizó un proceso de cocción de 2.5 horas a 95°C . Una vez realizada la cocción, el frijol junto al caldo de cocción se secaron en un horno por convección a 60°C durante 4 horas y el producto obtenido se molió y tamizó. Para ello, se utilizó una malla 60 para la reducción del tamaño de partícula. La harina obtenida se almacenó a 4°C , protegida de la luz.

VI.1.2.1.1.3 Elaboración de la botana

Se elaboró la botana horneada de acuerdo al procedimiento reportado por Lizardo-Ocampo *et al.* (2017). Por cada 100 g. de mezcla de harinas maíz nixtamalizado/frijol cocido se añadieron 100 mL de agua y 1.5% de sal, se formó una masa por medio de una amasadora (110 RPM/15 minutos) y se laminó la masa con 1.5 ± 0.2 mm de espesor. Las piezas se cortaron usando un troquelador triangular para obtener la forma de totopos. Finalmente, los totopos fueron horneados utilizando un horno eléctrico precalentado a $180 \pm 2^\circ\text{C}$ por un tiempo de 32 min.

VI.1.2.2 Animales de experimentación

Para el modelo animal se emplearon ratones machos de la cepa ICR/CD1 de 5-6 semanas de edad con un peso aproximado de 20 - 25 g. Los animales se adquirieron en el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Juriquilla.

VI.1.2.3 Cultivo celular

La línea celular RAW 264.7 de macrófagos murinos se cultivó en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (ATCC) adicionado con suero fetal bovino (10 %, Gibco, Grand Island, New York), antibióticos y antimicóticos (1 %), bicarbonato sódico (1.5 g/mL) y piruvato de sodio (0.1 %). El medio de cultivo se cambió por medio fresco cada tercer día hasta alcanzar la confluencia. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C bajo una atmósfera humidificada de CO_2 (5%) en una incubadora Thermo Scientific 3100. Las células fueron manejadas en una cámara de bioseguridad (NuAire) (López-Barrera *et al.*, 2016).

La línea celular de leucemia monocítica aguda humana (THP-1) y las células de cáncer colorectal humano (Caco 2) fueron adquiridas de American Type Cell Culture Collection (ATCC, Manassa, VA, USA), las cuales fueron cultivadas en medios de cultivo RPMI/MEM respectivamente, utilizando suero fetal bovino (SFB), antibióticos (estreptomina/penicilina) y piruvato de sodio.

VI.2 Métodos

VI.2.1 Determinación de la composición nutracéutica de la botana horneada

VI.2.1.1 Obtención del extracto metanólico

Para la extracción de los compuestos fenólicos libres, se siguió la metodología descrita por Cardador-Martínez *et al.* (2002) con algunas modificaciones. Se molieron finamente 100 mg de la muestra (tamaño de partícula aproximado de 60 micras), se colocaron en un matraz de 50 mL, y se adicionaron 10 mL de metanol. El matraz se protegió de la luz y se mantuvo en agitación por 24 horas a 25 °C. Una vez terminado el proceso anterior, las muestras se centrifugaron a 5000 x g por 10 minutos y el sobrenadante recuperado fue el extracto metanólico con el que se realizó la determinación de compuestos fenólicos libres.

La extracción de los compuestos fenólicos ligados se hizo en el precipitado producto de la extracción de los compuestos fenólicos libres, siguiendo la metodología reportada por Pérez-Jiménez *et al.* (2008) y Saura-Calixto, Serrano, & Goñi (2007). A la muestra (0.5 g) se le añadieron 20 mL de metanol y 20 mL de ácido sulfúrico y se incubó a 85 °C durante 20 horas en baño María con agitación. Posteriormente los tubos se enfriaron y se centrifugaron (3000 rpm, 10 min), recuperando el sobrenadante, el cual se colocó en un matraz aforado de 50 mL. Posteriormente, el residuo se lavó dos veces con agua destilada (10 mL) y se centrifugó a las mismas condiciones indicadas. Los sobrenadantes fueron recolectados y se aforaron a 50 mL con agua destilada.

A continuación, los hidrolizados se ajustaron a pH 5.5 (NaOH 6 M) y nuevamente se centrifugaron a las mismas condiciones. Finalmente, se recolectó el sobrenadante y las muestras se concentraron en un concentrador de vacío Savant SpeedVac (SC210A-230, Thermofisher). Estos concentrados fueron homogenizados con metanol (1 mL) para análisis por HPLC y UPLC.

VI.2.1.2 Análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por Microextracción en Fase Sólida (SPME) con análisis por Cromatografía de Gases acoplada a masas (GC-MS) en heces

Para la cuantificación de los AGCC se realizó microextracción en fase sólida de las muestras (SPME) con análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) de acuerdo a la metodología por Zamora-Gasca *et al.* (2015). Para ello, se tomaron muestras de los recipientes de cultivo por lotes y se centrifugaron (Hermle Z 323 K; Wehinger, Alemania) a 3500 x g durante 15 min a 4°C. Del sobrenadante de 500 mg se pesaron en un vial 20 mL que se taparon y se colocaron en un automuestreador Gerstel MPS2. Se utilizó una fibra de 2 cm de polidimetilsiloxan-divinilbencen-carboxano para la microextracción en fase sólida (SPME) donde las condiciones de extracción fueron las siguientes: la temperatura de extracción de 45°C, el tiempo de incubación de 5 min, la velocidad de agitación de 250 rpm por 120 min de extracción, se utilizó una temperatura de desorción de 240°C durante 10 min. Lo anterior mencionado se realizó para tres extracciones repetidas independientes para cada muestra.

Las muestras fueron analizadas en un sistema de cromatografía de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas (CG-MS) Agilent 7890A GC (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) equipado con un detector selectivo de masas Agilent 597C VL y un automuestreador de usos múltiples MPS2 XL (Gerstel). La separación de las muestras en el CG se llevó a cabo en una columna capilar DB-5MS (60 m x 250 µm x 0.25 µm; Agilent) utilizando helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min. La inyección se llevó a cabo a una temperatura de 250°C y el origen del espectrómetro de masas y cuadrupolo se mantuvieron a 230°C y 150°C respectivamente. La temperatura del horno se inició a los 40°C durante 5 min y se programó a 5°C/min desde 40 a 200°C, se mantuvo a 200°C durante 2 min, luego se programó a 20°C/min hasta 230°C y se continuó durante 15 min. La

cuantificación de las muestras se obtuvo a través de curvas de calibración de los ácidos acético, propiónico y butírico.

VI.2.2 Digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro*

VI.2.2.1 Digestión gastrointestinal *in vitro*

Se simuló todo el proceso digestivo (desde la boca hasta su fermentación en el colon) de la botana horneada de maíz nixtamalizado y frijol común, mediante la técnica adaptada y modificada por Campos-Vega *et al.*, (2015).

A continuación se describe la metodología por etapas que fue utilizada, incluyendo la participación de individuos sanos e intestinos de ratas, previo análisis y aprobación de éste protocolo por el Comité de Bioética de Universidad Autónoma de Querétaro y tomando en cuenta las disposiciones para el tratamiento de los animales de acuerdo a las pautas de CIOMS, en donde se establece que el correcto uso de animales debe conformarse de acuerdo a investigación médica en seres humanos, buscando medidas que eviten o minimicen riesgos y supervisen la seguridad. Asimismo, se consideró que la evaluación científica está vinculada a la ética, siendo ésta última esencial en la consideración de los aspectos científicos de una propuesta y así determinar su validez (CIOMS, 2002).

En la etapa de boca participaron 4 voluntarios sanos, que debieron de haber consumido su último alimento al menos 90 min antes del ensayo. Se les pidió que se enjuagaran la boca con agua antes de masticar la muestra. Posteriormente, se les pidió a los voluntarios que masticaran 1 g de botana horneada de maíz nixtamalizado y frijol cocido durante 15 veces por 15 segundos, y se requirió que descargarán el contenido en un vaso de precipitado que contenía 5 mL de agua destilada. A continuación, cada individuo se enjuagó la boca por 60 segundos con 5 mL de agua destilada y depositaron dicho líquido en el vaso anterior. Luego de ello, se mezclaron las suspensiones de cada muestra en un único vaso y se preparó

un blanco que contenía únicamente agua destilada, igualmente sometida al procedimiento de masticación ya descrito.

Para la etapa de estómago, se tomaron 10 mL de la suspensión anterior y se les añadió una solución de HCl 2N con el fin de bajar el pH hasta 2.0. Se añadió a cada muestra pepsina (0.055 g, Sigma Aldrich) previamente disuelta en 0.94 mL de HCl 20 mM y se incubaron con agitación durante 2 horas a 37°C.

En la simulación del intestino delgado, se preparó previamente una disolución de 3 mg de hiel de buey con 2.6 mg de pancreatina, que fueron disueltos en 5 mL de solución amortiguadora de Krebs-Ringer [la cual consistió en 118 mM de NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM Glucosa y 2.5 mM CaCl₂ a pH 6.8, y se preparó 30 minutos antes de ser utilizada]. La solución anteriormente indicada se añadió a la muestra y al blanco, donde su suspensión (15 mL) fue transferida a un recipiente que contenía un saco intestinal invertido, obtenido de acuerdo a como se describe en los siguientes puntos.

Se emplearon 10 ratas macho de la cepa Wistar (peso entre 250 y 300 g), clínicamente sanas, a las que se les realizó la verificación del sexo, peso y constancia de salud. Las ratas fueron mantenidas por 24 horas en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Juriquilla. Se alojaron dos ratas por jaula de acero inoxidable (187 cm de ancho por 18 cm de alto) que permitieron la entrada de aire y luz, incorporando un clip a prueba de escape. Las ratas igualmente fueron mantenidas bajo condiciones controladas de humedad (50 ± 10 %), ciclos día/noche de 12/12 h, temperatura adecuada (23 ± 2 °C), condiciones aceptables de limpieza y ventilación constante (NOM-062-Z00-1999). Las ratas se alimentaron con alimento comercial Rodent Lab Chow 5001 (Nupec, Querétaro) y agua potable *ad libitum*. Dieciséis horas antes del sacrificio, se les retiró el alimento y únicamente se les dejó el agua, puesto que la técnica del saco invertido requiere que los animales tengan un ayuno de 16 h.

Para el sacrificio, las ratas se anestesiaron en una cámara de éter etílico. Una vez anestesiadas, se les realizó una incisión abdominal en la línea media y luego, corte en la aorta para su muerte instantánea. Luego, se expuso el intestino, y fue escindido un segmento de 20-25 cm del yeyuno proximal de cada rata, que fue colocado en una solución amortiguadora de Krebs-Ringer gasificado con CO₂ y mantenido a 37°C. El segmento de intestino removido se lavó con la misma solución amortiguadora para retirar residuos y posteriormente fue volteado suavemente sobre una varilla de vidrio y cortado en segmentos de 6 cm de longitud (aproximadamente), que se ligaron de un extremo (éste procedimiento se realizó con los segmentos de intestinos sumergidos en la solución amortiguadora de Krebs-Ringer para evitar la pérdida de viabilidad del tejido).

El intestino se llenó con 1 mL de la solución amortiguadora de Krebs-Ringer y el otro extremo se ligó para crear un saco, que fue inmediatamente incubado en un baño conteniendo los 15 mL de la suspensión de la simulación del estómago a 37°C por 2 h, en agitación continua (80 ciclos por minuto) y en atmósfera anaerobia (CO₂). Luego del período de incubación, los sacos se retiraron y la parte de las muestras contenida en el recipiente (posterior a retirar el saco intestinal), se denominó fracción no digerible (FND), que se congeló a -80 °C para su posterior uso.

Debido a que éste estudio sólo tuvo como interés el estudio del intestino de los animales, los órganos y tejidos restantes fueron almacenados en bolsas color rojo y congelados a -70°C. Las bolsas se marcaron con la leyenda “desechos patológicos” y se almacenaron por un período máximo de 15 días hasta su debido transporte e incineración, como procede con las muestras biológicas (NOM-087-ECOL-SSA1-2002). El material quirúrgico utilizado se dejó remojando con cloro por 12 h, se lavó posteriormente y esterilizó para su ulterior almacenamiento.

VI.2.2.2 Fermentación *in vitro* de la FND

Se siguió el método de fermentación *in vitro* descrito por Campos-Vega *et al.* (2009). Las fermentaciones se realizaron en tres experimentos independientes con duplicado para cada FND. Rafinosa (100 mg) fue empleada como control positivo del carbohidrato fermentable bajo las mismas condiciones. El inóculo fecal humano, empleado como fuente de microbiota representativa del colon, se obtuvo de dos individuos voluntarios sanos en su primera evacuación del día, con ausencia de enfermedades gastrointestinales y sin haber consumido antibióticos en los 3 meses previos a la toma de la muestra.

Se prepararon tubos estériles (15 mL) con 9 mL de medio de cultivo basal que contuvieron (g/L): agua peptonada 2.0, extracto de levadura 2.0, cloruro de sodio 0.1, fosfato dibásico de potasio 0.04, fosfato monobásico de potasio 0.04, sulfato de magnesio heptahidratado 0.01, cloruro de calcio dihidratado 0.01, carbonato de sodio 2.0, cisteína HCl 0.5, sales biliares 0.5, Tween-80 2 mL y hematina 0.2 g (previamente diluida en 5 mL de NaOH). Se sellaron los tubos y se mantuvieron bajo una atmósfera anaerobia que contenía una mezcla de gases (H₂-CO₂-N₂: 10:10:80, volumen) durante 24 horas. El inóculo fecal (3 g de materia fresca) se homogenizó con 27 mL de solución de fosfato de sodio 1 M pH 7.0. Los tubos que contenían el medio de cultivo basal se inoculados con 1 mL de homogenizado fecal y se adicionaron 0.250 mg y 0.250 mL de la FND, excepto para el control negativo. Se agitaron los tubos con vórtex durante 30 s y se incubarán en baño de agua a 37 °C. Se mantuvo un flujo continuo de la mezcla de gases hasta el término de la fermentación (24 h).

VI.2.3 Modelo *in vitro*: Monocultivo de macrófagos RAW 264.7

Para el modelo *in vitro* se partió del extracto fermentado de fracción no digerible (EFFND) que previamente se obtuvo. Este EFFND fue caracterizado química y nutracéuticamente en cuanto a su contenido de compuestos fenólicos libres, oligosacáridos, capacidad antioxidante por las metodologías de ABTS y DPPH y la

permeabilidad aparente de algunos de sus compuestos fenólicos como fue reportado previamente (Leakey *et al.*, 2008).

VI.2.3.1 Ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para viabilidad celular

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por parte de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo así determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. El método ha sido muy utilizado para medición de supervivencia y proliferación celular, donde la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Castro de Pardo, 2006).

Las células RAW 264.7 se sembraron en cajas de 96 pozos (ρ : 1×10^4 células/pozo) en medio de cultivo DMEM, adicionado con suero fetal bovino (10%), antibióticos y antimicóticos (1%). A las 24 h de incubación, el medio se sustituyó por el mismo DMEM pero suplementado con 0.5 % de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, Canadá Ltd.) conteniendo 0 % (control), 5, 7.5, 10, 15 y 20% del EFFND. Cada una de estas soluciones se preparó mezclando el extracto fermentado con lipopolisacáridos (LPS) para estimular la inflamación, en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Un ensayo similar pero sin la adición de lipopolisacáridos se lleva a cabo para determinar el efecto del extracto solo sobre viabilidad celular. Como control positivo se utilizó una solución de sólo lipopolisacáridos (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Todos los tratamientos se incubaron por otras 24 h a 37°C en atmósfera humidificada de 5% CO_2 .

Transcurrido dicho tiempo, el medio gastado se retiró. A las células tratadas de cada pocillo de la placa se les añadieron 200 μL de una solución preparada previamente de MTT disuelto en medio DMEM a una concentración de 0.5 mg MTT/mL libre de suero fetal bovino. La placa se incubó durante 3 h.

Luego de la incubación, el colorante que quedó sin reaccionar se retiró y los cristales de formazán, formados a partir de MTT, se disolvieron en DMSO. La placa se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a $\lambda=570$ nm en un espectrofotómetro. La viabilidad de las muestras se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \cdot 100$$

Los experimentos se realizaron por triplicado, en tres experimentos diferentes, para su posterior evaluación estadística.

VI.2.3.2 IV.5.6.2 Determinación de la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacáridos (LPS)

La acumulación de nitrito, un indicador de la producción de NO, se determinó en el sobrenadante del cultivo mediante el ensayo colorimétrico del reactivo de Griess. Los macrófagos RAW 264.7 (250 mil células por pozo) se trataron de forma similar a la descrita en el numeral anterior de viabilidad celular. Tras un tiempo de 24 horas, se retiraron 100 μL del medio gastado con ayuda de una pipeta multicanal y se pasaron a una nueva placa de 96 pozos. Se añadió reactivo de Griess [sulfanilamida al 1% disuelta en 5% de ácido fosfórico y 0.1% N (1-naftil) etilendiamina Dihidrocloreuro disuelta en agua] y se incubó durante 10 min en la oscuridad. La cantidad total de nitrito presente se calculó sobre la base de la absorbancia de las muestras a $\lambda=550$ nm a partir de una curva estándar de nitrito de sodio. Los experimentos se hicieron por triplicado, en tres experimentos diferentes, para su evaluación estadística.

VI.2.3.3 Cuantificación de la producción de peróxido de hidrógeno

La producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se midió utilizando el kit Amplex Red (Invitrogen). Brevemente, las células se cultivaron en una placa de 96 pozos (2.5×10^4 células/pozo) únicamente con medio DMEM (10 % SFB) por 24 horas (37 $^\circ\text{C}$, atmósfera humidificada de CO_2 al 5 %). Pasado el tiempo, se removió el medio y se reemplazó con DMEM adicionado con lipopolisacáridos (LPS) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y los

tratamientos del EFFND (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10 y 20 % v/v) para ser incubadas por otras 24. Tras la incubación, las células fueron desprendidas utilizando un asa estéril, se sonicaron por 1 min (Branson 3510, Danbury, CT) y se centrifugaron (Hermle Z 326, Wehingen, Alemania) a 1800 rpm por 1 min. Los sobrenadantes se removieron y las células se suspendieron con 100 μ L de solución amortiguadora de Krebs-Ringer, preparada de acuerdo con las instrucciones provistas por el kit (145 mM NaCl, 5.7 mM Na₃PO₄, 4.86 mM KCl, 0.54 mM CaCl₂, 1.22 mM MgSO₄, 5.5 mM glucosa, pH 7.35). Veinte microlitros se añadidos a una placa oscura de 96 pozos y se cuantificó su fluorescencia en un lector de fluorescencia tras adicionar los reactivos provistos por el kit (545 nm de longitud de excitación y 590 nm de longitud de onda de detección). Los resultados se compararon contra una curva de peróxido de hidrógeno.

VI.2.3.4 Cuantificación del nivel de expresión de proteínas del proceso inflamatorio

Se cultivaron macrófagos RAW 264.7 con una densidad de 1×10^6 células por placa de Petri y se trataron con 100 ng/mL de LPS en medio libre de SFB; y por otro lado, se trataron células con el IC₅₀ de la inhibición en la producción de óxido nítrico (ambos tratamientos por espacio de 24 horas). Posterior a ello, se lisaron las células (Halt's Protease Cocktail Inhibitor y Lysis Buffer, R&D Systems) y se aplicaron en las membranas de nitrocelulosa provistas por el kit Mouse Cytokine Antibody Array Panel A (ARY006, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La expresión de proteína detectó con reactivos quimioluminiscentes provistos en el protocolo y se analizaron con el software ImageQuant TL 8.1 (General Electrics, GE Healthcare, Chicago, Illinois). Los datos se expresaron como el cambio relativo respecto al control y se generaron redes de interacciones proteicas utilizando la plataforma STRING como ha sido sugerido por von Mering *et al.* (2007) a fin de categorizar el proceso biológico, componente celular y función molecular de acuerdo a la base de datos de ontología de proteínas, provista por la plataforma.

VI.2.4 Modelo *in vitro*: Co-cultivo de macrófagos humanos THP-1 y células Caco 2

Para el co-cultivo, se evaluó el efecto del EFFND en la modulación de la vía del inflammasoma a fin de explicar mecanismos de acción asociados al proceso inflamatorio, modulados por los compuestos bioactivos productos de la fermentación microbiana de la botana. Para ello, las células THP-1 se cultivaron (3×10^6 células, frascos de cultivo de 25 cm^2) durante un período de 2-3 días con 100 mM de PMA (12-miristato-12 acetato) a fin de estimular su diferenciación a macrófagos humanos. Las células se desprendieron con tripsina y se colocaron en placas de 12 pozos para inserto, a una densidad de 1.8×10^5 células/pozo, permitiéndoles re-adherirse por 1.5 horas.

Al mismo tiempo, se estimuló el crecimiento de las células Caco-2 a fin de permitir su diferenciación hacia tejido epitelial intestinal. Estas células se cultivaron en insertos (*transwell*) (tamaño de poro: $1 \mu\text{m}$) en una densidad de 1.8×10^5 células/ cm^2 y se mantuvieron por un período de 21 días. En el lado apical se colocó medio MEM mientras que en el compartimiento basolateral, se cambió progresivamente a medio RPMI sin mercaptoetanol a fin de ir introduciendo las células THP-1 (Kämpfer *et al.*, 2017). El modo como fueron co-cultivadas se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Proporciones de medio de cultivo de células Caco-2 y THP-1 en el co-cultivo.

| Días de cultivo | Medio de células Caco-2 (%) | Medio de células THP-1 (%) |
|-----------------|-----------------------------|----------------------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 2 | 100 | 0 |
| 5 | 66.6 | 33.6 |
| 7 | 66.6 | 33.3 |
| 9 | 50 | 50 |
| 12 | 50 | 50 |
| 14 | 33.3 | 66.6 |
| 16 | 33.3 | 66.6 |
| 19 | 0 | 100 |
| 21 | 0 | 100 |

Adaptado de Kämpfer *et al.* (2017).

Un esquema de este procedimiento se encuentra ejemplificado en la Figura 8 (Kämpfer *et al.*, 2017):

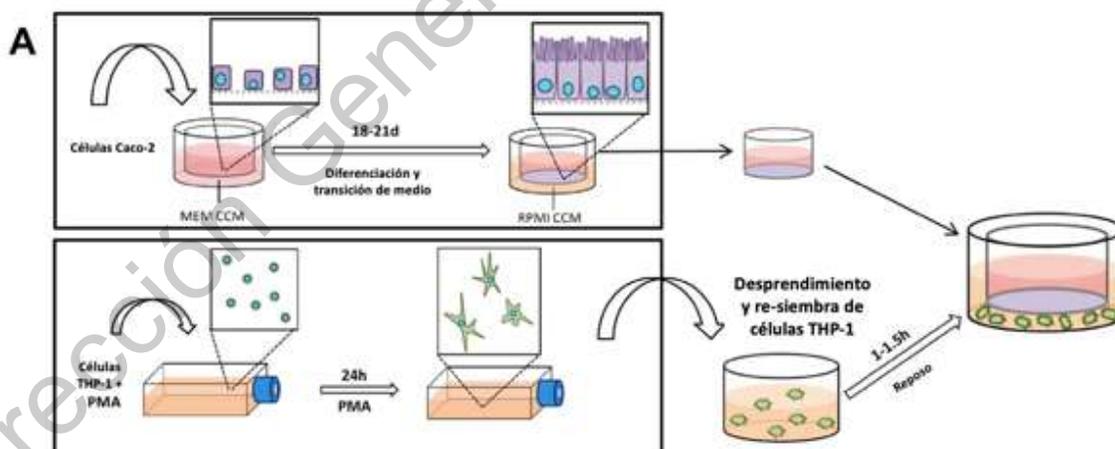


Figura 8. Esquema general del co-cultivo de células Caco-2 y monocitos humanos THP-1. Adaptado de Kämpfer *et al.* (2017).

VI.2.4.1 Simulación del estado sano de epitelio intestinal

Una vez que las células se encuentren en el co-cultivo, los principales parámetros que se consideraron en un estado sano del ambiente intestinal son:

- Los cambios en el medio de cultivo pueden causar una reducción temporal de la resistencia eléctrica transepitelial/endotelial (TEER, por sus siglas en inglés) de cerca del 10 %. Por lo tanto, este parámetro debería disminuir máximo un 10 %, en comparación con el monocultivo de células Caco-2, durante las primeras 24 horas del co-cultivo.
- El co-cultivo no debería inducir una activación de los macrófagos o estimular a las células epiteliales intestinales. Por tanto, la concentración de citocinas pro inflamatorias en el compartimiento basolateral no debería exceder de forma significativa a los niveles de citocinas liberadas por los monocitos THP-1 sin estimulación.
- Para la confirmación de la ausencia de células necróticas en el lado apical, el contenido de lactato deshidrogenasa (LDH) en el lado apical no debería ser significativamente mayor en comparación con el monocultivo de Caco-2.

En consecuencia, una vez realizado el co-cultivo, se midieron dichos parámetros a fin de asegurar un buen estado de desarrollo del mismo, parámetros que se recolectaron y sirvieron como control de estado sano del intestino.

VI.2.4.2 Simulación del estado de inflamación del epitelio intestinal

Como estresante fisiológico relevante se utilizó lipopolisacárido (LPS). Adicionalmente, el modelo debía asimilarse lo mejor posible al proceso inflamatorio de modo que se impida una destrucción sustancial o permanente de la barrera intestinal, por lo que se buscó un comportamiento en el que el sistema se recuperara por sí mismo y resolviera el proceso inflamatorio. Se tomaron como parámetros de presencia de inflamación en el sistema los siguientes:

- Reducción del TEER al menos en un 20-25 % en comparación con un control de células Caco-2 en monocultivo. Dicha reducción de al menos 20 % debe persistir por al menos 24 horas.
- Tras 4 horas de co-cultivo, los niveles de citocinas pro-inflamatorias deben exceder de forma significativa las concentraciones del co-cultivo estable. Por tanto, se midieron citocinas clave del proceso inflamatorio en los sobrenadantes celulares del compartimiento basolateral a las 4, 24 y 48 horas del co-cultivo por medio de ELISA.
- El TEER de las células Caco-2 debía restablecerse a más del 90 % tras 48 horas de co-cultivo.

Una vez estandarizado el proceso inflamatorio, se evaluó el efecto del EFFND en el sistema y el nivel general de elevación de citocinas pro-inflamatorias, así como la estimulación de citocinas antiinflamatorias. Asimismo, se realizaron mediciones continuas del nivel de TEER de la barrera intestinal de células Caco-2 y niveles de liberación de LDH en el co-cultivo.

VI.2.4.3 Medición de la resistencia eléctrica transepitelial/endotelial (TEER)

El TEER se midió utilizando un voltímetro (Millicell ERS-2, Millipore Millicell; Billerica, MA, USA) para evaluar el desarrollo de la barrera intestinal de la capa de células Caco-2 cada 2-3 días de cultivo, así como la integridad de la barrera en el co-cultivo con células THP-1 (luego de 4, 18, 24 y 48 h). El electrodo fue esterilizado en isopropanol (70 %) y neutralizado con PBS y MEM. Los resultados fueron corregidos respecto a un blanco y multiplicados por el tamaño del filtro a fin de obtener los resultados finales en Ohm por cm^2 ($\text{Ohm}\cdot\text{cm}^2$). Para el co-cultivo, los valores de TEER se expresaron como el porcentaje de los valores del control de Caco-2 del monocultivo (Kämpfer *et al.*, 2017).

VI.2.4.4 Cuantificación del nivel de citocinas en el medio extracelular por ELISA

La liberación de IL-1 β , IL-8, TNF- α y TGF- β 1 fue cuantificada utilizando los sobrenadantes libres de células del compartimiento basolateral tras 4, 24 y 48 horas del co-cultivo. Se utilizaron anticuerpos comerciales (R&D Systems, Santa Cruz Biotechnologies, según corresponda). Brevemente, los anticuerpos primarios fueron incubados toda la noche a temperatura ambiente en buffer de cobertura (0.1 M NaHCO₃, con agua MilliQ) en placas de 96 pozos de adhesión de proteínas. Tras lavados con PBS y Tween20 (0.05 %) y bloqueo (3 % BSA/PBS) por 1 hora a temperatura ambiente, los estándares de citocinas y las muestras se añadieron y nuevamente se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Se adicionaron los anticuerpos secundarios biotinilados y se incubaron por 45 min, seguido de incubación durante 30 min con peroxidasa-estreptavidina. La reacción fue detenida con 100 μ L de 3, 3', 5, 5' – Tetrametilbenzidina y adición de ácido sulfúrico (1 M). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 470 y 540 nm (Kämpfer *et al.*, 2017).

VI.2.4.5 Cuantificación de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)

Se midió la actividad enzimática de LDH, liberada tras el daño celular o la muerte de células necróticas. Brevemente, 50 μ L de TRIS 200 mM, 50 μ L de lactato de litio (50 mM) y 50 μ L de una mezcla de INT, PMS y NAD (1.32 mg/mL, 0.36 mg/mL y 3.44 mg/mL, respectivamente) se añadieron a una placa de 96 pozos. Subsecuentemente, 50 μ L de sobrenadante libre de células fueron transferidos e incubados por 5 min a temperatura ambiente. Se midió la densidad óptica a 490 nm en un espectrofotómetro. Como control se utilizaron las células expuestas a 0.1 % Tritón 100X en PBS por 24 horas.

VI.2.4.6 Citometría de flujo para evaluación de activación de caspasa-1 y muerte por piroptosis (apoptosis inducida por inflamación)

Los macrófagos producto del co-cultivo sin tratamiento, aquellos tratados con LPS para simulación del proceso inflamatorio y los sometidos al tratamiento de extracto fermentado de la fracción no digerible fueron recolectados en PBS frío y se tiñeron por 30 min (4 °C) con Anexina V-FITC o el sustrato YVAD-pNA, respectivamente, siguiendo las condiciones y procedimientos del fabricante. Tras la tinción, las células se lavaron dos veces con PBS precalentado (1 %BSA) y luego fueron analizadas inmediatamente en un citómetro de flujo CyAn ADP (FACScan Diva). Para el análisis citométrico, se estableció una compuerta directa y de dispersión lateral para excluir las células muertas y los agregados. Los datos se expresaron como porcentaje de células positivas para Anexina V-FITC o YVAD-pNA en comparación con el control sin tratar (Fleetwood *et al.*, 2017).

VI.2.5 Modelo *in vivo*

Todos los protocolos experimentales de animales utilizados en este estudio fueron sujetos a aprobación por el Comité de Ética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (Oficio: CBQ16/1116-6). Se utilizaron 60 ratones macho de la cepa ICR/CD1 de 6 semanas de edad, adquiridos en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Juriquilla. Se registró el peso corporal y constancia de salud; se alojaron 5 ratones por jaula (37.3 x 23.4 x 14.0 cm) y se aclimataron por una semana a 22-24°C con ciclos de luz-oscuridad 12/12 horas, humedad de 50 ± 10% con agua y alimento *ad libitum* (Rodent Lab Diet 5053). Se llevaron a cabo buenas prácticas de limpieza, las cuales consistieron en lavado diario de bebederos, comederos, pisos y bandejas de recolección; además de lavado de jaula y paredes cada tercer día de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999.

La composición proximal de la dieta basal y las diferentes dietas con botana horneada suministrada a los animales fueron las siguientes expresadas en el Cuadro 4 (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

Cuadro 4. Composición proximal de las dietas de los animales.

| Tipo de Dieta | Proteína | Lípidos | Cenizas | Carbohidratos | Fibra ¹ |
|------------------|----------|---------|---------|---------------|--------------------|
| Dieta Basal (DB) | 24.65 | 13.21 | 6.10 | 56.04 | 4.70 |
| 0.5 g T + DB | 24.61 | 12.32 | 5.92 | 57.68 | 6.28 |
| 1.0 g T + DB | 23.58 | 11.43 | 7.85 | 59.33 | 7.85 |
| 1.5 g T + DB | 22.56 | 10.54 | 5.57 | 60.97 | 9.43 |
| 2.0 g T + DB | 21.53 | 9.65 | 5.40 | 62.62 | 11.01 |

¹La fibra de la dieta basal ha sido expresada como fibra cruda total. Las demás corresponden a fibra dietaria total. Los valores han sido expresados como porcentaje en base seca. **DB:** Dieta basal; **T:** Totopo.

La selección de las dosis de botana de los animales se basó en la consideración de que el consumo calórico diario de los animales (ratones) equivale a 25.5 Kcal (en tanto que el de un ser humano está basado en una dieta de 2000 Kcal) (Cuadro 5). Además, se ha reportado que la máxima suplementación calórica a partir de botanas en seres humanos debe ser del 30 % de las Kcal totales diarias, de acuerdo a los lineamientos para el expendio y distribución de bebidas en establecimientos de consumo escolar de productos (Secretaría de Educación Pública, 2010).

Cuadro 5. Consumo calórico total murino y consumo calórico murino equivalente a partir de botanas (hasta el 30% del consumo calórico diario)

| | Valores (Kcal) |
|---|----------------|
| Consumo calórico total murino | 25.5 |
| Consumo calórico total murino a partir de botanas (30%) | 7.65 |

Además de ello, la botana tiene un contenido calórico aproximado de 3.89 kcal/g, por lo tanto, la máxima cantidad de botana que un ratón podría consumir es

aproximadamente 1.96 g, que fueron ajustados a 2 g botana/diaria/ratón como dosis máxima. Con base en los datos del Cuadro 5, se elaboraron las dosificaciones del Cuadro 6, mismas que fueron utilizadas en un estudio previo con la misma botana en un modelo *in vivo* de dislipidemia (Domínguez-Uscanga *et al.*, 2017).

Cuadro 6. Dosis de botanas utilizadas en la caracterización del modelo *in vivo* de colitis crónica a fin de evaluar el efecto de su consumo

| Dosis | Consumo calórico (%) | Ratón | | Humano | |
|-------|----------------------|-----------|-------------------------|-----------|-------------------------|
| | | Dosis (g) | Consumo calórico (Kcal) | Dosis (g) | Consumo calórico (Kcal) |
| 1 | 30.00 | 1.96 | 7.65 | 154.13 | 600.00 |
| 2 | 22.90 | 1.50 | 5.89 | 117.73 | 457.98 |
| 3 | 15.27 | 1.00 | 3.89 | 78.49 | 305.32 |
| 4 | 7.63 | 0.50 | 1.96 | 39.24 | 152.66 |

VI.2.5.1 Caracterización y establecimiento del modelo *in vivo*

La duración del experimento fue de 5 semanas. Después de la semana de adaptación, los ratones de la cepa ICR/CD1 se dividieron aleatoriamente en 7 grupos con una n=6. El control inducido y los grupos 1 al 5 fueron tratados con DSS 2 % suministrados *ad libitum* en el agua de beber. Al finalizar las 5 semanas los animales fueron sacrificados (Figura 9).

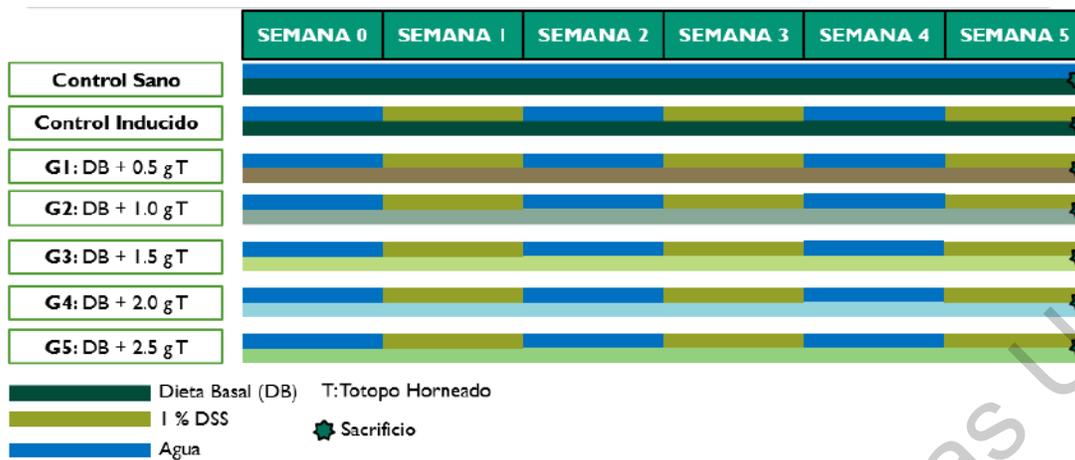


Figura 9. Estrategia experimental de la caracterización del modelo *in vivo*.

Se monitoreó semanalmente el peso corporal, consumo de alimento y se analizaron las heces (peso, consistencia, presencia y/o ausencia de sangre). Las heces recolectadas se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior determinación de pH, ácidos grasos de cadena corta (AGCC), actividad de la enzima β -glucuronidasa, contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. Como marcadores bioquímicos se realizó la medición de glucosa al finalizar el experimento. Una vez establecida la dosis de DSS, se procedió a realizar el modelo *in vivo* de colitis crónica, cuyo esquema se especifica en la Figura 10.

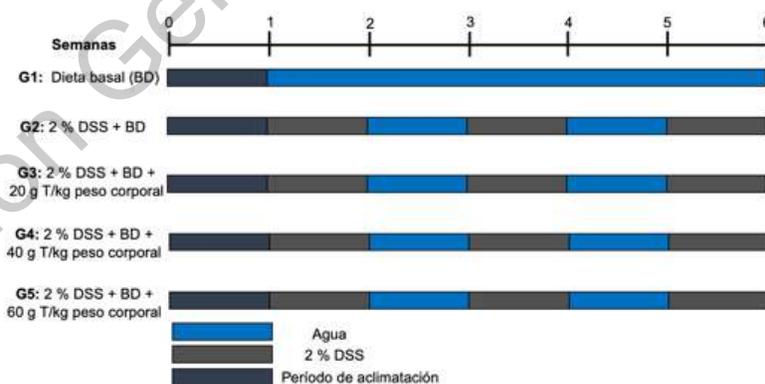


Figura 10. Evaluación del efecto del consumo de la botana horneada una vez caracterizado el modelo de colitis crónica.

El control sano corresponde a animales que sólo consumen la dieta basal y agua *ad libitum*. El control positivo corresponde a animales con la dieta basal y la dosis establecida de DSS en el agua *ad libitum*. El control negativo corresponde a animales con la dosis de DSS, dieta basal y agua *ad libitum* pero suministrando un antiinflamatorio. **T**: totopo o botana horneada; **DB**: Dieta basal.

VI.2.5.1.1 Medición del pH

El pH del contenido cecal, colónico y fecal fue medido empleando el procedimiento descrito por (Nakanishi *et al.*, 2003). Brevemente, un gramo del contenido cecal, colónico o heces fue suspendido en agua (5 veces su volumen); posteriormente la muestra se homogenizó y se realizó la medición de pH.

VII.2.2.1.2. Índice de Actividad de la Enfermedad (DAI)

Se procedió a realizar la metodología propuesta por Ghia *et al.* (2006) con algunas modificaciones. El DAI fue el puntaje combinado de la pérdida de peso, la consistencia de las heces y el sangrado. Los puntajes serán definidos de la siguiente forma:

- Para la pérdida de peso: 0, sin pérdida de peso; 1, 5 – 10 %; 2, 10 – 15%; 3, 15 – 20 %, 4, más del 20 %.
- Para la consistencia de las heces: 0, normal; 2, suaves; 4, diarrea.
- Para el sangrado: 0, sin presencia de sangre; 2, con presencia de sangre y 4, abundancia de sangrado.

VI.2.5.2 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Se empleó el protocolo descrito por Zhao *et al.* (2006) con algunas modificaciones. Brevemente, un gramo de contenido cecal, colónico y fecal fue suspendido en agua (5 veces colónico y fecal fue empleado su volumen) y homogenizado. La suspensión fue centrifugada a 8 000 g por 10 min a 4 °C; posteriormente, el pH se ajustó (2-3) con HCl 0.1 M. Posteriormente, la solución se filtró con una membrana (0.45 µm) y se inyectó en un cromatógrafo de gases (Hp 6890 Plus, acoplado a un

detector de flama). El volumen de muestra inyectado será de 1.5 μL . Se empleó una columna Hp 30 M, CARBOWAX 30 M; 25.0 M X 320 μM X 0.30 μm nominal. Como gas acarreador se utilizó helio a un flujo de 0.5 mL/min. El horno tenía temperatura inicial de 95 °C, se mantuvo mantener por 2 min y se elevó a 140 °C a 20 °C/min. Los ácidos: acético, propiónico y butírico, fueron empleados como estándares externos (0-100 mM/mL) para cuantificar los AGCC de las muestras.

VI.2.5.3 Determinación de la actividad de β -Glucouronidasa.

La actividad total de la enzima β -glucoronidasa fue determinada empleando el conjugado β -D-glucurónido de fenolftaleína como sustrato, donde la enzima presente en la muestra lo hidroliza y la fenolftaleína liberada se monitoreó a una longitud de onda de 540 nm (Jenab *et al.*, 1999). Brevemente, a 0.5 g de contenido fecal se le adicionaron 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.02 M a pH de 7.0. Esta solución se homogenizó por medio de un politrón y posteriormente se sonicó durante 6 min a 4 °C. Las muestras se centrifugaron a 500 g por 15 min recolectando el sobrenadante para llevar a cabo el ensayo enzimático. Para la mezcla de reacción se tomaron 800 μL de PBS 0.02 M, 100 μL de β -D-glucurónido de fenolftaleína 1 nM y 100 μL de extracto fecal. Esta mezcla se incubó por 1 h a 37 °C. Al finalizar la incubación, se adicionaron 2.5 mL de solución de glicina alcalina, 1 mL de ácido tricloroacético al 5% y 1 mL de agua HPLC, se mezcló e incubó por 10 min a temperatura ambiente, enseguida la absorbancia será medida a 540 nm. La relación de fenolftaleína liberada fue determinada en base a una curva estándar de fenolftaleína (0-13 μg) (Jenab *et al.*, 1999). La actividad enzimática total de la β -glucoronidasa fue expresada en nanomoles por minuto por gramo de contenido fecal.

VI.2.5.4 Determinación de mieloperoxidasa fecal

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima tipo hemo que cataliza la oxidación mediada por la peroxidasa de hidrógeno de iones haluro hacia ácido hipohaloso. La MPO es una enzima lisosoma, altamente expresada en neutrófilos, y juega un

papel importante en acciones antimicrobianas como resultado de la estimulación de neutrófilos. Para su medición se utilizó el kit de cuantificación colorimétrica de mieloperoxidasa de Sigma-Aldrich. Para ello, se prepararon mezclas de reactivos requeridos para la reacción (sustrato y solución amortiguadora) y 50 μL de estas mezclas se utilizaron como control positivo, para la muestra y para los blancos en una placa de 96 pozos. Tras incubación por 30, 60 y 120 minutos, se adicionó a cada pozo el reactivo de detención de la reacción y luego de 10 minutos de incubación se agregó el estándar de TNB, el reactivo cromóforo, que luego debe nuevamente se detuvo con el reactivo de parada. La absorbancia fue medida a 412 nm en un espectrofotómetro. Las muestras se expresaron como unidades de MPO, definida como la cantidad de enzima que hidroliza el sustrato y genera cloramina de taurina para consumir 1.0 μmol de TNB por minuto a 25 °C.

VI.2.5.5 Cuantificación de compuestos fenólicos libres en heces

Para la cuantificación de compuestos fenólicos en heces se siguió la metodología reportada por Espín *et al.* (2007). Brevemente, 1 g de heces se homogenizaron con 10 mL de una solución Metanol:HCl:H₂O (79.9:0.1:20) utilizando un Ultraturrax. La mezcla se transfirió a tubos de microcentrífuga y se homogenizarán (4°C, 14000 g) en una microcentrífuga Hermle (Hermle Z 233 K; Wehingen, Germany) por 10 minutos. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 μm y la muestra se analizó por HPLC-DAD utilizando la metodología reportada por Ramírez-Jiménez *et al.* (2014)

VI.2.5.6 Sacrificio de animales y obtención de muestras

El sacrificio de los animales fue realizado por anestesia con dióxido de carbono (CO₂) y posterior punción cardíaca a fin de extraer la sangre de los animales, siendo separada del suero y almacenada en refrigeración (el suero fue almacenado a -70 °C). El colon se removió (desde la unión ceco-colónica hasta el recto), se midió su longitud, se determinó su peso y se enjuagó con solución salina (0.9 % v/v) estéril.

Se tomaron secciones de 0.5 cm del colon proximal y distal, las cuales fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C. El colon remanente se fijó en solución amortiguada de formalina al 10 % para análisis histológico posterior. El bazo de los animales se removió y pesó como una medida indirecta de la inflamación extra intestinal inducida por DSS según lo reportado por Bylund-Fellenius *et al.* (1994).

VI.2.5.7 Análisis de expresión de genes

Para realizar el estudio de expresión de genes se utilizó el método RT-PCR (llamado así por el paso de transcripción inversa previo a la PCR), o ARN-PCR, consiste primero en una extracción de ARNm a partir del tejido en el que se quiere estudiar la expresión de un mensajero, seguido de la evaluación de la calidad y detección del ARN obtenido. El siguiente paso fue la síntesis de una cadena de cADN a partir del ARNm mediante una transcriptasa reversa (RT). Para ello se aprovechó la presencia de la cola poli(A) de los mensajeros y se utilizó como cebador un oligonucleótido sintético de polideoxitimidina (oligo[dT]) que se une a las colas de poli(A). Luego se tomó de esa solución una alícuota y se somete a una reacción de PCR utilizando una pareja de cebadores o «primers» específica del ARNm de interés a una temperatura adecuada, para obtener una cantidad de moléculas de ADN idénticas correspondientes a un fragmento del ARNm específico al que se quiere detectar. Se midieron genes específicos del proceso inflamatorio que pudieran estar modulados en los animales por el consumo de la botana (*TNF- α* , *IFN- γ* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10*, *MCP-1*, *MUC1*, *MUC2*, *MUC3*, *TFF3*, *TLR2*, *TLR4*). Como gen constitutivo se utilizó *rplp0*. El sistema Fluidigm BioMark HD System qPCR para medición múltiple por PCR de genes fue utilizado y los datos se analizaron con el software Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Qiagen).

VI.2.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar. Las diferencias entre medias para las pruebas de caracterización química, nutracéutica se analizaron mediante la prueba de Tukey y la prueba de Dunnett para el ensayo *in vitro* utilizando el programa estadístico JMP 8.1. Para el experimento *in vivo* se realizó la prueba de datos no paramétricos de Kruskal-Wallis.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1 Caracterización nutracéutica de la botana horneada

El Cuadro 7 muestra el contenido de compuestos fenólicos de la botana horneada 70:30, elaborada con dos cosechas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (2014 y 2015). Asimismo, se muestra el contenido de fenoles ligados de la botana 70:30 cosecha 2015.

Cuadro 7. A) Contenido de compuestos fenólicos libres de dos botanas horneadas 70:30 elaboradas con dos cosechas diferentes (2014 y 2015) de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido; B) Contenido de compuestos fenólicos ligados de la botana 70:30 (Cosecha 2015).

A)

| Compuesto Fenólico | Totopo 70:30 (Cosecha 2014) ¹ | Totopo 70:30 (Cosecha 2015) ¹ |
|--------------------|--|--|
| Ácido Gálico | 106.22 ± 5.33* | 98.17 ± 6.78* |
| Ácido Clorogénico | 93.19 ± 7.70* | 68.36 ± 5.72* |
| Catequina | ND | 10.73 ± 0.99 |
| Ácido Cafeico | 57.95 ± 5.81* | 29.57 ± 2.05* |
| Rutina | 153.68 ± 8.51 | 143.86 ± 20.20 |
| Ácido Elágico | 192.66 ± 12.89* | 146.81 ± 15.64* |
| Ácido Sinápico | 1202.74 ± 123.8* | 837.59 ± 103.22* |
| Ácido Ferúlico | 127.24 ± 3.91* | 58.88 ± 1.32* |
| Quercetina | 54.51 ± 9.06 | 55.96 ± 4.89 |

B)

| Compuesto Fenólico | Totopo 70:30 (Cosecha 2014) ¹ |
|--------------------|--|
| Ácido Gálico | 108.32 ± 0.08 |
| Ácido Clorogénico | 13.25 ± 0.06 |
| Catequina | 58.85 ± 0.20 |
| Ácido Cafeico | 12.12 ± 0.07 |
| Quercetina | 1.88 ± 0.01 |

Los valores han sido expresados como la media \pm DE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) por la Prueba de Tukey-Kramer. ¹Contenido de compuestos fenólicos expresado como μg . equivalentes de cada compuesto fenólico/ g de muestra.

El Cuadro 7A muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para todos los compuestos fenólicos, exceptuando los flavonoides rutina y quercetina, cuyo contenido permaneció sin diferencias. Aunque se han documentado variaciones en el contenido de compuestos fenólicos por procesos térmicos (Ombra *et al.*, 2016) en este caso las diferencias pueden ser atribuibles a la cosecha de frijol utilizada, que fue el único parámetro que varió entre ambos totopos, como ha sido reportado (Valdés *et al.*, 2011). La estabilidad de la Quercetina a diferentes procesos térmicos en frijol ya ha sido reportada previamente por otros autores (Huber *et al.*, 2014). En el caso de los compuestos fenólicos ligados, se cuantificó una menor variedad de estos en la botana, aunque el método de extracción utilizado permitió una mayor extracción de ácido gálico y catequina, encontrándose incluso en cantidades superiores a sus formas libres. Se ha reportado que los ácidos fenólicos simples y los flavonoides, que son los compuestos fenólicos más comunes, generalmente se encuentran en formas solubles e insolubles conjugadas, en las que los flavonoides se presentan a menudo en forma de glucósidos unidos a partes de azúcares a través de enlaces OH (enlaces O-glucosídicos) o a través de enlaces carbono-carbono (C-glucósidos) (Acosta-Estrada *et al.*, 2014). En este sentido, la incorporación de reactivos ácidos (como el ácido clorhídrico) y la posterior neutralización y alcalinización de la muestra ayudó a la ruptura de dichos enlaces, favoreciendo la liberación de los correspondientes compuestos fenólicos. Es notorio destacar que el alto rendimiento de catequina respecto a los compuestos fenólicos libres demuestra la alta estabilidad de los flavonoides a condiciones extremas de temperatura y pH a los que se sometió la muestra durante el proceso de extracción.

La importancia de cuantificar estos compuestos radica en que se ha demostrado que las condiciones fisiológicas del organismo (por ejemplo: variaciones de pH estomacal e intestinal y la actividad enzimática) permite la liberación y absorción de

dichos compuestos. Una ruptura parcial es inicialmente realizada en el lumen intestinal, iniciando su proceso de metabolización a través de su absorción por parte de los enterocitos; y otra parte de la misma, en algunos casos hasta el 95 % del total de compuestos potencialmente absorbibles, es realizada en el colon donde la actividad enzimática propia de la microbiota colónica favorece en la liberación y biotransformación de estos compuestos, para así se absorbidos por el colon y generar diversos beneficios a la salud (Acosta-Estrada *et al.*, 2014).

VII.2 . Caracterización del extracto fermentado de la fracción no digerible de la botana (EFFND)

Por medio de una digestión gastrointestinal *in vitro* de la botana 70:30, cosecha 2015, se obtuvo el extracto fermentado de la fracción no digerible de la botana (EFFND), el cual fue caracterizado químicamente a fin de establecer los compuestos químicos que pudieran modular efectos antiinflamatorios derivados del mismo. Por tanto, se cuantificaron los metabolitos presentes en el EFFND, entre ellos los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), por medio de cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS) con microextracción en fase sólida (SPME).

VII.2.1 Identificación de metabolitos presentes en el EFFND

La caracterización del extracto por medio de cromatografía de gases acoplada a masas se presenta en el Cuadro 8 (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2018):

Cuadro 8. Perfil de metabolitos del extracto fermentado de la fracción no digerible del totopo, cuantificado por cromatografía de gases acoplado a masas

| Compuesto químico | RT (min) | 0 horas | | | 6 horas | | | 12 horas | | | 24 horas | | |
|-----------------------------|----------|---------|---------------------------------------|-------------|---------|---------------------------------------|-------------|----------|---------------------------------------|-------------|----------|---------------------------------------|-------------|
| | | % Área | Área ¹ (x10 ⁵) | Calidad (%) | % Área | Área ¹ (x10 ⁵) | Calidad (%) | % Área | Área ¹ (x10 ⁵) | Calidad (%) | % Área | Área ¹ (x10 ⁵) | Calidad (%) |
| Trimetilamina | 5.875 | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.47 | 245.43 ± 0.01 ^b | 78 | 1.58 | 1070.14 ± 0.71 ^a | 90 |
| Cloruro de Metileno | 8.035 | ND | ND | - | ND | ND | - | ND | ND | - | 7.32 | 3489.16 ± 249.61 | 96 |
| Acetato de etilo | 8.353 | 0.72 | 319.11 ± 9.43 ^b | 86 | ND | ND | - | 1.56 | 745.97 ± 0.42 ^a | 90 | 0.69 | 214.89 ± 1.59 ^c | 90 |
| Heptano | 9.274 | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.12 | 82.81 ± 0.01 ^a | 70 | 0.27 | 20.73 ± 0.01 ^b | 91 |
| Etil propano | 10.793 | ND | ND | - | 0.42 | 91.15 ± 3.98 ^a | 86 | 0.38 | 28.68 ± 4.27 ^b | 90 | ND | ND | - |
| n-propilacetato | 10.908 | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.28 | 144.03 ± 5.01 ^a | 72 | 0.21 | 125.48 ± 0.01 ^b | 72 |
| Hexametil-Ciclotrisiloxán | 13.431 | 6.82 | 1346.51 ± 191.39 ^b | 91 | 3.55 | 200.73 ± 64.34 ^a | 91 | ND | ND | - | 1.60 | 251.95 ± 12.48 ^a | 91 |
| Etil-butilato | 13.925 | ND | ND | - | 0.92 | 1194.03 ± 64.16 ^a | 95 | 3.55 | 1137.68 ± 37.05 ^a | 94 | ND | ND | - |
| Hexanal | 14.361 | 1.23 | 84.81 ± 9.58 | 95 | ND | ND | - | ND | ND | - | ND | ND | - |
| 2,4-Dimetil-1-hepteno | 14.469 | 0.88 | 139.15 ± 23.21 ^b | 93 | 0.22 | 10.22 ± 0.91 ^c | 72 | 0.33 | 213.83 ± 0.23 ^a | 93 | 0.20 | 119.91 ± 0.50 ^b | 72 |
| Butil acetato | 14.591 | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.20 | 120.15 ± 23.94 | 78 | ND | ND | - |
| Propil butanoato | 17.388 | ND | ND | - | 0.87 | 347.89 ± 19.97 ^a | 90 | 1.27 | 361.45 ± 0.71 ^a | 90 | ND | ND | - |
| Etil pentanoato | 17.535 | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.78 | 313.55 ± 0.62 ^b | 94 | 1.28 | 400.70 ± 7.07 ^a | 95 |
| Octametil-cyclotetrasiloxán | 19.341 | 4.23 | 722.01 ± 38.32 | 91 | ND | ND | - | ND | ND | - | 1.21 | 201.99 ± 0.06 | 91 |
| 1-Hexanol | 19.742 | ND | ND | - | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.24 | 154.68 ± 6.33 | 78 |
| Butil butanoato | 20.932 | ND | ND | - | 0.24 | 24.29 ± 0.71 | 72 | ND | ND | - | ND | ND | - |
| Heptanal | 21.961 | 1.89 | 82.52 ± 7.96 ^a | 97 | 0.42 | 9.25 ± 0.04 ^a | 95 | ND | ND | - | ND | ND | - |

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|--------|------|-----------------------------|----|------|-----------------------------|----|------|-----------------------------|----|-------|------------------------------|----|
| Ácido 2-metilpropanoico | 22.929 | ND | ND | - | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.18 | 104.71 ± 3.98 | 86 |
| 3-etil-2,5-dimetilpirazina | 24.914 | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.17 | 120.39 ± 0.73 ^b | 93 | 0.13 | 355.32 ± 0.15 ^a | 90 |
| Nonanal | 25.131 | ND | ND | - | 1.60 | 510.47 ± 55.38 ^a | 91 | 0.53 | 122.62 ± 0.18 ^b | 91 | 0.62 | 256.08 ± 8.02 ^b | 91 |
| Benzeno acetaldehído | 26.552 | 0.53 | 86.65 ± 9.41 | 91 | ND | ND | - | ND | ND | - | ND | ND | - |
| Acetofenona | 27.093 | 0.31 | 55.37 ± 0.13 ^c | 87 | 0.24 | 121.01 ± 1.41 ^b | 81 | 0.28 | 46.89 ± 6.01 ^c | 90 | 0.48 | 325.16 ± 0.23 ^a | 97 |
| 2-metil-benzaldehído | 27.369 | ND | ND | - | ND | ND | - | 1.31 | 53.16 ± 0.55 ^b | 81 | 0.29 | 173.08 ± 0.11 ^a | 97 |
| Decanal | 28.188 | ND | ND | - | 0.25 | 35.52 ± 6.44 | 91 | ND | ND | - | 0.20 | 118.79 ± 0.03 | 91 |
| Ácido 4-metil-pentanoico | 28.474 | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.91 | 360.55 ± 0.71 ^a | 90 | 0.65 | 278.51 ± 0.58 ^b | 53 |
| 2,6-dimetil-Nonano | 28.709 | 0.35 | 60.68 ± 2.02 ^b | 80 | ND | ND | - | 0.19 | 137.01 ± 0.01 ^a | 80 | ND | ND | - |
| 1,3-bis (1,1-dimetiletil)-benzeno | 28.917 | ND | ND | - | ND | ND | - | 2.74 | 29.93 ± 1.40 | 95 | ND | ND | - |
| Ácido Hexanoico | 29.413 | ND | ND | - | 1.92 | 547.81 ± 1.39 ^a | 90 | 0.43 | 305.13 ± 0.04 ^b | 90 | 0.71 | 254.84 ± 2.12 ^c | 90 |
| Metil salicilato | 30.613 | 6.80 | 622.75 ± 23.73 ^a | 97 | ND | ND | - | 1.27 | 330.35 ± 0.67 ^b | 97 | 0.98 | 332.11 ± 22.72 ^b | 97 |
| Ácido Heptanoic | 31.83 | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.27 | 192.31 ± 0.01 | 94 | ND | ND | - |
| Ácido 2-etilhexanoico | 32.054 | ND | ND | - | 1.49 | 271.72 ± 0.67 ^a | 95 | ND | ND | - | 0.39 | 231.16 ± 0.03 ^a | 86 |
| Cariofileno | 33.851 | ND | ND | - | 0.37 | 123.25 ± 0.75 ^b | 99 | ND | ND | - | 0.72 | 486.50 ± 3.68 ^a | 99 |
| Etil dihidrocinamato | 33.925 | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.49 | 356.11 ± 11.23 | 96 | ND | ND | - |
| 4-metilfenol | 34.034 | ND | ND | - | 3.05 | 870.53 ± 10.79 ^a | 95 | 3.86 | 490.07 ± 58.01 ^c | 97 | 13.77 | 5094.72 ± 26.71 ^a | 97 |
| Ácido Octanoic | 34.143 | ND | ND | - | 3.08 | 8.73 ± 2.27 ^b | 91 | ND | ND | - | 1.06 | 634.66 ± 0.01 ^a | 96 |
| α-Cariofileno | 34.883 | ND | ND | - | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.21 | 136.99 ± 4.20 | 94 |
| Ácido nonanoico | 36.374 | ND | ND | - | ND | ND | - | 1.45 | 723.47 ± 15.12 ^b | 90 | 2.74 | 1360.99 ± 0.60 ^a | 87 |
| Hidroxitolueno Butilado | 36.529 | ND | ND | - | 0.24 | 123.14 ± 0.49 ^a | 47 | ND | ND | - | 0.54 | 172.28 ± 0.43 ^b | 98 |
| Decametil-ciclopentasiloxano | 36.71 | 2.54 | 306.62 ± 17.25 ^a | 94 | ND | ND | - | 0.82 | 89.58 ± 19.42 ^b | 91 | 1.31 | 343.71 ± 58.74 ^a | |

| | | | | | | | | | | | | | |
|--|--------|------|-----------------------------|----|------|------------------------------|----|----------------------------|---------------------------------|----|-------|-----------------------------|----|
| Ácido 2,2,4-trimetil-3-carboxiisopropilpentanoico isobutil ester | 37.848 | ND | ND | - | 1.11 | 558.17 ± 85.07 ^a | 74 | 1.33 | 694.18 ± 0.06 ^a | 43 | ND | ND | - |
| Lilial | 38.089 | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.84 | 260.85 ± 1.60 ^a | 97 | 0.34 | 205.31 ± 0.05 ^a | 95 |
| Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetil)etil) | 40.196 | ND | ND | - | ND | ND | - | ND | ND | - | 2.64 | 306.74 ± 28.57 | 97 |
| Octadecametil-ciclononasiloxano | 40.443 | 0.49 | 143.80 ± 28.60 ^a | 91 | 0.18 | 99.20 ± 8.36 ^a | 91 | ND | ND | - | 0.17 | 99.22 ± 0.03 ^a | 91 |
| Indol | 40.685 | ND | ND | - | ND | ND | - | 24.32 | 18563.99 ± 1828.23 ^a | 94 | 16.23 | 3640.20 ± 0.10 ^b | 94 |
| 1,4,7,10,13,16-Hexaoxaciclooctadecano | 41.363 | ND | ND | - | 0.7 | 87.96 ± 0.79 ^c | 86 | 252.70 ± 0.07 ^a | 0.49 | 35 | 0.52 | 148.85 ± 3.37 ^b | 64 |
| 3-metil-1H-indol | 41.486 | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.84 | 505.01 ± 1.63 ^b | 93 | 2.16 | 1125.55 ± 0.68 ^a | 95 |
| Etil tetradecanoato | 41.863 | ND | ND | - | 1.44 | 203.16 ± 5.62 ^b | 95 | 1.64 | 123.70 ± 13.90 ^c | 97 | 0.53 | 355.32 ± 0.15 ^a | 90 |
| 9,10-dihidro-9-anthracenamina | 42.171 | ND | ND | - | ND | ND | - | ND | ND | - | 1.13 | 719.30 ± 65.67 | 53 |
| 3-hidroxi-4-metoxi-benzaldehído. | 42.316 | ND | ND | - | ND | ND | - | 1.31 | 50.77 ± 0.55 ^b | 81 | 1.15 | 681.90 ± 1.30 ^a | 95 |
| DL-Gliceraldehído, dimetil éter | 43.401 | ND | ND | - | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.62 | 270.92 ± 0.86 | 53 |
| Isobutil nonil ftalato | 45.157 | ND | ND | - | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.80 | 6.31 ± 0.70 | 86 |
| Etil palmitato | 45.306 | ND | ND | - | 0.53 | 6.73 ± 0.08 ^b | 68 | 0.49 | 349.02 ± 0.81 ^a | 98 | ND | ND | - |
| 1,3,4-Trimetoxi butan-2-ol | 45.524 | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.55 | 283.51 ± 0.72 ^a | 45 | 0.42 | 278.61 ± 3.36 ^a | 64 |
| Butil-isobutil-ftalato | 47.784 | 3.15 | 546.43 ± 18.57 ^a | 95 | 1.43 | 620.15 ± 166.94 ^a | 94 | 0.93 | 662.88 ± 0.71 ^a | 95 | 1.01 | 384.90 ± 1.89 ^a | 95 |
| Etil Oleato | 49.011 | ND | ND | - | ND | ND | - | 0.69 | 139.15 ± 16.50 ^a | 99 | 0.24 | 140.37 ± 0.08 ^a | 94 |
| Tetradecametil-cicloheptasiloxano | 55.467 | 1.32 | 225.52 ± 12.17 ^a | 99 | 0.46 | 150.67 ± 8.38 ^a | 93 | ND | ND | - | ND | ND | - |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|--------|------|-----------------------|----|----|----|---|----|----|---|----|----|---|
| α -farneseno | 58.425 | 2.27 | 414.45 \pm 16.76 | 97 | ND | ND | - | ND | ND | - | ND | ND | - |
|---------------------|--------|------|-----------------------|----|----|----|---|----|----|---|----|----|---|

ND: No detectado; **RT:** Tiempo de retención; **A:** Área. Los valores de las áreas están expresados como el promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes expresan diferencias significativas ($p < 0.05$) por la Prueba de Tukey-Kramer para la variación del área, por compuesto químico, durante los tiempos de fermentación (0, 6, 12 y 24 horas). ¹ Expresado como el promedio \pm desviación estándar, área de mA. La calidad indica la probabilidad de que el compuesto coincide con la Biblioteca de Espectros de Masas de NIST/EPA/NIH.

Dirección General de Bibliotecas VAQ

En el Cuadro 8 se muestra el perfil de metabolitos del extracto fermentado de la fracción no digerible de la botana durante tres diferentes tiempos de fermentación colónica a fin de justificar el extracto que sería posteriormente utilizado para su evaluación en el modelo *in vitro* de inflamación. Se muestra que el tiempo de 24 horas presentó la mayor cantidad de compuestos con diferentes rangos de calidad (64-99 %), siendo esto un reflejo del amplio número de moléculas señalizadoras que pueden presentarse durante el tracto gastrointestinal (Bansal *et al.*, 2010). El compuesto más abundante fue el Indol (24.32 % del total del área), seguido por el 4-metilfenol (3.86 %), cloruro de metileno (7.32 %), ácido nonanoico (2.74 %) y el 3-metil-1H-indol (2.16 %).

El Indol es un metabolito fecal humano común producido a partir del L-triptófano que actúa como inductor bacteriano y señalizador entre las células epiteliales intestinales, ayudando a modular la expresión de genes proinflamatorios, incrementa la expresión de genes antiinflamatorios, disminuye la colonización por parte de patógenos del epitelio intestinal colónico y mejora las propiedades de barrera celulares al ayudar en la resistencia de las uniones estrechas epiteliales (Bansal *et al.*, 2010; Blachier *et al.*, 2017). Por otra parte, el 4-metilfenol es un compuesto bacteriano y también un metabolito fecal común que tiene propiedades neuroactivas, pudiendo entrar a la circulación sistémica al alterarse la integridad de la pared epitelial, por lo que puede inducir una respuesta inmune (Evrensel & Ceylan, 2015). Finalmente, el 3-metil-1H-indol es un compuesto derivado del benceno de ya ha sido reportado en muestras fecales sometidas a procesos de fermentación colónica *in vitro* (De Preter *et al.*, 2010). Es importante destacar la presencia del ácido octanoico o ácido caprílico en las muestras de 24 horas puesto que es un ácido de cadena media que a menudo se suministra a pacientes con la enfermedad de Crohn o con patologías inflamatorias intestinales ya que en modelos con células Caco-2 ha demostrado ser un efectivo supresor de la secreción de IL-8, una citocina clave en la señalización de la vía pro inflamatoria de NF- κ B (Hoshimoto *et al.*, 2002). La presencia de estos compuestos indica que la botana está modulando, al menos en cuanto a la producción de metabolitos, la generación

de compuestos que podrían estar asociados con la reducción de la inflamación a nivel intestinal.

Debido a que los ácidos grasos de cadena corta han sido asociados a través de diversos estudios *in vitro* e *in vivo* con la modulación del proceso inflamatorio, además de diferentes vías metabólicas cruciales para el desarrollo de las células epiteliales colónicas, se cuantificó el contenido de ácidos grasos (Cuadro 9) en el EFFND (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2018).

Cuadro 9. Contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), relación molar e índice de fermentabilidad del EFFND durante los diferentes tiempos de fermentación colónica.

| Tiempo de fermentación | AGCC | EFFND ¹ | | Control ² | | IF (%) |
|------------------------|-------|----------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|--------|
| | | Cantidad | Relación molar (%) | Cantidad | Relación molar (%) | |
| 0 | AA | ND | - | - | - | - |
| | AP | ND | - | - | - | |
| | AB | ND | - | - | - | |
| | Total | ND | - | - | - | |
| 6 | AA | 0.082 ± 0.003 ^c | 46.62 | 0.131 ± 0.024 ^c | 44.44 | 57.14 |
| | AP | 0.027 ± 0.010 ^b | 18.45 | 0.092 ± 0.021 ^c | 30.77 | |
| | AB | 0.047 ± 0.002 ^a | 34.93 | 0.050 ± 0.005 ^a | 24.79 | |
| | Total | 0.156 ± 0.015 ^b | 100 | 0.273 ± 0.050 ^c | 100 | |
| 12 | AA | 0.087 ± 0.005 ^b | 49.94 | 0.174 ± 0.014 ^b | 41.07 | 41.31 |
| | AP | 0.025 ± 0.001 ^b | 16.72 | 0.145 ± 0.001 ^b | 40.48 | |
| | AB | 0.045 ± 0.001 ^a | 33.34 | 0.061 ± 0.004 ^a | 18.45 | |
| | Total | 0.157 ± 0.007 ^b | 100 | 0.380 ± 0.019 ^b | 100 | |
| 24 | AA | 0.105 ± 0.002 ^a | 42.42 | 0.564 ± 0.046 ^a | 46.96 | 20.18 |
| | PA | 0.067 ± 0.001 ^a | 31.31 | 0.457 ± 0.094 ^a | 44.65 | |
| | BA | 0.050 ± 0.008 ^a | 26.27 | 0.079 ± 0.015 ^a | 8.39 | |
| | Total | 0.222 ± 0.011 ^a | 100 | 1.100 ± 0.155 ^a | 100 | |

AA: Ácido acético; **AP:** Ácido propiónico; **AB:** Ácido butírico; **EFFND:** Extracto fermentado de la fracción no digerible. Los valores de cantidad están expresados como mmol/L AGCC. Todos los

valores corresponden al promedio \pm desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cada tipo de ácido graso, a través de los diferentes tiempos de fermentación por la Prueba de Tukey-Kramer. ¹ Producción de AGCC por 1 mL de sustrato (500 μ g de sólido y 500 μ L de líquido). ² Producción de AGCC por 100 mg de sustrato (rafinosa).

Los resultados del Cuadro 9 revelan que el EFFND de 24 horas presentó la mayor cantidad de AGCC, por lo que este extracto es el que podría potencialmente presentar mayores efectos antiinflamatorios. Fisiológicamente hablando, se ha demostrado que estos tres tipos de ácidos grasos son los principales productos finales (> 90 %) de los procesos de fermentación microbiana que suceden en el intestino grueso (Ríos-Covián *et al.*, 2016), por lo que las diferencias que pudieran haber en su producción se asocian generalmente a los diferentes sustratos factibles de ser fermentados en el intestino, como por ejemplo el almidón resistente y polisacáridos que estén en las paredes celulares de las células vegetales (Macfarlane *et al.* 2008).

Los bajos niveles de microbiota que produce ácido butírico y ácido propiónico se han asociado con enfermedades en los que se involucran los procesos inflamatorios. Por ejemplo, en colitis ulcerosa (CU), los niveles de microorganismos productores de ácido butírico son bajos y se han encontrado bajos niveles de microorganismos productores de ácido propiónico en niños con riesgo de asma (Ríos-Covián *et al.*, 2016). La producción de ácido butírico se ha asociado con diferentes propiedades fisiológicas; por ejemplo, en modelos *in vivo*, este ácido es un modulador de la inflamación de la mucosa en carcinogénesis colorrectal, y está involucrado con la regulación de la expresión de genes del ciclo celular y apoptosis en colonocitos (Blachier *et al.*, 2017).

En comparación con el control, los menores niveles de ácidos grasos de cadena corta que contiene el EFFND podrían ser un indicador de que las estructuras de polisacáridos de la materia prima son más difíciles de romper (Campos-Vega *et al.*, 2009; Zamora-Gasga *et al.*, 2015). Asimismo, las razones molares expresan que el ácido acético es la mayor proporción de los ácidos grasos producidos, lo que

coincide con otros perfiles fermentativos de matrices alimentarias como polisacáridos de frijol común o fructanos de agave (Campos-Vega *et al.*, 2009; Zamora-Gasga *et al.*, 2015). El índice de fermentabilidad presentó su mayor nivel a las 24 horas de fermentación, un valor que puede variar de acuerdo con el contenido de polisacáridos de la muestra y la afinidad de la microbiota colónica por el sustrato (Zamora-Gasga *et al.*, 2015).

La asociación metabólica de estos Compuestos utilizando el software online MetaboAnalyst se muestra en la Figura 11.

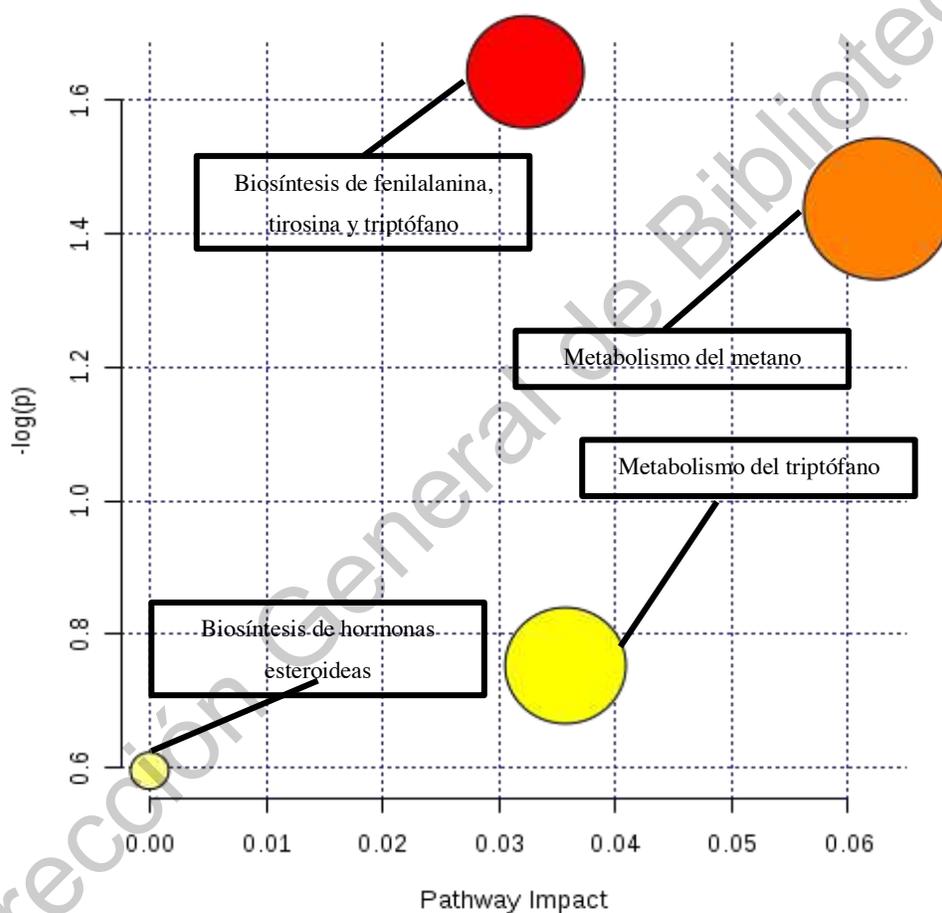


Figura 11. Principales rutas metabólicas asociadas a los Compuestos obtenidos por el análisis de cromatografía de gases del extracto fermentado de la fracción no diferible de la botana (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2018).

Los resultados expresados por el gráfico anterior asocian un nivel de probabilidad de coincidencia entre los metabolitos detectados por el cromatógrafo de gases con vías metabólicas reportadas en bases de datos de internet. La mayor coincidencia fue con la ruta de biosíntesis del metano, seguida de la ruta de fenilalanina-tirosina-triptófano, el metabolismo del triptófano y la biosíntesis de hormonas esteroideas. La relevancia de esto es que está indicando que los metabolitos podrían modular estas rutas metabólicas que a menudo tienen que ver con la producción de hidrógeno, considerado uno de los aspectos negativos de los procesos fermentativos, ya que un exceso en su producción puede generar daños en las células al perjudicar la regeneración del NAD e inhibiendo la respiración, afectando no sólo a la mucosa colónica sino también suprimiendo el tamaño de la población microbiana, alterando su capacidad de alimentación y regeneración (Greer & O'Keefe, 2011). A pesar de ello, la microbiota colónica ha evolucionado hasta poblaciones específicas como *Methanobrevibacter smithii* que se especializa en el consumo de hidrógeno para producir metano como producto final no citotóxico, incrementando de forma importante la capacidad de producir AGCC a partir de carbohidratos completos (Greer & O'Keefe, 2011).

VII.3 Efecto del EFFND en la modulación de factores de inflamación en un monocultivo de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS

Los resultados de la caracterización química del EFFND demostraron la presencia de diferentes metabolitos que podrían tener un potencial antiinflamatorio. Por ese motivo, se evaluó el efecto del EFFND de 24 horas en un monocultivo de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS sobre diferentes parámetros de inflamación: producción de óxido nítrico (NO), producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y modulación de proteínas del proceso inflamatorio.

VII.3.1 Efecto del EFFND sobre la viabilidad celular y la producción de óxido nítrico (NO) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en un monocultivo de macrófagos RAW 264.7.

La Figura 12 muestra el efecto del extracto EFFND sobre viabilidad celular y la inhibición de la producción de óxido nítrico y peróxido de hidrógeno.

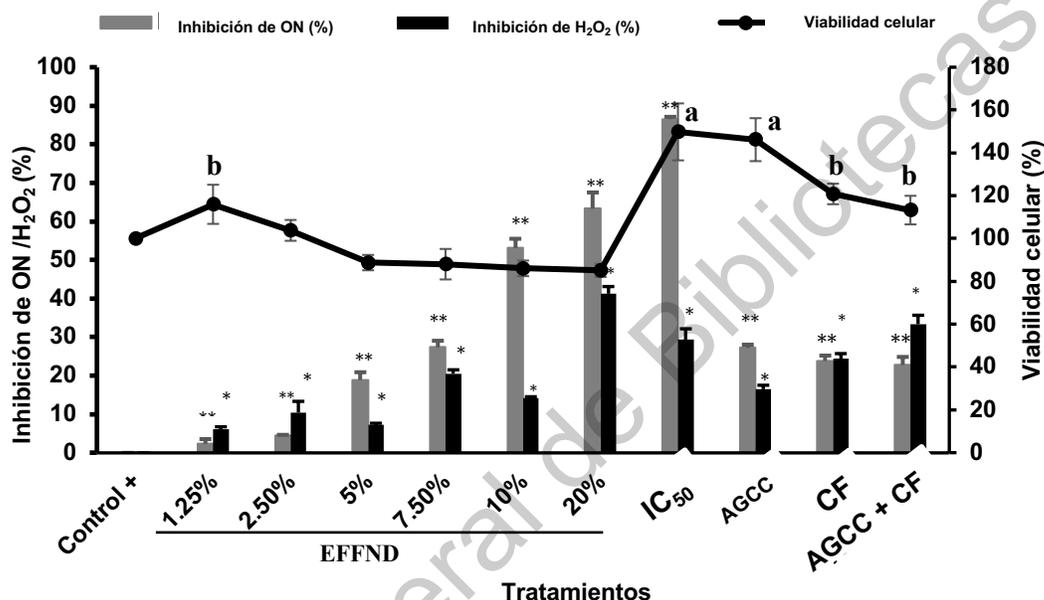


Figura 12. Efecto del Extracto Fermentado de la Fracción No Digerible (EFFND) de la botana sobre la inhibición de la producción de óxido nítrico (ON), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y viabilidad celular (%). IC₅₀: Concentración inhibitoria media; AGCC: Ácidos grasos de cadena corta; CF: Compuestos fenólicos. Los resultados han sido expresados como la media ± DE. Los asteriscos representan diferencias respecto al control por la prueba de Dunnett ($p < 0.05$). Letras diferentes expresan diferencias estadísticamente significativas por la Prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.05$)

Los resultados indican que ninguno de los tratamientos fue citotóxico, mostrando viabilidades superiores al 80 % (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2018). Por medio de la reacción de Griess se cuantificó la capacidad del EFFND de inhibir su producción, así como la concentración media inhibitoria (IC₅₀), que fue del 12.61 % y fue

equivalente a 0.013 mmol/L de ácido acético, 0.008 mmol/L de ácido propiónico, 0.006 mmol/L de ácido butírico; y 6.61 $\mu\text{g/g}$ de ácido gálico y 0.46 $\mu\text{g/g}$ de (+)-catequina. Considerando esos valores, los compuestos fueron ensayados independientemente a fin de poder atribuir a estos compuestos (o la suma de ellos) el efecto observado, encontrándose que aún en conjunto sólo logran explicar hasta el 27.2 % del efecto de inhibición de producción de óxido nítrico, por lo que podrían existir otros metabolitos que estarían influyendo en la inhibición de estos marcadores de inflamación (óxido nítrico y peróxido de hidrógeno), presentes en el EFFND (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2018).

Roh *et al.* (2016) reportaron porcentajes de inhibición de óxido nítrico del orden del 56% en extractos etanólicos de cáscara de maíz (*Zea mays* L.), atribuyendo su efecto al conjunto de compuestos fenólicos totales y flavonoides. Asimismo, el frijol común contiene saponinas (Chávez-Santoscoy *et al.*, 2013), que han sido vinculadas a efectos de inhibición de óxido nítrico en macrófagos (Moses *et al.*, 2014), compuestos que alternativamente podrían contribuir a la explicación del 70 % del efecto restante que no es atribuible a los ácidos grasos de cadena corta en el monocultivo de macrófagos.

Se ha reportado que tanto el óxido nítrico como el peróxido de hidrógeno son especies reactivas de oxígeno cuya producción es importante en los mamíferos debido a su relación con el daño oxidativo en muchas patologías. Dentro de la mitocondria, el anión superóxido es producido por la reducción de un electrón de oxígeno molecular y no todo es necesariamente convertido en peróxido de hidrógeno, teniendo en cuenta que podría reaccionar con otros aceptores o con peróxidonitrito (NO^-) (Murphy, 2009). Varios reportes han asociado a los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y los compuestos fenólicos de productos alimenticios como promotores de la reducción de inflamación y de la salud del tracto gastrointestinal (López-Barrera *et al.*, 2016).

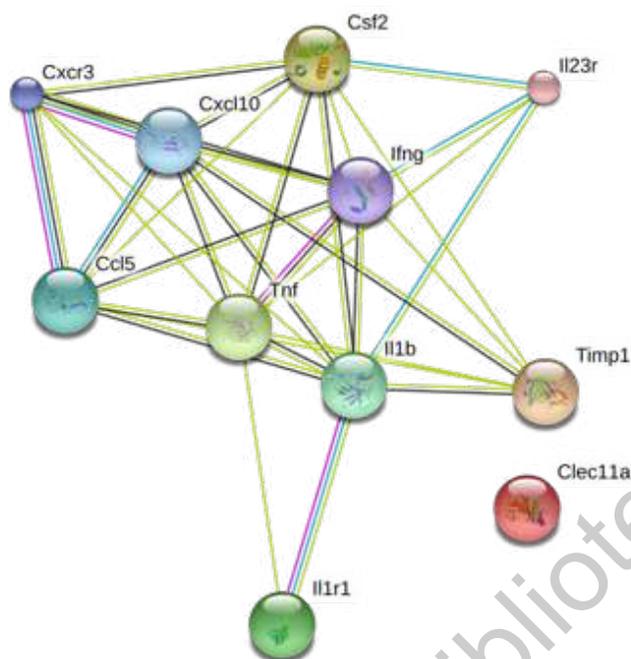
VII.3.2 Efecto del EFFND sobre el nivel de producción de proteínas del proceso inflamatorio

La Figura 13 A, B y C muestra las asociaciones funcionales predichas por las citocinas diferencialmente expresadas que estuvieron involucradas en el proceso inflamatorio mediado por el IC₅₀ del EFFND en macrófagos estimulados con LPS (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2018).

A)

| Citocina | Veces de cambio (<i>Fold change</i>) |
|--------------------------------|--|
| IL-1 β /IL-1F2 | 0.93 |
| IL-1ra/IL-1F3 | -0.24 |
| G-CSF | 0.23 |
| GM-CSF | 0.67 |
| Eotaxin /CCL11 | 1.49 |
| sICAM-1/CD54 | 0.13 |
| IFN-γ | 2.29 |
| IL-1 α /IL-1F1 | 0.21 |
| IL-23 | -0.24 |
| IL-27 | -0.52 |
| IL-6 | 0.28 |
| MIP-2/CXCL2 | 0.04 |
| IP-10/CXCL10/CRG-2 | 0.82 |
| RANTES/CCL5 | 3.42 |
| SDF-1/CXCL12 | 0.52 |
| I-TAC/CXCL11 | 10.54 |
| JE/CCL2/MCP-1 | -0.27 |
| MIP-1 α /CCL3 | -0.02 |
| MIP-1 β /CCL4 | 0.11 |
| TIMP-1 | 5.32 |
| TNF- α | -0.48 |
| TREM-1 | 39.19 |

B)



C)

| Proceso Biológico | | |
|--|---------------------|------------------------|
| Descripción de ruta metabólica | Conteo de proteínas | FDR |
| Respuesta a lipopolisacárido. | 7 | 4.27×10^{-8} |
| Respuesta celular a lipopolisacárido. | 6 | 4.27×10^{-8} |
| Regulación positiva de la proliferación celular. | 8 | 1.37×10^{-7} |
| Vía de señalización mediada por citocinas. | 6 | 2.57×10^{-7} |
| Respuesta a citocinas. | 7 | 4.01×10^{-7} |
| Regulación positiva de la producción de citocinas. | 6 | 1.49×10^{-6} |
| Respuesta immune. | 7 | 2.79×10^{-6} |
| Respuesta inflamatoria crónica. | 3 | 7.69×10^{-6} |
| Regulación positiva de Quimiotaxis. | 4 | 3.97×10^{-5} |
| Regulación negative del proceso apoptótico. | 6 | 6.86×10^{-5} |
| Inflamación crónica en respuesta del estímulo antigénico | 2 | 1.02×10^{-4} |
| Función Molecular | | |
| Actividad de citocina. | 7 | 1.36×10^{-10} |
| Enlace de receptor. | 9 | 6.07×10^{-8} |
| Enlace proteico. | 11 | 2.00×10^{-5} |
| Enlace citocina-receptor. | 3 | 1.63×10^{-3} |
| Enlace de proteasas. | 3 | 7.39×10^{-3} |

| Actividad de quimiocinas. | 2 | 3.12×10^{-2} |
|--|---|------------------------|
| Rutas KEGG | | |
| Interacción Citocina-Receptor | 9 | 2.66×10^{-14} |
| Artritis reumatoide. | 5 | 3.32×10^{-8} |
| Vía de señalización de TNF | 5 | 9.56×10^{-8} |
| Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) | 4 | 5.95×10^{-6} |
| Vía de señalización de receptor Toll | 4 | 3.93×10^{-6} |
| Diabetes mellitus tipo I. | 3 | 3.72×10^{-5} |
| Apoptosis | 3 | 1.00×10^{-4} |
| Vía de señalización de NF- κ B | 3 | 1.32×10^{-4} |
| Vía de receptor de células T. | 3 | 1.95×10^{-4} |

EFFND: Extracto fermentado de fracción no digerible de la botana; **FDR:** Tasa de Descubrimiento Falso (*False discovery rate*). Los datos de las citocinas fueron expresados como veces de cambio (*Fold change*) respecto a un control (células estimuladas con LPS y sin tratamiento) y corresponde a la media de dos experimentos independientes. Las líneas en la red de citocinas representan cuatro tipos de interacciones: línea roja (evidencia de fusión); línea azul (bases de datos); línea verde (vecindad) y línea negra (co-expresión).

Figura 13. Asociaciones funcionales y predichas de las citocinas diferencialmente expresadas, involucradas en el proceso inflamatorio mediado por el EFFND. A) Efecto del EFFND en la expresión de citocinas; B) Representación de red de citocinas; C) Análisis ontológico de proteínas y vías KEGG (Kyoto Encyclopedia of genes and genome) asociadas a las citocinas diferencialmente expresadas.

Un total de 22 de 40 citocinas fueron diferencialmente moduladas, donde quince fueron sobre reguladas y 7 fueron sub reguladas (más de 1 vez de cambio o 1-fold). IFN- γ , RANTES (CCL5), I-TAC (CXCL11), TIMP-1 y TREM-1 fueron regulados más de dos veces. IFN- γ es requerido para la eliminación o el control de patógenos intracelulares e induce a CXCL9, CXCL10 y CXCL 11, permitiendo el reclutamiento eficiente de células CXCR3⁺ a los sitios de inflamación o de la respuesta inflamatoria asociada a las células cooperadoras tipo 1 (T_H1) (Koch *et al.*, 2009). CXCL11 es considerado un factor angiostático, por lo que puede inhibir la actividad angiogénica de VEGF, un factor terapéutico importante en cáncer y enfermedades

asociadas (Wang *et al.*, 2009). TIMP-1 (metaloproteinasa de inhibidores de tejidos) es una proteína importante que inhibe a la metaloproteinasa de la matriz (MMP) y es clave en la patogénesis de la enfermedad pulmonar crónica obstructiva (Mercer *et al.*, 2005)

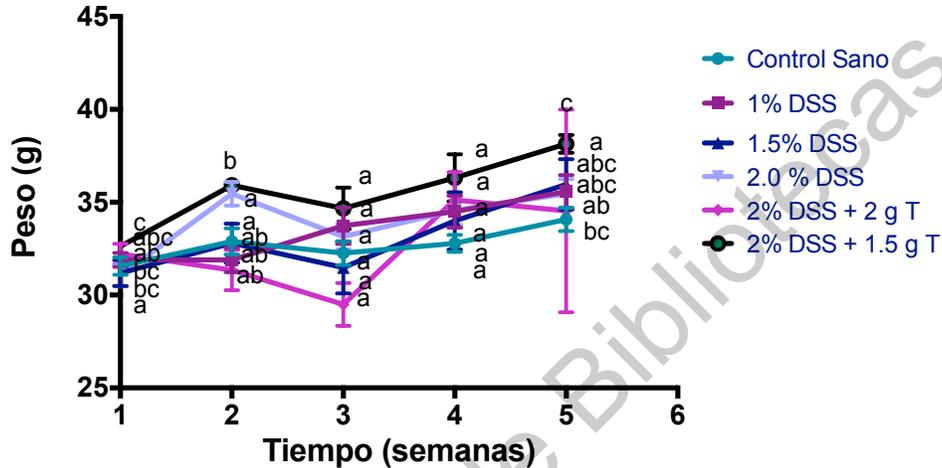
Estos resultados son consistentes con algunos reportes *in vitro* e *in vivo* que han mostrado la reducción del efecto de las enfermedades no transmisibles y respuestas inflamatorias a partir de productos hechos con maíz y frijol (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2018). Por ejemplo, Domínguez-Uscanga *et al.* (2017) reportaron que el consumo de la misma botana elaborada en este trabajo atenúa la ganancia de peso corporal, acumulación de grasa de adipocitos, tamaño de adipocitos y la enfermedad hepática no alcohólica en ratones de la cepa C57BL/6J por la inhibición de PPAR γ y SREBF2, ambas implicadas en la regulación de macrófagos y respuestas inflamatorias celulares endoteliales.

La Figura 13B muestra la relación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas, vinculadas a procesos biológicos, funciones moleculares y las vías metabólicas KEGG, provistas por el análisis del software STRING. Hasta 11 procesos biológicos fueron agrupados por el software, siendo notorios los procesos derivados de inflamación y vías KEGG típicas con un papel inflamatorio como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Las quimiocinas pueden atraer células inflamatorias a las lesiones de la EII y están involucradas en la activación de células del sistema inmune asociado a mucosas, produciendo por sí mismas más quimiocinas que tienen papeles fundamentales en los procesos inflamatorios (Singh *et al.*, 2016). Por tanto, puede concluirse que el incremento en la expresión de citocinas antiinflamatorias puede estar asociada con la inhibición general de marcadores y la disminución de enfermedades inflamatorias como las sugeridas por el análisis del software (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2018).

VII.4 . Caracterización del modelo *in vivo* de colitis crónica

VII.4.1 Parámetros morfológicos de la caracterización del modelo *in vivo* de colitis crónica.

La Figura 15 muestra la evolución semanal del peso de los ratones en la inducción del modelo de colitis crónica



Letras diferentes expresan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) por la Prueba de Tukey-Kramer.

Figura 14. Evolución semanal del peso de los ratones para los diferentes grupos experimentales evaluados en la inducción del modelo de colitis crónica. Los resultados fueron expresados como la media \pm EE.

Los resultados indican que, al finalizar el tratamiento de inducción de la enfermedad, el grupo con 1.5% DSS mostró la mayor ganancia de peso, mientras que los grupos con 1% y 2% de DSS no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control. De los grupos suplementados con botana, el grupo con 1.5 g no muestra diferencias con el control sano, mientras que el grupo con 2 g es similar en comportamiento al de 1.5 % DSS. Asimismo, se observa que en las semanas en las que hubo administración de DSS a los animales (semanas 2 y 4), se evidenció una consecuente pérdida de peso en la semana siguiente como consecuencia de la inducción de inflamación intestinal. El control sano mostró una curva de crecimiento típica para la cepa CD1/ICR, en la que de la semana 6 hasta la 11 alcanzan un peso que varía entre los 32.8 y 40.6 g, aproximadamente

(ENVIGO, 2017). La siguiente gráfica (Figura 16) muestra la evolución semanal del peso reportada para esta cepa:

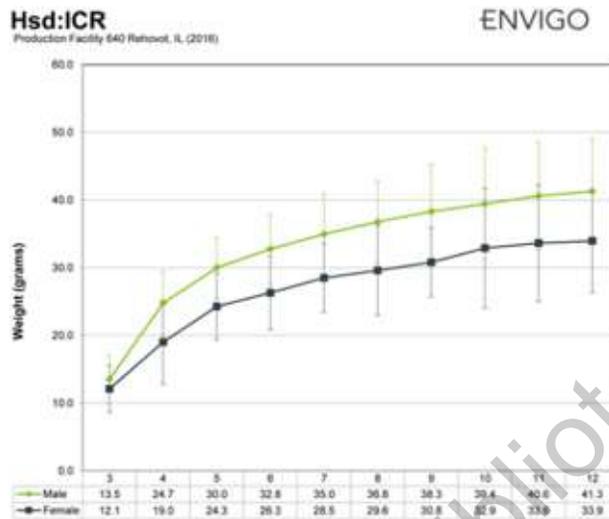


Figura 15. Evolución semanal del peso de ratones machos y hembras de la cepa ICR (CD-1) (ENVIGO, 2017).

En modelos de colitis crónica inducida con DSS se han reportado pérdidas de peso cercanas al 20 – 30 % del peso corporal como consecuencia del sangrado y la diarrea producida por el DSS, al ser un colitogénico que destruye el epitelio intestinal y tener efectos anticoagulantes (Chassaing *et al.*, 2014). Debido a la alta variabilidad en el peso molecular del DSS por los diferentes fabricantes, se sugiere inicialmente adquirir una dosis grande del reactivo (500 g) e ir ensayando dosis desde 1.5 % y 3 % en ratones BL6 o del 2.5 % hasta 5 % en ratones Balb/c (se sugiere de 8 semanas de edad, evitando mezclar animales de hasta 4 semanas de edad de diferencia, machos o hembras) e ir monitoreando la colitis a medida que avanza la enfermedad en parámetros como peso corporal y biomarcadores de inflamación intestinal en heces (Chassaing *et al.*, 2014), parámetros que fueron seguidos y considerados al momento de elegir las dosis de DSS.

La Figura 16 muestra el Índice de Actividad de la Enfermedad (DAI) de los animales en la inducción del modelo de colitis crónica con DSS (Luzardo-Ocampo *et al.*,

2020). Para la medición del IAE se utilizó la metodología propuesta por Ghia *et al.* (2006) en la que se consideran dos parámetros: la pérdida de peso y el sangrado del animal. Considerando esto, la escala propuesta por los autores se muestra en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Puntajes asignados para el cálculo del Índice de Actividad de la Enfermedad (DAI).

| Pérdida de Peso | Puntaje Asignado | Deposiciones | Puntaje Asignado | Sangrado | Puntaje Asignado |
|-----------------|------------------|--------------|------------------|------------|------------------|
| Sin pérdida | 0 | Normales | 0 | Sin sangre | 0 |
| 5 % – 10 % | 1 | Suaves | 1 | Presencia | 2 |
| 10 % - 15 % | 2 | Diarrea | 4 | Abundante | 4 |
| 15 % - 20 % | 3 | | | | |
| 20 % | 4 | | | | |

(Ghia *et al.*, 2006)

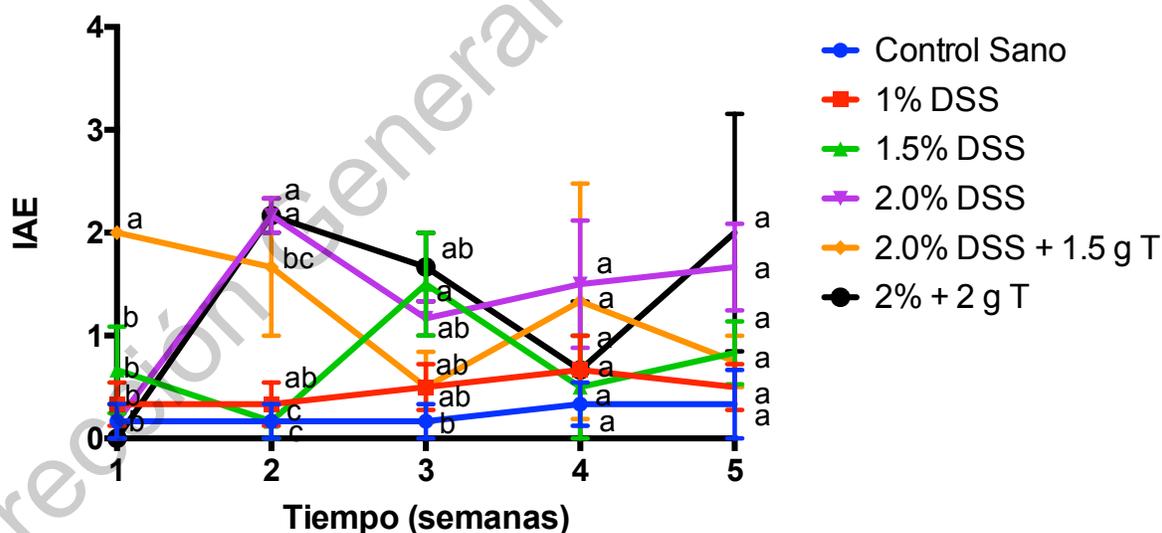


Figura 16. Evolución del Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE) de los ratones para los diferentes grupos evaluados en la inducción del modelo de colitis crónica.

T: Totopo (botana horneada 70:30). Los valores fueron expresados como la media \pm error estándar (EE). Letras distintas expresan diferencias significativas ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey-Kramer.

Los resultados para el Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE) muestran que al finalizar el tiempo de inducción de la enfermedad no existen diferencias estadísticamente significativas para los grupos ensayados. Esto es un indicador de que el modelo utilizado no se indujo adecuadamente puesto que no se evidencian, al menos en este parámetro, los signos de enfermedad. El grupo que presentó mayor evidencia de la enfermedad fue el grupo alimentado con 2 g de botana, en tanto que el grupo alimentado con 1.5 g de botana mostró al final del modelo menor IAE, siendo similar al control sano. Otros parámetros que se consideraron fueron el peso y longitud de colon, así como el peso de hígado y bazo, órganos involucrados en manifestar signos de la enfermedad de colitis.

Se ha encontrado que la colitis crónica es una enfermedad que puede ser reincidente, así como mostrar etapas de recuperación dependiendo del grado de recambio del epitelio intestinal, que puede ser de 2 a 5 días en seres humanos y mucho más rápido en ratones (Asano *et al.*, 2017). En ratones de la cepa Balb/c, utilizados en colitis, se ha evidenciado desaparición de los síntomas de colitis dentro de dos semanas tras la eliminación del DSS, con completa recuperación a las dos semanas, mientras que en ratones de la cepa C57BL/6 se ha mostrado continuidad de los efectos de colitis, incluso pasando a inflamación crónica tras la remoción de dosis altas de DSS (Chassaing *et al.*, 2014). Esto podría explicar por qué los animales pudieron mostrar pocos síntomas de colitis tras el sacrificio puesto que antes del mismo hacía 1 semana que había cesado la administración de DSS.

El Cuadro 11 indica las mediciones asociadas a órganos de los animales como peso de colon, hígado y bazo; y la medición de la longitud del colon para todos los grupos evaluados.

Cuadro 11. Peso de órganos (colon, hígado y bazo) y longitud de colon de los ratones para los diferentes grupos evaluados en la inducción del modelo de colitis crónica.

| Grupos | Longitud de colon (cm) | Peso de colon (g) | Peso de hígado (g) | Peso de bazo (g) |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control sano | 9.67 ^a ± 0.74 | 0.35 ^a ± 0.09 | 2.10 ^a ± 0.17 | 0.15 ^a ± 0.05 |
| 1% DSS | 9.43 ^a ± 2.19 | 0.32 ^a ± 0.11 | 2.06 ^a ± 0.12 | 0.11 ^a ± 0.04 |
| 1.5% DSS | 9.65 ^a ± 2.29 | 0.38 ^a ± 0.10 | 2.23 ^a ± 0.26 | 0.14 ^a ± 0.02 |
| 2.0% DSS | 9.62 ^a ± 2.29 | 0.47 ^a ± 0.08 | 2.08 ^a ± 0.20 | 0.12 ^a ± 0.02 |
| 2.0% DSS + 1.5 g T | 9.70 ^a ± 1.41 | 0.39 ^a ± 0.08 | 2.20 ^a ± 0.09 | 0.11 ^a ± 0.02 |
| 2.0% DSS + 2.0 g T | 9.10 ^a ± 1.93 | 0.46 ^a ± 0.15 | 2.46 ^a ± 0.13 | 0.17 ^a ± 0.01 |

Los resultados fueron expresados como la media ± DE. Letras diferentes expresan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) por la Prueba de Tukey-Kramer.

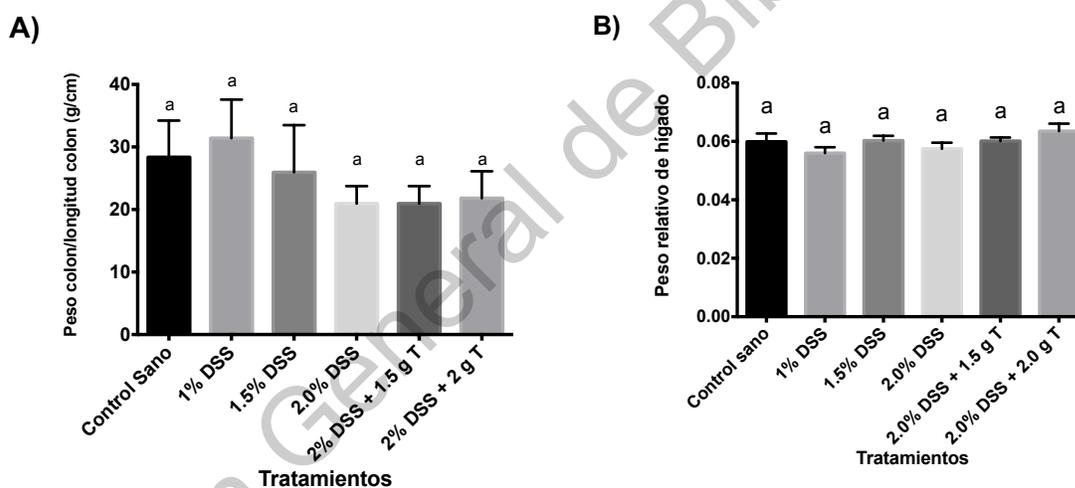


Figura 17. A) Relación de peso de colon/longitud de colon de los ratones para los diferentes grupos de implementación del modelo de colitis crónica; B) Peso relativo de hígado de los ratones para los diferentes grupos de implementación del modelo de colitis crónica. Los resultados fueron expresados como la media ± EE. Letras diferentes expresan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) por la Prueba de Tukey-Kramer.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para los diferentes tratamientos en cuanto al peso del hígado, ni en la relación peso/longitud de colon. Se ha reportado que el acortamiento del colon puede ser empleado como

un indicador visual que refleja la severidad de la inflamación colorrectal, como ha sido reportado para matrices alimenticias y vegetales (Chen *et al.*, 2016; Oficjalska *et al.*, 2015). Chassaing *et al.* (2014), para un protocolo y descripción del modelo de colitis crónica inducida por DSS en ratones describieron que el bazo de los animales sometidos al tratamiento de inducción química de colitis puede provocar incremento en el peso del bazo, al ser un órgano que responde activamente al proceso inflamatorio.

Las Figuras 18 y 19 muestran los gráficos representativos de cortes histológicos de tejidos de colon e hígado para cada uno de los grupos evaluados. Todas las imágenes corresponden al aumento 100x.

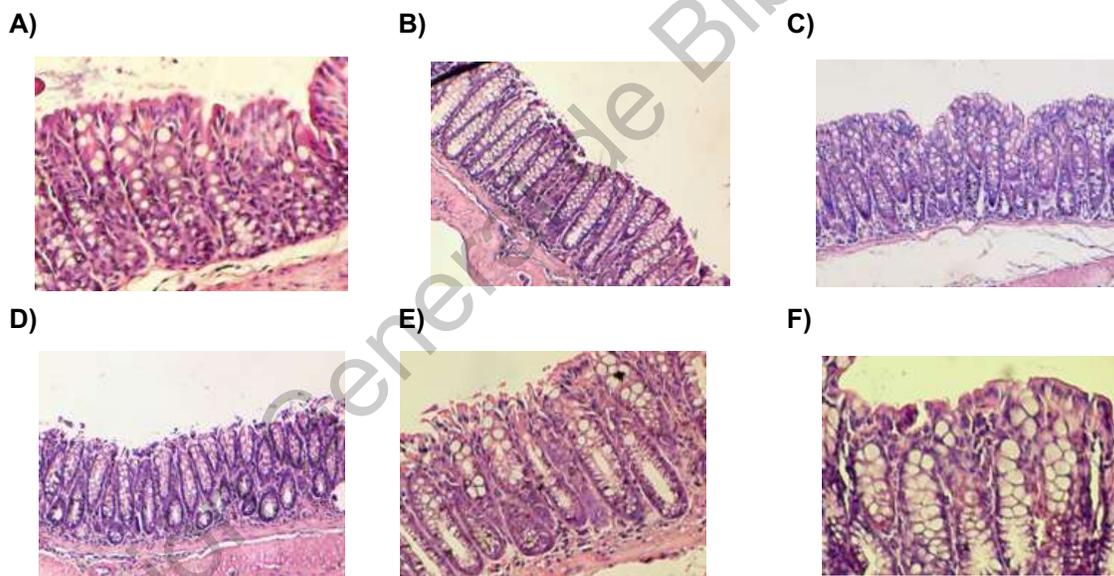


Figura 18. Cortes histológicos representativos de las secciones de colon de los ratones de la inducción del modelo de colitis crónica. A) Control sano; B) 1% DSS; C) 1.5% DSS; D) 2.0% DSS; E) 2.0% DSS + 1.5 g T.; F) 2.0% DSS + 2.0 g T. Los cortes fueron tomados con el aumento 100x y por tinción de Hematoxilina y Eosina.

A) B) C)

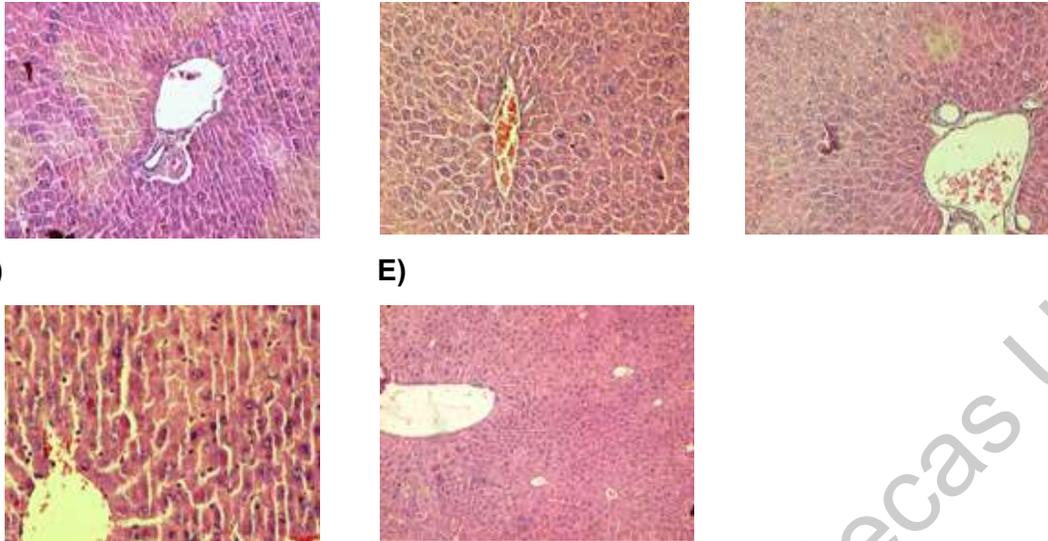


Figura 19. Cortes histológicos representativos de las secciones de hígado de los ratones de la inducción del modelo de colitis crónica. A) Control sano; B) 1% DSS; C) 1.5% DSS; D) 2.0% DSS; E) 2.0% DSS + 1.5 g T. Los cortes fueron tomados con el aumento 100x y por tinción de Hematoxilina y Eosina.

Las imágenes obtenidas en la Figura 18 indican que el modelo no fue correctamente inducido puesto que no se evidenció inducción de la enfermedad en el control inducido (18B) ni diferencias significativas respecto a algunos de los tratamientos (18C-E), sin causar hepatotoxicidad (Figura 19) al no mostrarse cambios morfológicos en los hepatocitos. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos como parte de los parámetros morfológicos, se encuentra que la dosis más alta de botana está ejerciendo efectos negativos en los animales puesto que dicho grupo presentó algunos de los menores pesos al finalizar el tratamiento, el mayor índice de actividad de la enfermedad (IAE), la menor longitud de colon y mayor peso de bazo. Teniendo en cuenta que esta es la dosis que contiene mayor cantidad de fibra (aproximadamente 11 % de fibra, de acuerdo a la caracterización de las dietas). Se ha sugerido que el contenido de compuestos fenólicos, sin bien los mismos están vinculados a efectos antioxidantes, también podrían generar un efecto pro-oxidante, sobre todo en el modelo de colitis con DSS en los que se ha reportado un marcado aumento general de los biomarcadores de estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2014). Por lo tanto, se requiere mayor investigación de los efectos del consumo de productos ricos en compuestos fenólicos y altos en

fibra, igualmente acarreadora de compuestos antioxidantes, y su modulación en la enfermedad inflamatoria intestinal.

Esta inducción del modelo implicó la realización de cambios importantes para el modelo de colitis crónica, las cuales consistieron en las siguientes:

- Se incrementó el tiempo del modelo hasta 6 semanas a fin de permitir que los efectos del DSS fueran más duraderos y permanentes en el tejido colónico.
- Se decidió hacer el sacrificio de los animales en una semana en la que consumieran DSS. Esto con el objetivo de evidenciar *in situ* el efecto de la enfermedad, sobre todo en un modelo en el que la presencia de síntomas de la enfermedad son oscilantes. Un sacrificio en una semana correspondiente a la recuperación de los animales consumiendo agua podría provocar que no se evidencien claramente los efectos de la enfermedad.
- Mantener la dosis del 2 % DSS como inductor químico de enfermedad y descartar la dosis más alta (2 g) puesto que se mostró que está causando efectos adversos en diferentes marcadores morfológicos de enfermedad.

VII.5 . Efecto del consumo de la botana horneada de maíz-frijol sobre un modelo *in vivo* de colitis crónica

VII.5.1 Efecto del consumo de la botana sobre parámetros morfológicos

Con las correcciones realizadas sobre el modelo, se midieron nuevamente los parámetros morfológicos sobre los diferentes grupos de animales (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

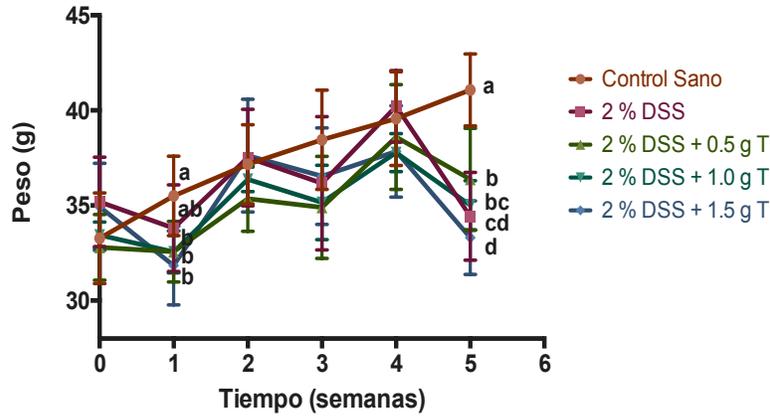


Figura 20. Evolución semanal del peso de los animales durante el modelo in vivo de colitis crónica. T: Totopo (botana horneada 70:30). Los valores fueron expresados como la media \pm error estándar (EE). Letras distintas expresan diferencias significativas ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey-Kramer.

Los resultados de la Figura 20 muestran que el control sano obtuvo la mayor ganancia de peso al finalizar el tratamiento, mientras que el único grupo que mostró diferencias significativas respecto al control inducido (2 % DSS) fue el grupo con la dosis de 0.5 g. Si bien no ha sido reportado el efecto del consumo de una botana horneada de maíz nixtamalizado/frijol común cocido sobre la ganancia de peso en un modelo *in vivo* de colitis crónica, investigadores que han suministrado frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido negro y rojo, utilizando la misma concentración de DSS pero en modelos agudos de colitis no han reportado diferencias significativas en el peso de los animales al finalizar los tratamientos (Monk *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2014). Se evidencia que en las semanas en las que fue suministrado el DSS (semanas 1, 3 y 5) los animales tratados con DSS disminuyeron su peso. La pérdida de peso es una respuesta del animal al proceso inflamatorio causado por el DSS como consecuencia del sangrado a causa de la destrucción paulatina del epitelio intestinal, puesto que el consumo de alimento no se vio significativamente alterado (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

La Figura 21 muestra la evolución del índice de actividad de la enfermedad a lo largo del tratamiento para todos los grupos experimentales evaluados.

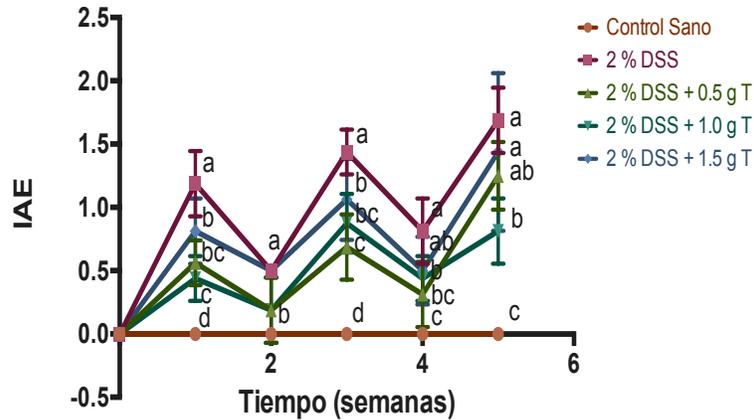


Figura 21. Evolución del Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE) durante el modelo in vivo de colitis crónica. T: Totopo (botana horneada 70:30). Los valores fueron expresados como la media \pm error estándar (EE). Letras distintas expresan diferencias significativas ($p < 0.05$) por la prueba de Tukey-Kramer.

Se muestra que el control sano, al no desarrollar la enfermedad, tuvo un IAE de 0, mientras que entre los diferentes tratamientos, el grupo con 1.0 g de botana fue el que presentó el menor IAE y el único diferente estadísticamente del control inducido (2 % DSS). Asimismo, al igual que en la Figura 21, en las semanas en las que se administró el DSS se presentaron los puntajes más altos del IAE como consecuencia del incremento del sangrado intestinal, pérdida de peso y heces blandas/presencia de diarrea, que son elementos que contribuyen al aumento del valor de IAE. Monk *et al.* (2018), para ratones de la cepa C57BL/6J alimentados con 20 % de harina de frijol común cocido negro y rojo, en un modelo de colitis agua inducida con DSS, reportó valores de IAE menores de 2, coincidiendo parcialmente con los resultados presentados.

La Figura 22A muestra los resultados del peso relativo de bazo de los animales al finalizar el modelo *in vivo* de colitis crónica (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020). Sólo el control sano y el grupo alimentado con 1 g de botana mostraron diferencias significativas respecto al control inducido ($p < 0.05$, Kruskal Wallis), indicando que, en cuanto a este parámetro, el tratamiento con 1 g de botana es el más promisorio. Se ha reportado que el proceso inflamatorio puede conllevar a un incremento en el

tamaño y peso del bazo en diferentes modelos de inducción de colitis en ratones (Park *et al.*, 2012; Ramakers *et al.*, 2007). Debido al estado inflamatorio constante, el bazo debe realizar un trabajo excesivo de limpieza de antígenos y de producción de anticuerpos, provocando un incremento en las células reticuloendoteliales contenidas dentro del bazo, provocando hiperplasia de las células del bazo, y con ello el incremento de su peso y tamaño, una condición que médicamente se conoce como esplenomegalia (Chapman & Azevedo, 2019).

El gráfico de la Figura 22B indica que ninguno de los tratamientos fue hepatotóxico al no provocar cambios significativos en el peso del hígado. Se ha reportado que el DSS actúa localmente a nivel del colon, sin afectar el hígado (Chassaing *et al.*, 2014b), por lo que no han sido observados lesiones hepáticas en los modelos murinos que utilizan DSS, aunque Kusunoki *et al.* (2014), en ratones ICR de 7 semanas de edad y para un modelo agudo de colitis (10 días, 3.5 % *ad libitum* en el agua de beber) encontró niveles incrementados de las especies moleculares de citocromo P450 (CYP3A, CYP1A, CYP2C, CYP2D y CYP2E), principalmente asociado al desarrollo de un nivel inflamatorio hepático por el ingreso de LPS bacteriano hacia el torrente sanguíneo, provocando una respuesta inmune al enlazarse dicha sustancia con el receptor TLR4 de las células de Kupffer. Estas células, en respuesta, activan la secreción de citocinas proinflamatorias que desencadenan la cascada de señalización de NF- κ B .

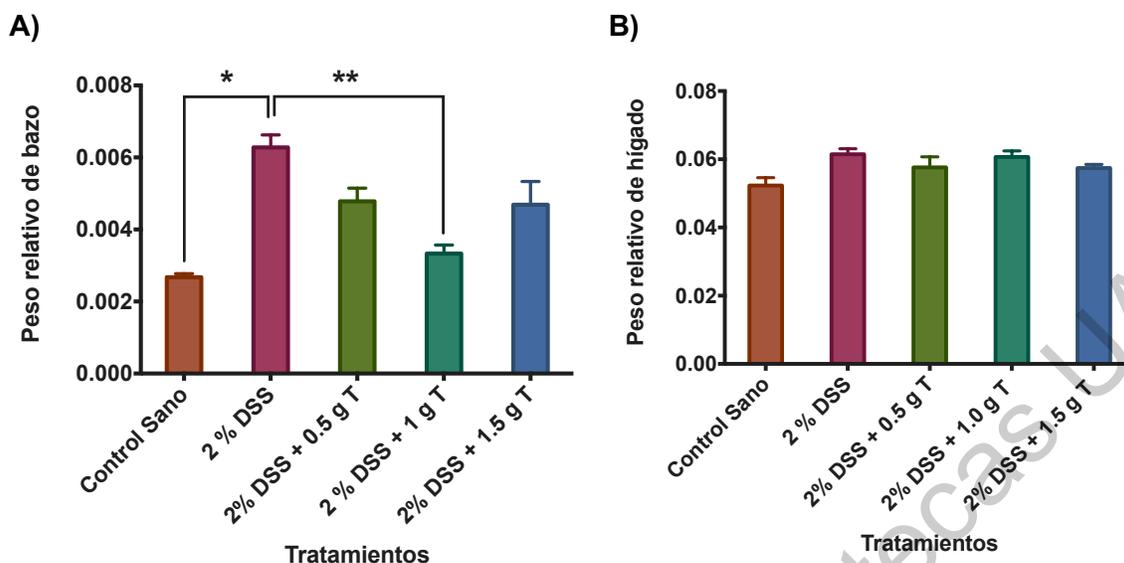


Figura 22. A) Peso relativo de bazo para cada uno de los grupos al finalizar el modelo in vivo de colitis crónica; B) Peso relativo de hígado para los diferentes tratamientos al finalizar el modelo in vivo de colitis crónica. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por la Prueba de Kruskal-Wallis. (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

Uno de los rasgos más destacados del proceso inflamatorio es el acortamiento del colon, el cual reduce su diámetro por el engrosamiento y contractura de la capa muscular de la pared intestinal (Kelley, 1992), agotamiento de células caliciformes y anomalías en las criptas basales (Gaudio *et al.*, 1999) que ha sido observado no sólo en el modelo de inflamación con DSS sino igualmente en el de TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico) (Oh *et al.*, 2014). Estos efectos son evidentes en la Figura 23, donde se muestran imágenes representativas de la longitud del colon para cada grupo, y la Figura 24 en la que se muestra la relación peso/longitud de los mismos. Se observa que el tanto el control inducido como el grupo 5 (con la dosis más alta de botana) presentaron las longitudes más pequeñas, indicando que este último grupo está generando un efecto adverso probablemente como se discutía previamente por el contenido de compuestos fenólicos que pudieran generar un efecto prooxidante (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020). Aunque se ha indicado que la fibra pudiera generar efectos adversos durante un proceso

inflamatorio ya desarrollado, las guías dietarias de la Academia de Nutrición y Dietética, la Organización Mundial de Gastroenterología y la Fundación Americana de Crohn y Colitis son muy precavidas en indicar que el consumo de fibra no debería ser limitado en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal en remisión, exceptuando dichos pacientes con estenosis intestinal (obstrucción) (Pituch-Zdanowska *et al.*, 2015).

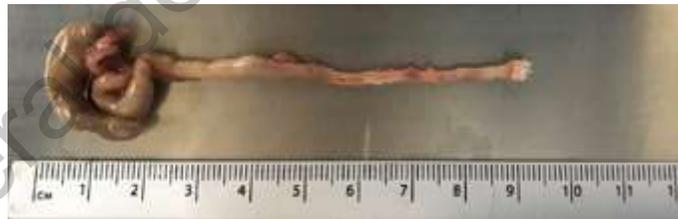
G1: Control Sano (DB)



G2: Control Inducido (2 % DSS + DB)



G3: 2 % DSS + 0.5 g T + DB



G4: 2 % DSS + 1.0 g T + DB



G5: 2 % DSS + 1.5 g T + DB



Figura 23. Imágenes representativas del colon de los animales de cada grupo al finalizar el modelo in vivo de colitis crónica (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

La cuantificación de los resultados de la Figura 24 se presentan en la Figura 25, donde únicamente el control sano y el grupo con 1 g de botana presentaron diferencias significativas con el control inducido, confirmando nuevamente por medio de este parámetro morfológico que es esta dosis la que genera los efectos más protectores de la inflamación intestinal.

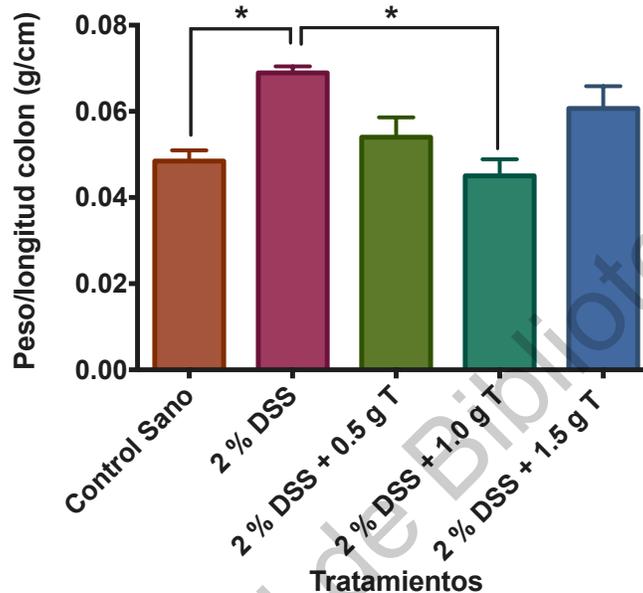


Figura 24. Relación peso/longitud de colon (en g/cm) de los diferentes tratamientos al finalizar el modelo *in vivo* de colitis crónica (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

Los resultados fueron expresados como el promedio \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por la Prueba de Kruskal-Wallis.

La evaluación histopatológica de los diferentes tejidos se encuentra manifestada en forma de imágenes representativas para cada grupo al finalizar el modelo *in vivo* de colitis crónica en la Figura 25 (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020). Como se puede observar, el control inducido (Figura 25B) presentó fusión de criptas, marcada celularidad en la *lamina propria* y alteración de la barrera intestinal. De los grupos que consumieron la botana (Figura 25C-D), el grupo que consumió 1 g de botana (Figura 26D) presentó los mayores efectos protectores del epitelio intestinal al mantener la arquitectura colónica y proteger la parte externa del mismo. Contrario a las dosis más bajas, el grupo que consumió la dosis más alta (Figura 25E) presentó poca protección de la mucosa colónica, asemejándose al control inducido.

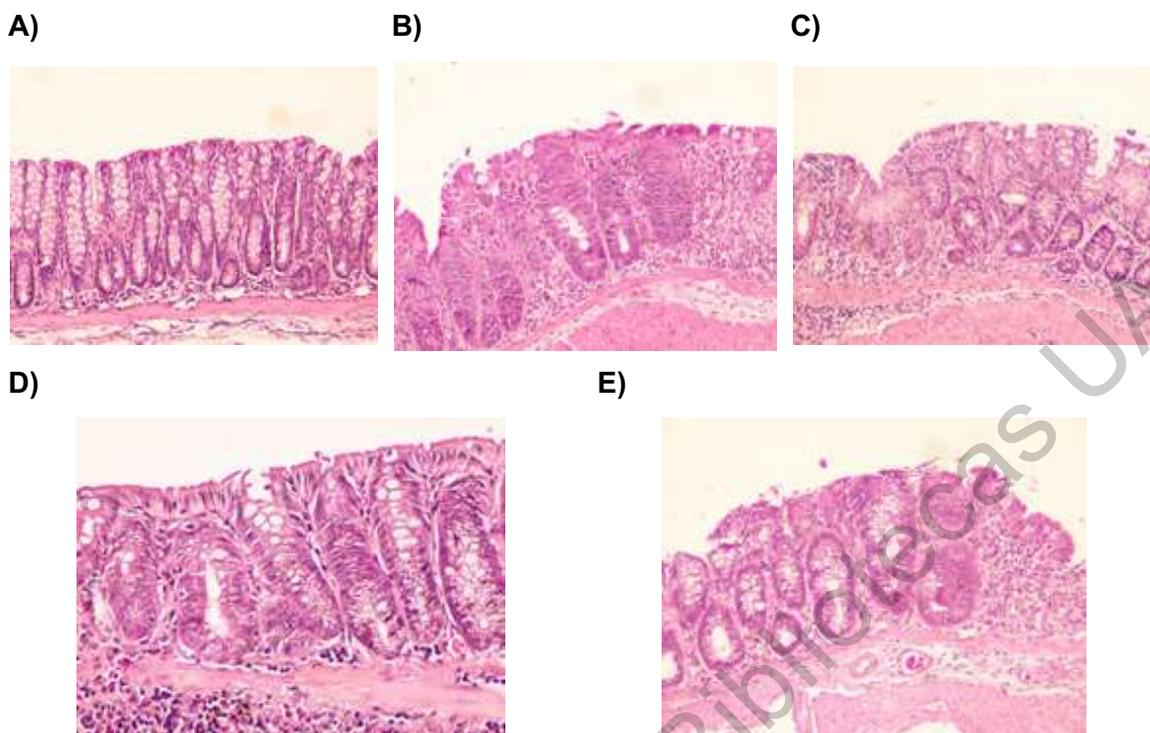


Figura 25. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina de tejido colónico al finalizar el modelo *in vivo* de colitis crónica. A) Control sano; B) Control inducido (2 % DSS); C) 2 % DSS + 0.5 g T; D) 2 % DSS + 1.0 g T; E) 2 % DSS + 1.5 g T. (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

VII.5.2 Efecto del consumo de la botana sobre parámetros enzimáticos

VII.5.2.1 Actividad de β -glucuronidasa fecal

La Figura 26 muestra la evolución semanal de la actividad de β -glucuronidasa en heces durante el modelo *in vivo* de colitis crónica. Se observa que las diferencias más pronunciadas entre los diferentes grupos se manifestaron en las semanas de administración del DSS (semanas 1, 3 y 5). Al inicio del modelo, el grupo alimentado con 1 g de botana presentó el mayor valor de actividad enzimática mientras que el control sano y el control inducido presentaron los niveles más bajos. El control inducido (2 % DSS) mantuvo niveles muy estables de actividad enzimática.

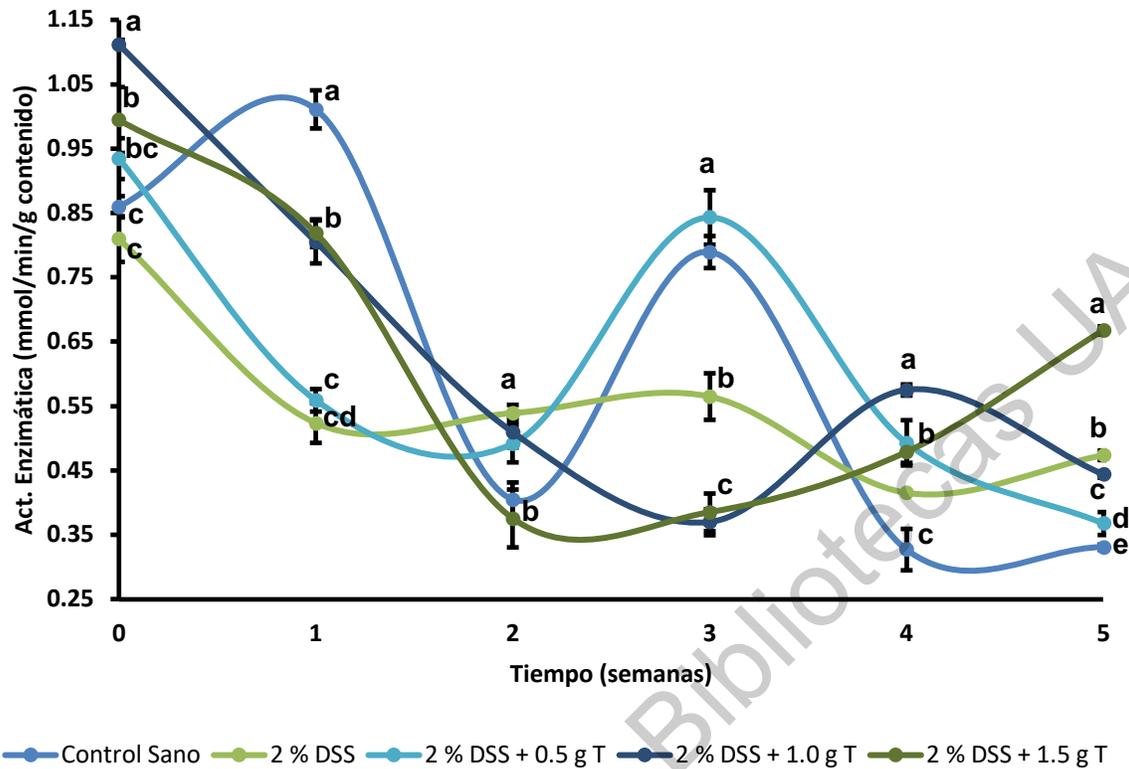


Figura 26. Evolución de la actividad de β -glucuronidasa fecal durante el desarrollo del modelo *in vivo* de colitis crónica. Los valores han sido expresados como el promedio \pm EE. Las letras minúsculas expresan diferencias significativas ($p < 0.05$) por la prueba de Kruskal Wallis.

Los grupos que consumieron botana presentaron la mayor diversidad de actividad enzimática (Figura 26), siendo notorios los grupos con 0.5 y 1.0 g de botana, que presentaron los mayores valores en la semana 3 para finalmente ubicarse entre los niveles más bajos al finalizar el modelo. El grupo que consumió 1.5 g de botana presentó una caída notoria entre la 2da y la 3ra semana del tratamiento, para finalmente ubicarse como el grupo con el mayor nivel de actividad enzimática (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

A fin de observar con mayor facilidad los cambios entre el inicio y el final del tratamiento, la gráfica 27 muestra las diferencias entre ambos estadios del modelo *in vivo*, mostrando que el grupo con la dosis más baja de botana se asemeja estadísticamente al control sano. Se ha reportado que la β -glucuronidasa es una

enzima de origen bacteriano, ayuda en el metabolismo indeseable de xenobióticos en sustancias tóxicas (Fotschki *et al.*, 2016) y que el consumo de fructo y galactooligosacáridos, compuestos fenólicos y péptidos bioactivos en la dieta contribuye a la modificación de poblaciones bacterianas (Juśkiewicz *et al.*, 2011), lo que podría explicar que al principio del tratamiento la introducción de la botana aporta fibra que modifica las poblaciones bacterianas de forma dinámica (Vergara-Castañeda *et al.*, 2010). Por tanto, basados en los resultados encontrados, se podría hipotetizar que la introducción de fibra en la dieta genera una modificación en la actividad y población bacteriana que a largo plazo se manifiesta en efectos benéficos reduciendo la actividad de la enzima, dependiendo de la dosis que se suministre y la condición inflamatoria intestinal, ya que, por ejemplo, en niños con enfermedad inflamatoria intestinal los valores de β -glucuronidasa fueron los más bajos en comparación con enfermedad de Crohn o enfermedad inflamatoria intestinal idiopática, e incluso más bajos que un grupo control sano (Mroczyńska *et al.*, 2013). Los niveles de actividad enzimática son menores a los reportados por Vergara-Castañeda *et al.* (2010) en el contenido fecal de ratas alimentadas con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero, cocido, para un modelo de cáncer de colon inducido con azoximetano (AOM) como agente inductor.

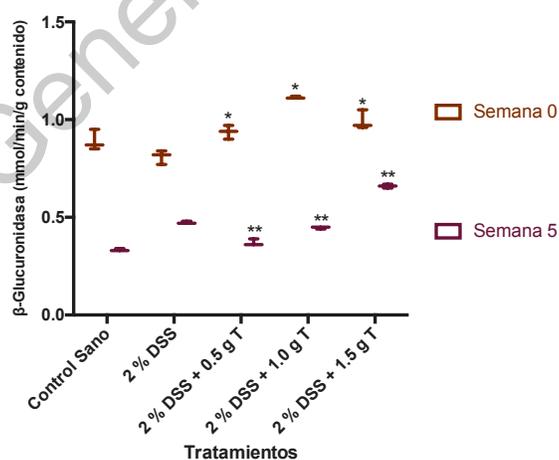


Figura 27. Comparación de la actividad enzimática de β -glucuronidasa entre el inicio y el final del modelo *in vivo* de colitis crónica. Los valores han sido expresados como el promedio \pm EE. Letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por la prueba de

Dunn entre todos los grupos y el control inducido al inicio del modelo (semana 0) y al finalizar el modelo (semana 5). (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

VII.5.2.2 Actividad de mieloperoxidasa colónica

La Figura 28 muestra los niveles de actividad de mieloperoxidasa (MPO) colónica a los 120 minutos de prueba enzimática para todos los grupos en el tejido intestinal. Se encontró que al finalizar el tratamiento, todos los grupos son significativamente diferentes del control inducido (2 % DSS), siendo notorio el grupo que consumió 0.5 g T que presentó niveles similares al control sano, en tanto que el grupo que consumió 1.5 g T presentó los valores más altos de mieloperoxidasa. Las unidades en las que se cuantificó la mieloperoxidasa (nmol/min/mL) también son equivalentes a mU/mL de actividad enzimática (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

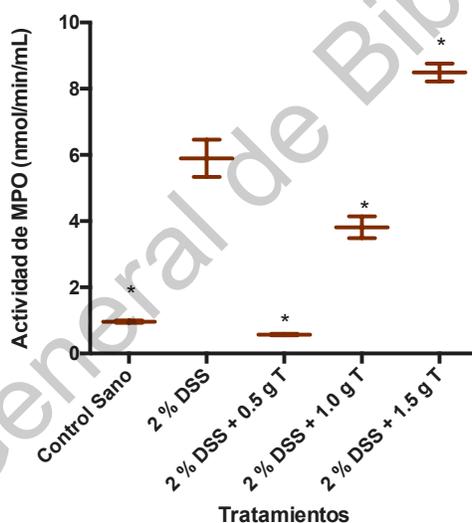


Figura 28. Actividad de mieloperoxidasa (MPO) colónica a los 120 min para todos los grupos al finalizar el modelo *in vivo* de colitis crónica. Los valores han sido expresados como el promedio \pm EE. Los asteriscos indican diferencias estadísticas respecto al control inducido por la Prueba de Dunn ($p < 0.05$) (semana 5) (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

La mieloperoxidasa es una enzima presente en los neutrófilos que cataliza la formación de potentes oxidantes citotóxicos como el ácido hipocloroso a partir de peróxido de hidrógeno, iones de cloro y N-cloraminas, por lo que su actividad refleja el grado de infiltración de neutrófilos durante el proceso inflamatorio intestinal (Hur

et al., 2012). Zhang *et al.* (2014) reportaron para ratones macho C57BL/6 (5 semanas de edad) alimentados con 20 % de harina de frijol cocido en la dieta diaria y usando un modelo agudo de colitis (2 % DSS, 7 días) valores de MPO para grupos alimentados con sólo la dieta basal (control sano), dieta basal y 2 % DSS (control inducido), grupo alimentado con 20 % de frijol cocido variedad *navy* y 2 % DSS; y grupo alimentado con 20 % de frijol cocido variedad *negro* y 2 % DSS de 158.2 ± 18.46 , 2541 ± 389.9 , 6492 ± 2357 y 4525 ± 1070 ng/mg, respectivamente. Monk *et al.* (2015), usando las mismas características del modelo pero alimentando los ratones con 20 % de harina de frijol blanco y arriñonado oscuro (*dark red kidney*) reportó valores de MPO en escala logarítmica para el control sano (dieta basal, DB), control inducido (2 % DSS + DB), grupo con frijol blanco cocido (DB + WK) y grupo con frijol arriñonado oscuro cocido (DB + DK) de entre 4 y 5.5, en escala logarítmica de MPO (en U/mL). Convirtiendo los valores obtenidos en este estudio, se encuentran niveles de MPO entre 2.98 y 3.92, menores a los reportados en el estudio. Sin embargo, es importante destacar que estos estudios muestran actividad y/o cantidad de MPO medida por ELISA y en modelo agud de 7 días, por lo que no son totalmente comparables. A pesar de ello, los autores reportaron que las dietas de frijol fueron superiores (Zhang *et al.*, 2014) o no presentaron diferencias significativas (Monk *et al.*, 2015) respecto al control inducido, indicando que la botana muestra efectos promisorios en reducir este marcador inflamatorio en dosis inferiores a 1,5 g T.

VII.5.3 Efecto del consumo de la botana sobre la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en ciego y heces.

La cantidad de ácidos grasos de cadena corta, discriminados como ácido acético, propiónico y butírico, así como la cantidad total de heces se muestra en la Figura 29, en el inicio (semana 0) y final (semana 5) del modelo *in vivo*.

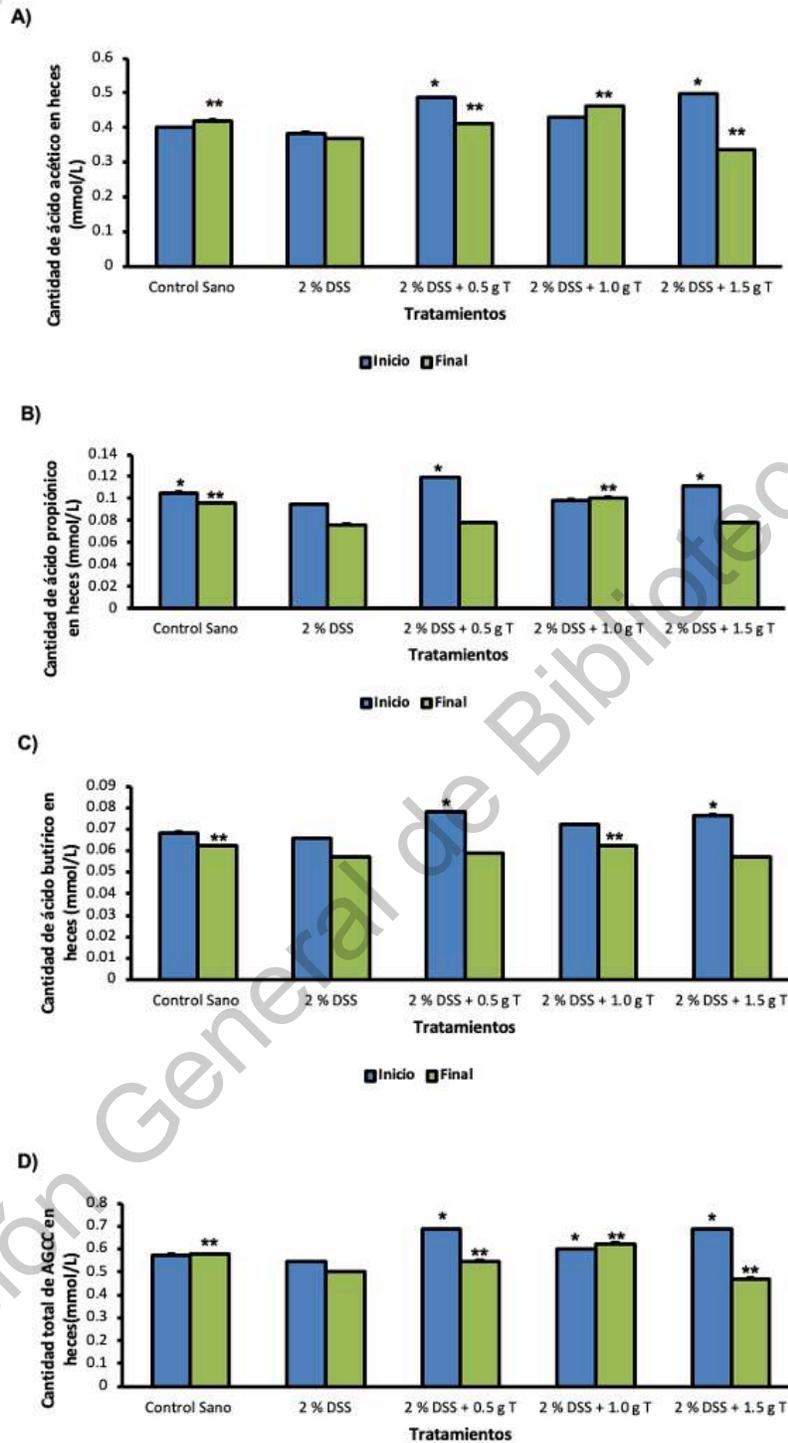


Figura 29. Cantidad de A) Ácido Acético; B) Ácido Propiónico; C) Ácido Butírico y D) Ácidos grasos totales de cadena corta cuantificados en las heces de los animales para todos los grupos del modelo *in vivo* de colitis crónica. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el control inducido (2 % DSS) por la Prueba de Dunnett ($p < 0.05$) (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

Los resultados indican que, al finalizar el modelo, los grupos que consumieron las dosis de 0.5 g y 1.0 g de botana presentaron diferencias significativas respecto al control inducido en la cantidad de ácido acético, mientras que el grupo que consumió 1.0 g de botana mostró los valores más altos de ácido propiónico y ácido butírico. El grupo que consumió la dosis más alta de botana presentó, respecto al control inducido, menores valores de ácido acético y no se encontraron diferencias significativas en la producción de ácido propiónico y butírico (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

Los ácidos grasos de cadena corta son los principales ácidos grasos derivados de la microbiota colónica y desempeñan un papel clave en el mecanismo de comunicación entre la microbiota intestinal y el huésped, generando diversos efectos fisiológicos en el organismo, especialmente en lo relacionado con metabolismo e inmunidad (Xiang *et al.*, 2018). De manera general, se sabe que se enlazan y activan los receptores acoplados a proteínas G (GPR41, GPR43 y GPR109A) e inhiben la actividad de histonas desacetilasas (HDACs), por lo que promueven la expresión de genes al permitir el acceso de factores de transcripción a las regiones promotoras. Asimismo, estos ácidos se han visto involucrados en la polarización de células T en varias células T cooperadoras (T_H), así como promueven la diferenciación de células T reguladoras (T_{reg}). Por ello, los tratamientos con AGCC, particularmente los de ácido propiónico, son utilizados para favorecer la generación de macrófagos y precursores de células dendríticas con una función para reducir la actividad de células T_H2 efectoras, cuyo exceso de actividad se ha relacionado con numerosas condiciones inflamatorias intestinales.

La Figura 30 muestra el contenido de ácidos grasos (acético, propiónico, butírico y totales) en el ciego, para todos los grupos, al finalizar el modelo *in vivo* de colitis (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

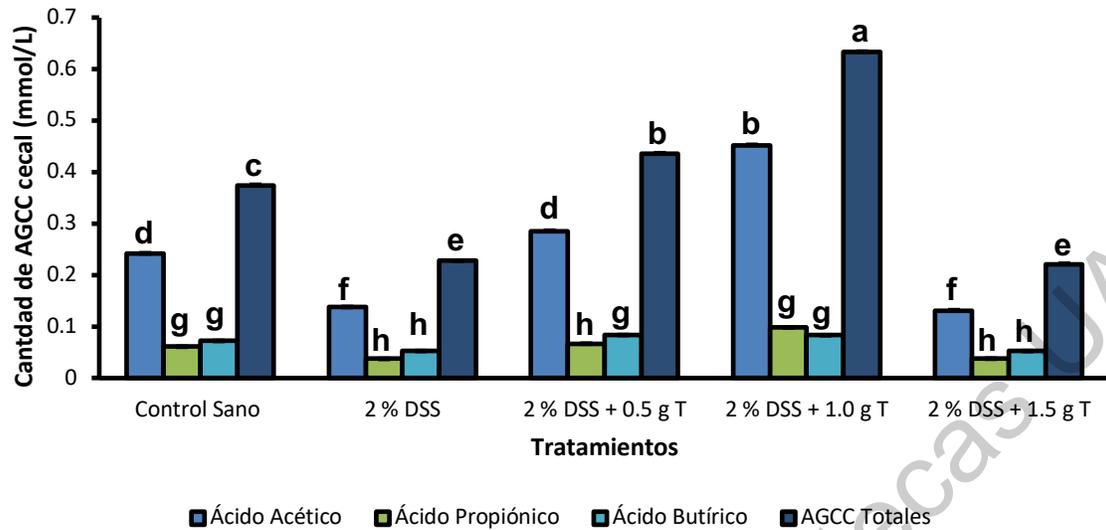


Figura 30. Cantidad de ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico, butírico y totales) cecales, para los diferentes tratamientos, al finalizar el modelo *in vivo* de colitis crónica.

Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos por la prueba de Tukey-Kramer.

Aunque no se han reportado niveles de producción de ácidos grasos en heces para botanas similares, Zhang *et al.* (2014), en ratones macho de la cepa C57BL/6J alimentados con 20 % de harina de frijol común cocido variedades *navy* y negro, dentro de un modelo de inducción de colitis agua, reportó niveles de ácidos grasos en el ciego más bajos que los del presente estudio, contabilizando un total de AGCC de 0.11 ± 0.01 mmol/L en el control sano, 0.341 ± 0.01 mmol/L para el control inducido (2 % DSS) y 0.228 ± 0.03 para el grupo alimentado con frijol *navy* cocido. Aunque los valores no son del todo comparables, por la diferencia de matrices alimentarias y la longitud del modelo, sí logran indicar que existe una tendencia para la cual el consumo de fibra favorece la producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuales dependiendo de su grado de absorción, pueden llegar a ser excretados en las heces. Por tanto, la cuantificación de estos ácidos en el ciego da una idea aproximada de la cantidad de ácidos grasos que se están absorbiendo, indicando que el grupo con la dosis más alta de botana no está absorbiendo correctamente los AGCC al haber mayor diferencia entre el contenido cecal-fecal

de los mismos, al igual que el control inducido (2 % DSS) (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

VII.5.4 Efecto del consumo de la botana en la modulación de proteínas séricas

Las citocinas liberadas en suero y plasma son biomarcadores importantes en la evaluación de la intensidad del proceso inflamatorio intestinal (Chassaing *et al.*, 2014a). Si bien tanto suero como plasma pueden usarse para la recolección y cuantificación de citocinas, se ha observado en diferentes modelos animales y humanos que la cuantificación es mayor en suero, debido a que leucocitos y plaquetas pueden ser igualmente recolectados, los cuales generan mayores niveles de citocinas que sobre estiman la cuantificación, si bien, el procesado inmediato de la muestra disminuye esta problemática (Gruen *et al.*, 2016). La Figura 31 muestra los niveles de citocinas (TNF- α , MCP-1 e IL-6) para todos los grupos evaluado en el modelo *in vivo*. Se muestra que el control inducido presentó los mayores niveles de TNF- α , mientras que el grupo con la mayor dosis de botana mostró los menos niveles de MCP-1; y G1 los menos niveles de IL-6.

Los modelos murinos de enfermedad inflamatoria intestinal han mostrado que macrófagos pro-inflamatorios se acumula en el intestino grueso durante el proceso de colitis, produciendo TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, CXCL10 y MMP9 (Bibi *et al.*, 2018). Muchas de estas citoxinas son clave en la participación de procesos que involucran a la vía canónica de inflamación y la activación del inflammasoma, así como procesos de reclutamiento de células inmunes a juzgar por los niveles observados de MCP-1. En este sentido, la disminución de la producción de MCP-1 estaría indicando una capacidad de los compuestos bioactivos y metabolitos generados a partir de la botana de reducir la acumulación de células inmunes en los sitios de inflamación, tal como fue confirmado con los niveles observados de mieloperoxidasa colónica.

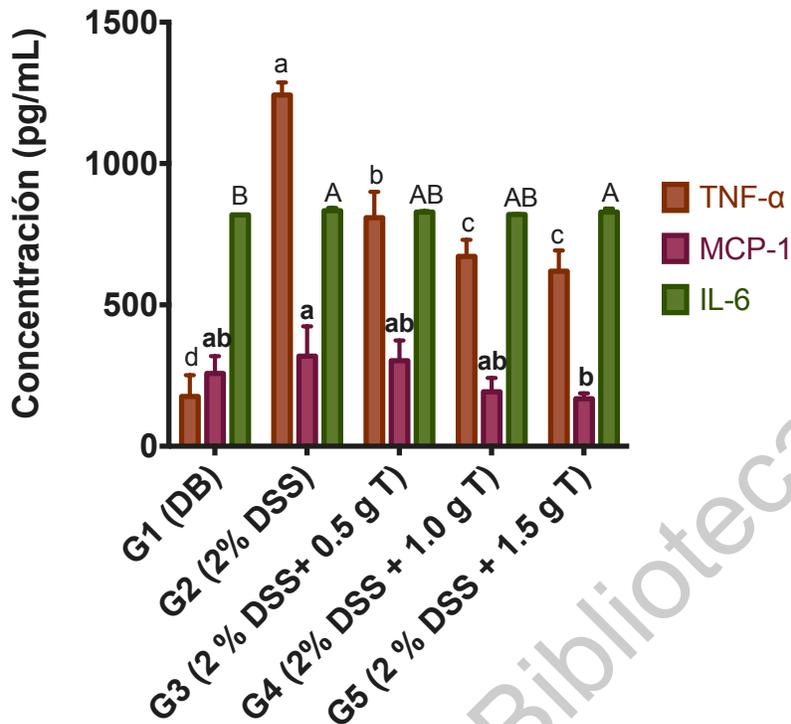


Figura 31. Producción de citocinas séricas en los animales (en pg/mL) al finalizar el modelo *in vivo* de colitis crónica. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, para cada citocina, por la prueba de Tukey-Kramer. (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

VII.5.5 Efecto del consumo de la botana en la expresión de genes en colon asociados al proceso inflamatorio

Las Figuras 32 y 33 muestran los mapas de calor (*heatmaps*) de la expresión de genes asociados con el proceso inflamatorio y la interacción microbiota-huésped, respectivamente. Para ambas Figuras, se observa que la expresión general de genes fue agrupada, donde G1 presentó el mismo comportamiento con G4, demostrando para éste último grupo un perfil de expresión génica similar al grupo sano. En el caso del G4, se observa una disminución en la expresión del gen asociado a *IL-β*, *Ccl1*, *Nfkb1* e *IL-18*, demostrando que la botana exitosamente regula de forma negativa la vía clásica de inflamación y proteínas asociadas con la activación del inflamasoma (van de Veerdonk *et al.*, 2011). Por otro lado, a juzgar

por la expresión de genes demostrada en el G5, que fue agrupado con G2, el consumo de la botana disminuye el gen asociado al receptor de TNF- α (*Tnfrsf9*), disminuye la expresión del gen asociado a *IL-10* e incremento del gen vinculado a *IL-17A*. El ácido butírico ha sido vinculado a la reducción de la expresión de la proteína NLRP3, el inflamasoma mayormente estudiado, seguido por el ácido propiónico en menor grado (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

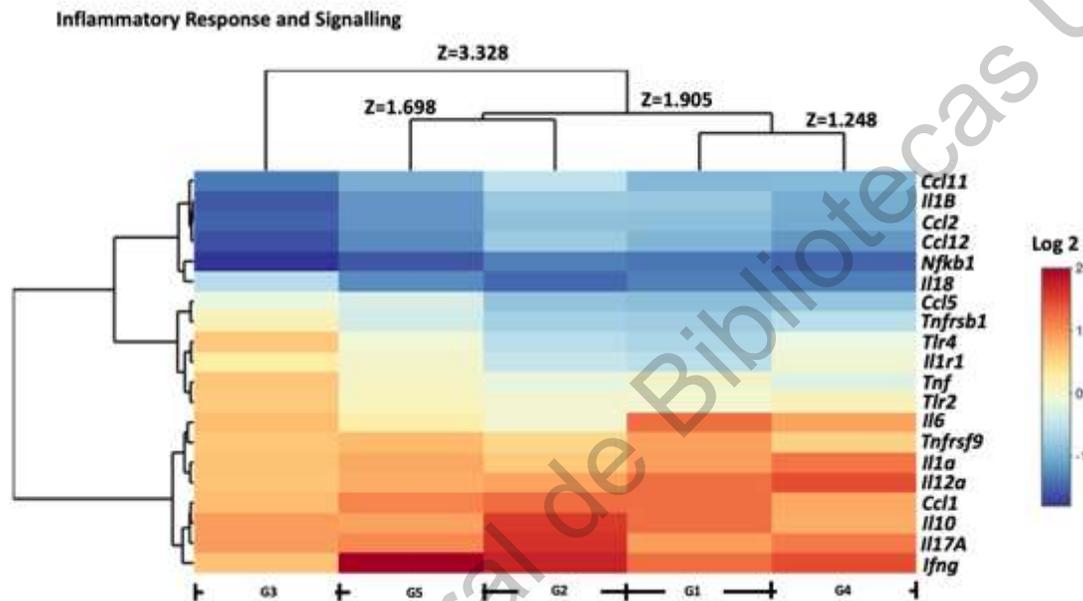


Figura 32. Mapa de calor (*Heatmaps*) de la modulación de genes asociados al proceso de inflamación en los diferentes grupos del modelo *in vivo* de colitis crónica. Los grupos están asociados por clústeres utilizando el algoritmo de Ward y la distancia euclidiana. Los colores representan los cambios de expresión (*fold change*) en una escala logarítmica. (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

Uno de los principales objetivos de la familia de IL-1 es el receptor (IL-1R), codificado por *Il1r1a*. La administración de la botana demostró reducción de este gen para el grupo G4 en comparación con G2, indicando la capacidad del consumo de la botana de modular la vía de IL-1, clave en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño y patógenos, así como en el reconocimiento de TNF- α exógena (McEntee *et al.*, 2019).

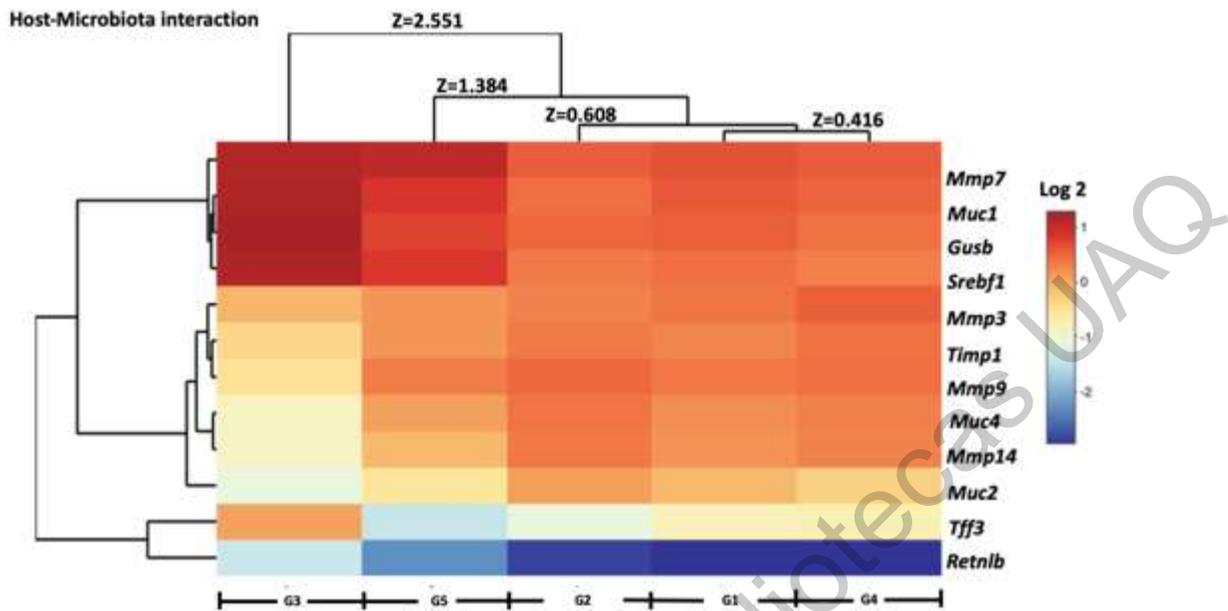


Figura 33. Mapa de calor (*Heatmaps*) de la modulación de genes asociados a la interacción huésped microbiota y la remodelación epitelial intestinal en los diferentes grupos del modelo *in vivo* de colitis crónica. Los grupos están asociados por clústeres utilizando el algoritmo de Ward y la distancia euclidiana. Los colores representan los cambios de expresión (*fold change*) en una escala logarítmica (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

En cuanto a la Figura 33, se observa que en comparación con G2, el consumo de la botana incrementa los genes *Mmp7*, *Muc1*, *Mmp3*, *Muc4* y *Retnlb*, y disminuye *Sreb1*, *Muc2*, *Tff3*. *Muc1* es un gen asociado a la expresión de la proteína Mucina 1, que provee lubricación y una barrera física en contra de los microorganismos (Carson, 2008). Esta proteína también está involucrada en la inhibición de la activación del factor nuclear NF- κ B, puesto que la activación de Mucina 1 provoca que su dominio citoplasmático active el inhibidor de la cinasa de NF- κ B, que en condiciones basales disminuye la activación de NF- κ B. Una regulación en la expresión de *Muc1* se relaciona con la activación o inhibición de las células T_H2, las cuales tienen una alta participación en la condición de colitis crónica (Nishida *et al.*, 2012).

Por otro lado, las metaloproteinasas (MMP) se involucran en la modulación de la acumulación de leucocitos en la enfermedad inflamatoria intestinal, regulando la producción de citocinas entre las células inmunes y las epiteliales (Naito & Yoshikawa, 2005). El incremento de *Mmp9* se correlaciona con la producción de mieloperoxidasa y la infiltración celular, lo cual es consistente con los efectos que tiene la dosis más alta de botana en estos últimos parámetros (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

Cuadro 12. Genes diferencialmente modulados en cada grupo del modelo *in vivo* de colitis crónica.

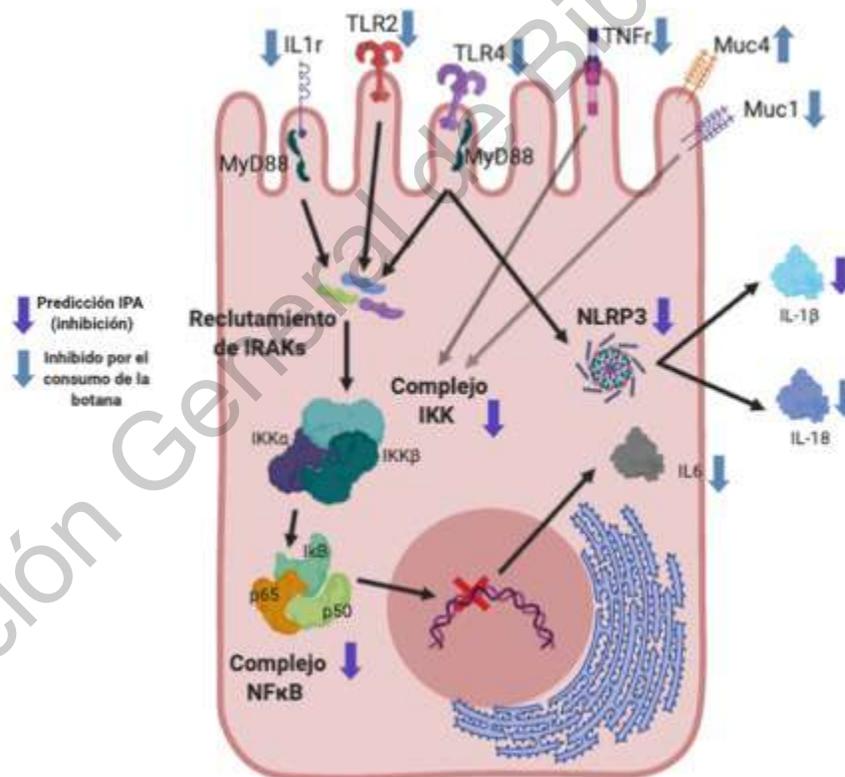
| G1 (Dieta Basal) | | | G3 (0.5 g botana) | | |
|--------------------------------|--------------------|----------|--------------------------------|--------------------|----------|
| Símbolo | Fold change | p | Símbolo | Fold change | p |
| <i>Il6</i> | -8.48 | 0.038 | <i>Ccl12</i> | 1.24 | 0.01 |
| <i>Il1a</i> | -5.77 | 0.032 | <i>Ccl11</i> | 1.16 | 0.048 |
| <i>Gusb</i> | -2.23 | 0.007 | <i>Mmp14</i> | 1.05 | 0.011 |
| <i>Timp1</i> | -2.03 | 0.04 | <i>Vegfa</i> | 0.65 | 0.007 |
| <i>Tlr2</i> | -1.83 | 0.037 | | | |
| G4 (1.0 g botana/kg PC) | | | G5 (1.5 g botana/kg PC) | | |
| Símbolo | Fold change | p | Símbolo | Fold change | p |
| <i>Il1a</i> | -6.06 | 0.041 | <i>Mmp9</i> | 2.08 | 0.0025 |
| <i>Il1r1</i> | -4.69 | 0.044 | <i>Muc4</i> | 1.43 | 0.0055 |
| <i>Tlr4</i> | -4.20 | 0.003 | <i>Mmp14</i> | 0.93 | 0.0028 |
| <i>Gusb</i> | -4.14 | 0.044 | <i>Timp1</i> | -2.11 | |
| <i>B2m</i> | -2.07 | 0.043 | <i>Il18</i> | -7.89 | 0.0286 |
| | | | <i>Il1a</i> | -8.08 | 0.0299 |
| | | | <i>Il1r1</i> | -8.83 | 0.0054 |
| | | | <i>Tlr2</i> | -8.89 | 0.0087 |
| | | | <i>Tnfrsf1b</i> | -8.96 | 0.0368 |
| | | | <i>Il6</i> | -9.12 | 0.0324 |
| | | | <i>Tnf</i> | -9.59 | 0.0384 |
| | | | <i>Tlr4</i> | -10.29 | 0.0000 |
| | | | <i>Muc1</i> | -11.29 | 0.0007 |

(Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

El Cuadro 12 muestra los genes diferencialmente expresados para todos los grupos de animales, en comparación con el control inducido (G2). De modo general, G5 presentó la mayor modulación diferencial de genes, mostrando disminuciones estadísticamente significativas de diferentes genes asociados a la modulación del inflammasoma, la vía canónica de inflamación, el receptor TLR4 y la producción de

mucina. Por su parte, el control sano (G1) presentó disminución de varios genes asociados a proteínas proinflamatorias como *Il6*, *Il1a*, *Timp1* y *Tlr2*, siendo éste último un receptor clave en la regulación del sistema inmune adaptativo, donde al dimerizarse con TLR6, reconoce una amplia gama de ligandos químicos presentes en la pared celular bacteriana (polipéptidos diacil, enterotoxinas termolábiles, lipomanano, lipoproteínas y ácido lipoteicoico) (Oliveira-Nascimento, Massari, & Wetzler, 2012).

Una explicación general de los procesos observados en el modelo *in vivo* se muestra en el siguiente mecanismo de acción (Figura 34) que muestra procesos de regulación observados en el enterocito colónico sometido a un proceso inflamatorio y con administración de la botana (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).



IPA: Ingenuity Pathways Analysis.

Figura 34. Mecanismo de acción propuesto para el efecto del consumo de la botana en el modelo *in vivo* de colitis crónica (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

En la Figura 34, de acuerdo con los resultados obtenidos, se observa que la disminución en la potencial expresión de proteínas asociadas a la expresión genética observada derivada del consumo de la botana, existe una disminución en la activación del complejo NF- κ B y del inflamasoma, además de múltiples receptores involucrados con la activación de diferentes rutas de inflamación que convergen en estos dos factores (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

VII.6 . Efecto *in vitro* del EFFND en la modulación del inflamasoma NLRP3 en un co-cultivo de células Caco-2 diferenciadas (dCaco-2) y macrófagos humanos THP-1 (M Φ)

A fin de ahondar en los mecanismos pro-inflamatorios observados con las dosis más altas de la botana, se optó por investigar estos mecanismos utilizando un modelo *in vitro* de inflamación intestinal. Para simular la presencia de células inmunes, se utilizaron monocitos humanos THP-1 que fueron diferenciados a macrófagos utilizando PMA. En el caso de la simulación del epitelio colónico, fueron usadas células Caco-2 que fueron diferenciadas a enterocitos tras un período de cultivo por 11 días.

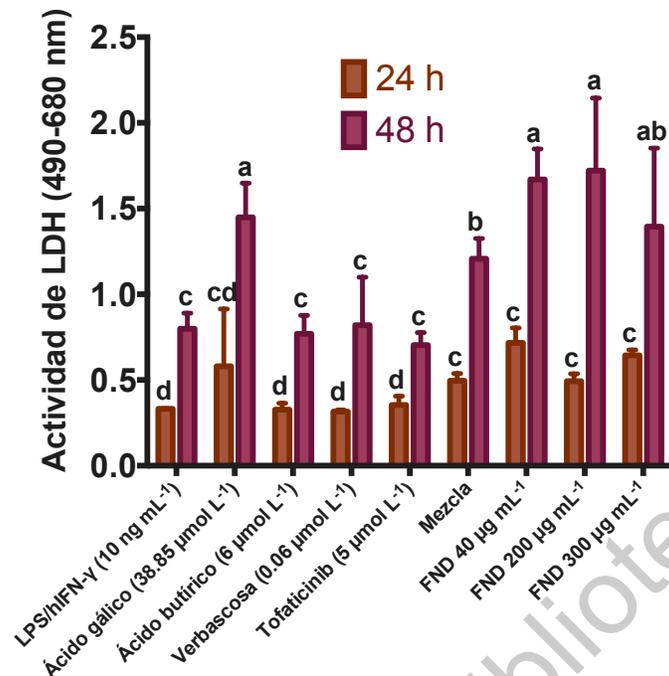


Figura 35. Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en la zona basolateral del co-cultivo, para los diferentes tratamientos ensayados en el co-cultivo de macrófagos (MΦ) y células Caco-2 diferenciadas (dCaco-2). La mezcla de estándares corresponde a la mezcla de ácido gálico, ácido butírico y verbascosa en las proporciones ensayadas (1:1:1). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, para cada citocina, por la prueba de Tukey-Kramer. **LPS:** Lipopolisacárido; **hIFN-γ:** Interferón-γ de origen humano; **FND:** Fracción no digerible.

Entre las muestras evaluadas, se utilizaron las concentraciones del principal ácido graso de cadena corta (ácido butírico), el principal oligosacárido (verbascosa), el principal ácido fenólico (ácido gálico) y la mezcla de estos, presentes en el IC₅₀ observado de la inhibición de la producción de óxido nítrico en el monocultivo de macrófagos RAW 264.7. Asimismo, se evaluaron tres concentraciones de fracción no digerible de botana correspondientes al IC₅₀ y las dosis más altas del modelo *in vivo* (1.0 h y 1.5 g de botana). Como antiinflamatorio comercial, se usó Tofacitinib®.

Se observó que, en la zona basolateral del co-cultivo, las dosis de FND y ácido gálico mostraron los niveles más altos de LDH, mientras que la mezcla de estándares, ácido butírico, verbascosa y el control con inducción de inflamación

(LPS/hIFN- γ) demostraron tener los valores más bajos de producción a las 48 horas. Es importante notar que los valores hallados de LDH son menores a los niveles máximos de producción de LDH en la zona basolateral encontrados en los experimentos de estandarización del procedimiento con estas líneas celulares a las 48 horas de co-cultivo. En efecto, en la zona basolateral, el máximo valor de actividad de LDH fue de 2.34 ± 0.04 , por lo que se puede concluir que ninguno de los tratamientos fue citotóxico ni indujo daño a la membrana celular, de acuerdo con la demostrada liberación de LDH en estos procesos (Chen *et al.*, 2015). Como LDH es una enzima que se encuentra dentro del citoplasma celular, su liberación puede relacionarse con expulsión del contenido citosólico al medio externo debido al daño membranal.

La Figura 36 muestra la producción de nitritos en la zona basolateral del co-cultivo, como un marcador indirecto de óxido nítrico, típicamente usado en la medición de inflamación. Se encontró que el control inducido (LPS/hIFN- γ) mostró los mayores valores de producción, mientras que fue la dosis de 40 $\mu\text{g/mL}$ de FND la que demostró tener la menor producción de nitritos. Debido a que este modelo utiliza lipopolisacárido (LPS) como uno de los inductores de inflamación, este componente de la pared celular bacteriana interacciona con el receptor TLR4 de los macrófagos, iniciando una cascada de señalización en la que se incrementa el flujo de calcio a la célula, lo que activa la Sintetasa endógena de óxido nítrico (eNOS), la cual sistemáticamente activa otras NOS tanto en las células epiteliales como en los macrófagos (Aktan, 2004), encargadas de la producción de óxido nítrico.

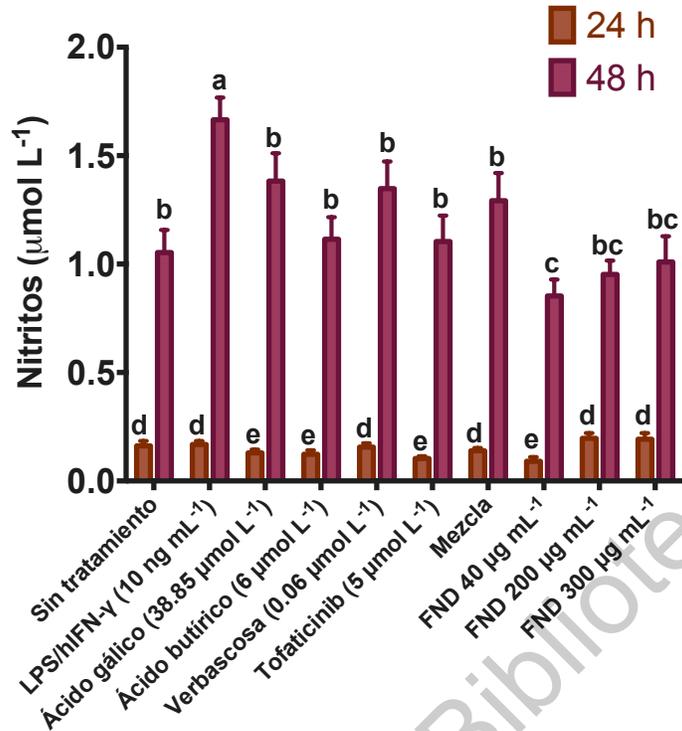


Figura 36. Producción de nitritos en la zona basolateral del co-cultivo, para los diferentes tratamientos ensayados en el co-cultivo de macrófagos (MΦ) y células Caco-2 diferenciadas (dCaco-2). La mezcla de estándares corresponde a la mezcla de ácido gálico, ácido butírico y verbascosa en las proporciones ensayadas (1:1:1). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, para cada citocina, por la prueba de Tukey-Kramer.

La Figura 36 muestra la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) medidas en unidades relativas de fluorescencia (RFU) de macrófagos luego de 48 horas de co-cultivo, y para todos los tratamientos ensayados. Se observa que las dos dosis más bajas de FND muestran los valores más bajos de EROs, mientras que la dosis más alta fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que estas últimas. Tanto el control inducido como el ácido gálico demostraron ser los tratamientos con mayor producción de EROs.

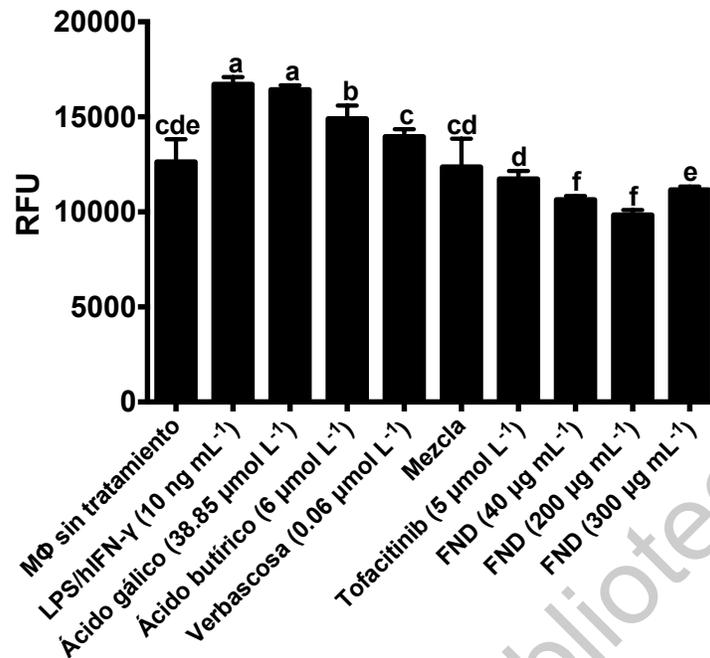


Figura 37. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (en unidades relativas de fluorescencia o *RFU* por sus siglas en inglés) en la zona basolateral del co-cultivo, para los diferentes tratamientos ensayados en el co-cultivo de macrófagos ($M\Phi$) y células Caco-2 diferenciadas (dCaco-2). La mezcla de estándares corresponde a la mezcla de ácido gálico, ácido butírico y verbascosa en las proporciones ensayadas (1:1:1). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, para cada citocina, por la prueba de Tukey-Kramer.

Se ha demostrado que la producción mitocondrial de EROs contribuye a la activación del inflammasoma (Abais *et al.*, 2015). Esto ha sido confirmado en modelos experimentales donde la inhibición de activadores del inflammasoma NLRP3 como los EROs derivados de NADPH oxidasa previnieron la activación de caspasa-1 y la producción de IL-1 β en macrófagos alveolares, por lo que inhibir estas moléculas podría ser benéfico en la desregulación del inflammasoma (Cruz *et al.*, 2007).

Debido a la estrecha relación que hay entre los EROs y mecanismos antioxidantes celulares, la Figura 38 muestra la actividad de esta enzima, donde a mayores dosis de la botana se demostró una inhibición de la actividad de esta enzima, indicando

que la dosis máxima de la botana tiene un efecto pro-oxidante en comparación con las dosis más bajas de la misma, demostrando que 300 $\mu\text{g/mL}$ correspondería a ser una dosis perjudicial en el tratamiento de inflamación.

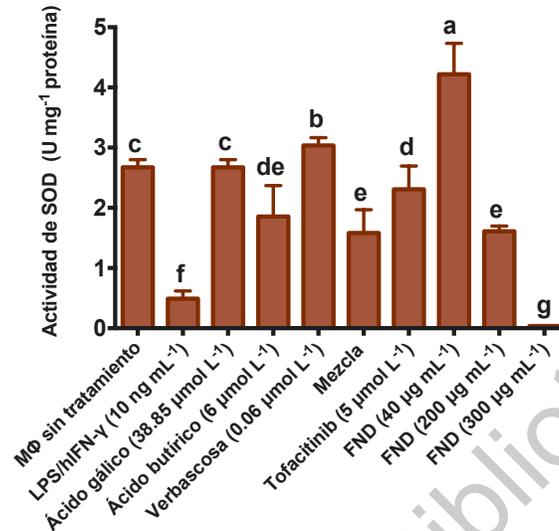


Figura 38. Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) en macrófagos luego del co-cultivo. La mezcla de estándares corresponde a la mezcla de ácido gálico, ácido butírico y verbascosa en las proporciones ensayadas (1:1:1). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, para cada citocina, por la prueba de Tukey-Kramer.

La enzima superóxido Dismutasa dismuta radicales superóxido en moléculas menos peligrosas como peróxido de hidrógeno, agua y alcohol, por lo que su actividad es esencial en el mantenimiento del estado de óxido reducción celular y protección de las membranas celulares de procesos dañinos (Ighodaro & Akinloye, 2018). SOD puede activarse en presencia de EROs contribuyendo a disminuir su efecto.

Debido a que SOD tiene actividad denitrasa en macrófagos, revirtiendo el óxido nítrico derivado de algunas NOS (Bogdan, 2015), la actividad de óxido nítrico sintetasa total (NOS) fue cuantificada en los macrófagos luego del co-cultivo para todos los tratamientos ensayados (Figura 39), donde se muestra que la FND presenta los mayores niveles de esta enzima, coincidiendo con los resultados de

SOD, e indicando que la dosis más baja de FND exitosamente puede disminuir la actividad de NOS en comparación con un control de NOS. Tofacitinib, el control antiinflamatorio, presentó los niveles enzimáticos más bajos, coincidiendo con su demostrado efecto en la inhibición del gen *NOS2*, responsable de la actividad de NOS en mamíferos, y demostrando que la inhibición de esta enzima puede ser un objetivo terapéutico de importancia en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales.

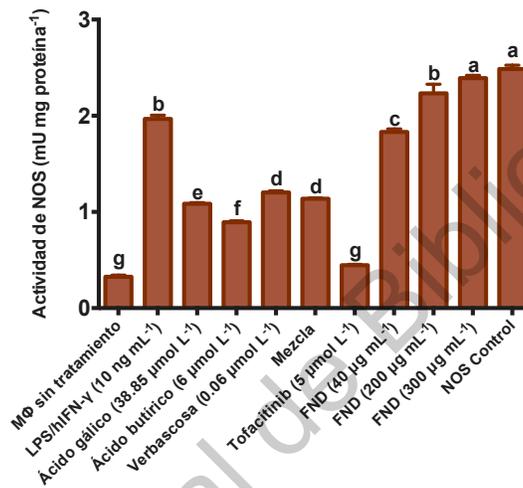


Figura 39. Actividad de óxido nítrico sintetasa total (NOS) en macrófagos luego del co-cultivo. La mezcla de estándares corresponde a la mezcla de ácido gálico, ácido butírico y verbascosa en las proporciones ensayadas (1:1:1). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, para cada citocina, por la prueba de Tukey-Kramer.

Específicamente en la inhibición de diferentes marcadores que contribuyen a la cascada de señalización de activación del inflamasoma, la Figura 39 muestra el efecto de los diferentes tratamientos sobre la activación de caspasa-1 en macrófagos, tras ser sometido a 48 horas de interacción con dCaco-2. Los resultados demuestran que FND activa Caspasa-1 de forma dosis-dependiente, aunque significativamente menos que un control de activación del inflamasoma (Nigericina). Entre los estándares, ácido butírico y la mezcla de estándares presentaron los niveles más bajos de actividad de caspasa-1.

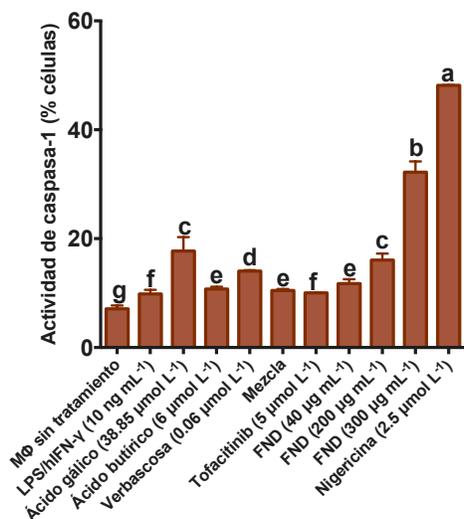


Figura 40. Actividad de caspasa-1 en macrófagos luego de la activación del inflammasoma y después de co-cultivo. La mezcla de estándares corresponde a la mezcla de ácido gálico, ácido butírico y verbascosa en las proporciones ensayadas (1:1:1). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, para cada citocina, por la prueba de Tukey-Kramer.

Como parte de la segunda señal de activación del inflammasoma, luego del estímulo a NF- κ B, diferentes componentes como sales de calcio contribuyen a producir EROs, que conllevan a la activación de caspasa-1, esencial en el procesamiento de pro IL-1 β y pro IL-18 en IL-1 β e IL-18, respectivamente, y la activación de la muerte celular programada por inflamación (piroptosis) (Armstrong *et al.*, 2019). La actividad supresora del inflammasoma NLRP3 y la inhibición del precursor de caspasa-1 (pro-caspasa-1) ha sido reportada para ácido butírico (Wang *et al.*, 2015).

La Figura 41 muestra los macrófagos en proceso de apoptosis tras co-cultivo con dCaco-2, activación del inflammasoma y tratamiento con las diferentes muestras. Los resultados coinciden con los de la Figura 40, donde a mayor actividad de Caspasa-1, mayor proceso de apoptosis, confirmando numerosos reportes ya descritos de la apoptosis inducida por inflamación como una consecuencia final de este proceso. Para ello, caspasa-1 inicia un proceso lítico que deja el núcleo de las células intacto,

pero al igual que un proceso apoptótico clásico, daña el ADN y genera condensación nuclear (Armstrong *et al.*, 2019).

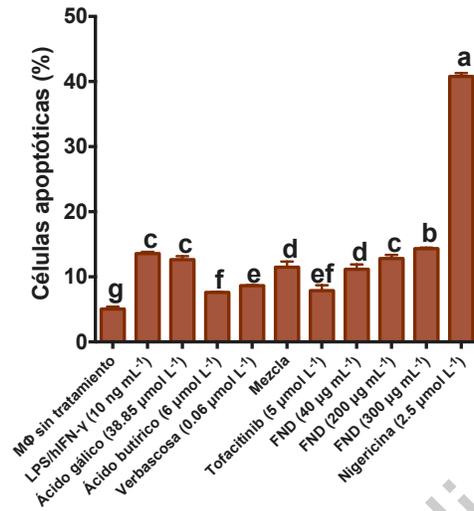


Figura 41. Macrófagos en proceso de apoptosis inducida por la activación del inflammasoma, después del co-cultivo. La mezcla de estándares corresponde a la mezcla de ácido gálico, ácido butírico y verbascosa en las proporciones ensayadas (1:1:1). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, para cada citocina, por la prueba de Tukey-Kramer.

Finalmente, dos citocinas respuesta de la activación del inflammasoma son IL-1 β e IL-18 (Figuras 41 y 42, respectivamente), para las que se observa una tendencia similar que corresponde con la activación de caspasa-1 y el proceso piroptótico en macrófagos. Para IL-1 β fueron la mezcla de estándares y tofacitinib los más efectivos en impedir la producción de esta citocina, la cual presenta niveles muy bajos de producción en el sistema basal. Entre los estándares, nuevamente el ácido butírico emerge como el más efectivo inhibidor de la producción de esta citocina. Se ha reportado que el ácido butírico contribuye a la producción de prostaglandina E2, otro contribuyente antiinflamatorio que reduce los niveles de esta citocina.

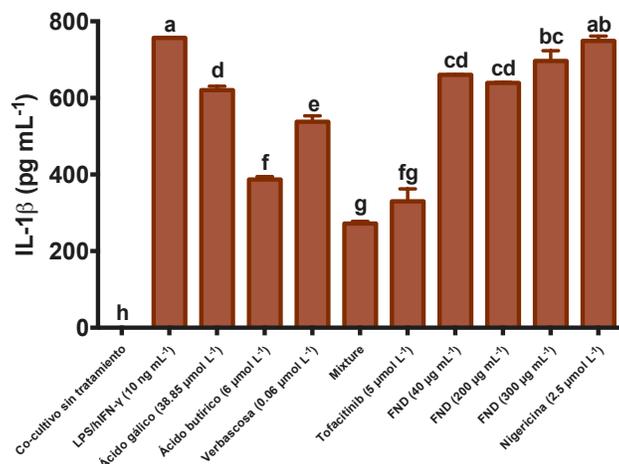


Figura 42. Producción de IL-1 β en macrófagos tras activación del inflammasoma, y después del co-cultivo. La mezcla de estándares corresponde a la mezcla de ácido gálico, ácido butírico y verbascosa en las proporciones ensayadas (1:1:1). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, para cada citocina, por la prueba de Tukey-Kramer.

Por su parte, para IL-18 (Figura 43), el antiinflamatorio presentó los menores niveles de producción, seguido de las dos dosis más bajas de la botana, en tanto que todos los estándares presentaron valores elevados de producción de IL-18, aunque menores que el control positivo de activación del inflammasoma (nigericina).

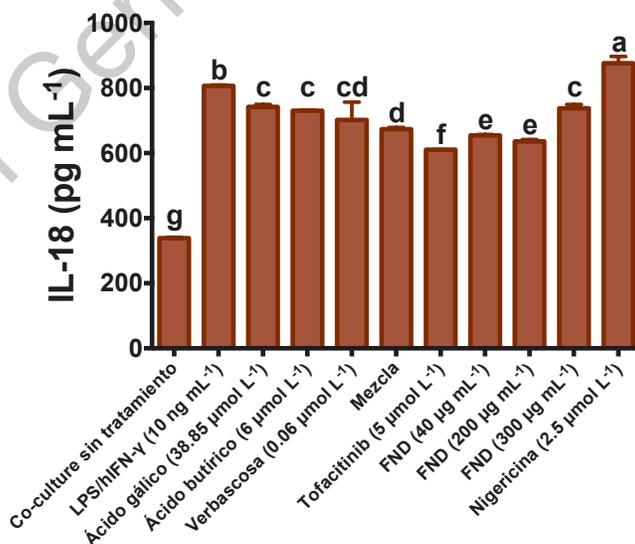


Figura 43. Producción de IL-18 en macrófagos tras activación del inflammasoma, y después del co-cultivo. La mezcla de estándares corresponde a la mezcla de ácido

gálico, ácido butírico y verbascosa en las proporciones ensayadas (1:1:1). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, para cada citocina, por la prueba de Tukey-Kramer.

Por último, una propuesta de mecanismo de acción de la botana en el umbral de actividad entre los enterocitos y células inmunes como los macrófagos es presentado en la Figura 44, en el que se indica que la activación de procesos proinflamatorios en el enterocito genera EROs que impactan activando mecanismos proinflamatorios en el macrófago. Por un lado, la interacción de lipopolisacárido e IFN- γ favorecen la vía de NF- κ B, que actúa como primera señal de estímulo al inflamasoma NLRP3, y la consecuente producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α . Luego, la presencia de una solución isotónica actúa como segunda señal del inflamasoma, activando caspasa-1 y contribuyendo al procesamiento enzimático que generará IL-1 β e IL-18, y la muerte celular inducida por inflamación.

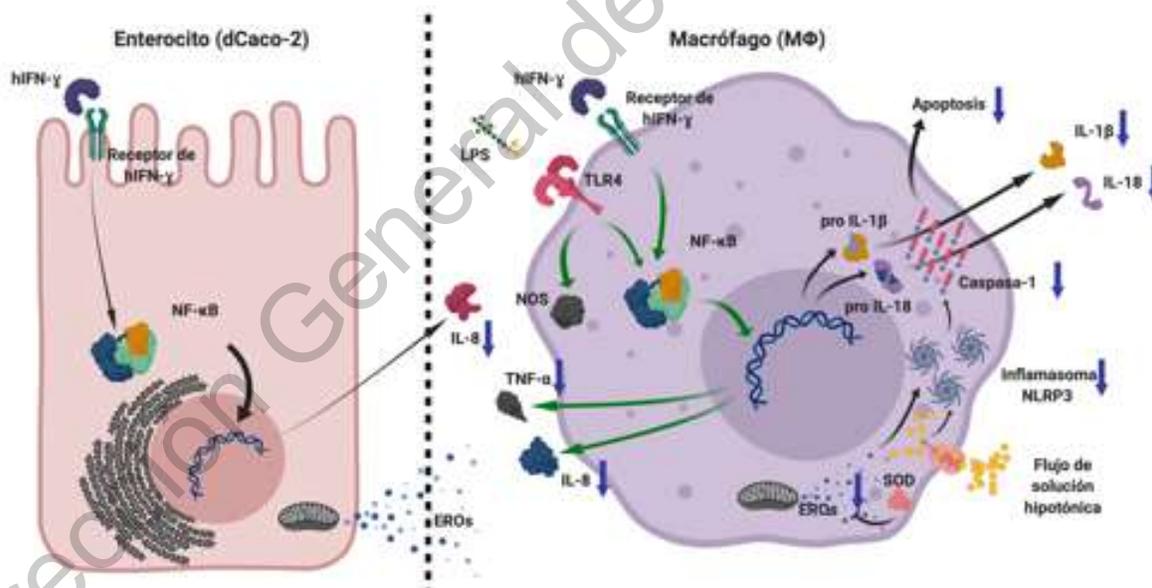


Figura 44. Mecanismo de acción propuesto para el modelo *in vitro* de inflamación intestinal utilizando un co-cultivo de macrófagos THP-1 y células Caco-2 diferenciadas (dCaco-2) a enterocitos.

En la Figura 44, las flechas indican el modo como los metabolitos en conjunto de la botana permiten inhibir varios de estos mecanismos, contribuyendo en las dosis más bajas de la botana a inhibir el inflamasoma NLRP3. Estos mecanismos permiten parcialmente explicar por qué la dosis más alta de la botana presentó efectos proinflamatorios en el modelo *in vivo* y conlleva a generar información frente al establecimiento de dosis saludables para coadyuvar en la reducción de colitis crónica.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

VIII.CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este proyecto sugieren que el consumo de una botana horneada de harina de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido ejerce un efecto anti-inflamatorio en un proceso de colitis crónica al manifestar efectos *in vivo* en prevención de la reducción de peso por el proceso inflamatorio, evita el incremento del índice de actividad de la enfermedad, disminuye el acortamiento del colon y la alteración de la arquitectura colónica por el proceso de enfermedad, y reducen marcadores enzimáticos en heces (β -glucuronidasa) y colon (mieloperoxidasa colónica). La disminución en la producción de citocinas séricas proinflamatorias y de la expresión de genes asociados al proceso inflamatorio y moduladores de la remodelación epitelial intestinal indica que el consumo de la botana ejerce estos efectos antiinflamatorios inhibiendo al receptor de TNF- α , el receptor de IL-1 y disminuye la cascada de señalización de NF- κ B. La disminución de inflamación podría estar asociada al efecto conjunto de los compuestos fenólicos, oligosacáridos y ácidos grasos de cadena corta de la botana, particularmente en estos últimos el ácido butírico. Es necesario destacar que estos efectos benéficos fueron encontrados con las dos dosis más bajas de la botana en los animales (0.5 y 1.0 g de botana/día) mientras que la dosis más alta manifestó efectos proinflamatorios.

La investigación de estos efectos demostró *in vitro* que la mayor dosis de botana (su extracto fermentado de fracción no digerible) incrementa en macrófagos humanos, en comparación con las dosis más bajas, la producción de óxido nítrico, actividad de lactato deshidrogenasa, producción de EROs, disminuye la actividad de superóxido dismutasa e incrementa óxido nítrico Sintetasa total. La investigación del efecto de la botana en la modulación del inflammasoma NLRP3 demostró que la dosis más alta de botana favorece la activación de caspasa-1, la apoptosis inducida por inflamación, y la producción de IL-1 β e IL-18. El ácido butírico y el ácido gálico demostraron ser los componentes de la botana con mayor potencial antiinflamatorio e inhibidor de la actividad del inflammasoma NLRP3.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abais, J. M., Xia, M., Zhang, Y., Boini, K. M., & Li, P. L. (2015). Redox Regulation of NLRP3 Inflammasomes: ROS as Trigger or Effector? *Antioxidants and Redox Signaling*, 22(13), 1111–1129. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5994>
- Aburto, N. A., Rodríguez Aguilar, R., Sansores Martínez, Martínez, D. N., & Gutiérrez Delgado, C. (2017). Impuestos en botanas. Su impacto en precio y consumo en México. *El Trimestre Económico*, 84(4), 773–803.
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>
- Ai, Y., & Jane, J. (2016). Macronutrients in Corn and Human Nutrition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(3), 581–598. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12192>
- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, 75(6), 639–653. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.042>
- Allen, L., Williams, J., Townsend, N., Mikkelsen, B., Roberts, N., Foster, C., & Wickramasinghe, K. (2017). Socioeconomic status and non-communicable disease behavioural risk factors in low-income and lower-middle-income countries: a systematic review. *The Lancet Global Health*, 5(3), e277–e289. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30058-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30058-X)
- Angriman, I., Scarpa, M., D'Incà, R., Basso, D., Ruffolo, C., Polese, L., ... Plebani, M. (2007). Enzymes in feces: Useful markers of chronic inflammatory bowel disease. *Clinica Chimica Acta*, 381(1), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.02.025>
- Aparicio-Fernández, X., Manzo-Bonilla, L., & Loarca-Piña, G. F. (2005). Comparison of Antimutagenic Activity of Phenolic Compounds in Newly Harvested and Stored Common Beans *Phaseolus vulgaris* against Aflatoxin B 1. *Journal of Food Science*, 70(1), S73-S78.
- Armstrong, H., Bording-Jorgensen, M., Chan, R., & Wine, E. (2019). Nigericin promotes NLRP3-independent bacterial killing in macrophages. *Frontiers in*

Immunology, In Press.

- Arteaga, M. C., Moreno-Letelier, A., Mastretta-Yanes, A., Vázquez-Lobo, A., Breña-Ochoa, A., Moreno-Estrada, A., ... Piñero, D. (2016). Genomic variation in recently collected maize landraces from Mexico. *Genomics Data*, 7, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.11.002>
- Arul, L., Benita, G., & Balasubramanian, P. (2008). Functional insight for beta-glucuronidase in *Escherichia coli* and *Staphylococcus* sp. RLH1. *Bioinformatics*, 2(8), 339–343. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2478733&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Asano, J., Sato, T., Ichinose, S., Kajita, M., Onai, N., Shimizu, S., & Ohteki, T. (2017). Intrinsic Autophagy Is Required for the Maintenance of Intestinal Stem Cells and for Irradiation-Induced Intestinal Regeneration. *Cell Reports*, 20(5), 1050–1060. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.019>
- Bansal, T., Alaniz, R. C., Wood, T. K., & Jayaraman, A. (2010). The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 228–233. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906112107>
- Bennett, J. E., Stevens, G. A., Mathers, C. D., Bonita, R., Rehm, J., Kruk, M. E., ... Ezzati, M. (2018). NCD Countdown 2030: worldwide trends in non-communicable disease mortality and progress towards Sustainable Development Goal target 3.4. *The Lancet*, 392(10152), 1072–1088. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31992-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31992-5)
- Bibi, S., Du, M., & Zhu, M. J. (2018). Dietary red raspberry reduces colorectal inflammation and carcinogenic risk in mice with dextran sulfate sodium-induced colitis. *Journal of Nutrition*, 148(5), 667–674. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy007>
- Blachier, F., Beaumont, M., Andriamihaja, M., Davila, A. M., Lan, A., Grauso, M., ... Tomé, D. (2017). Changes in the luminal environment of the colonic epithelial cells and physiopathological consequences. *American Journal of Pathology*, 187(3), 476–486. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.11.015>
- Bogdan, C. (2015). Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An

update. *Trends in Immunology*, 36(3), 161–178.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2015.01.003>

Bosques-Padilla, F., Sandoval-García, E., Martínez-Vázquez, M., Garza-González, E., & Maldonado-Garza, H. (2011). Epidemiología y características clínicas de la colitis ulcerosa crónica idiopática en el noreste de México. *Revista de Gastroenterología de México*, 76(1), 34–38. Retrieved from <http://www.revistagastroenterologiamexico.org/es/epidemiologia-caracteristicas-clinicas-colitis-ulcerosa/articulo/X0375090611023563/>

Bylund-Fellenius, A. C., Landström, E., Axelsson, L. G., & Midtvedt, T. (1994). Experimental Colitis Induced by Dextran Sulphate in Normal and Germfree Mice. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 7(4), 207–215.
<https://doi.org/10.3109/08910609409141356>

Caceci, T. (2014). Exercise 19: Digestive System: Intestines.

Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J. A., Guzman-Maldonado, S. H., Paredes-Lopez, O., ... Loarca-Piña, G. (2009). Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, 74(7).
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01292.x>

Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., & Oomah, B. D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, 77(2), 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.024>

Campos-Vega, Rocio, Oomah, B. D., & Vergara-Castañeda, H. A. (2017). *In vivo* and *in vitro* studies on dietary fiber and gut health. In F. Hosseinian, B. D. Oomah, & R. Campos-Vega (Eds.), *Dietary fibre functionality in food and nutraceuticals* (First, pp. 123–177).
<https://doi.org/10.1002/9781119138105.ch6>

Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G., & Oomah, B. D. (2002). Antioxidant Activity in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 6975–6980.

- Carson, D. D. (2008). The cytoplasmic tail of MUC1: A very busy place. *Science Signaling*, 1(27), 1–5. <https://doi.org/10.1126/scisignal.127pe35>
- Castro de Pardo, C. (2006). Determination of the cytotoxic effects of extracts, fractions or substances, by means of the MTT Test. Retrieved from IUPAC website: https://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf
- Chapman, J., & Azevedo, A. M. (2019). Splenomegaly. In *StatPearls*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28613657>
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2014a). Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. In *Current Protocols in Immunology* (pp. 15.25.1-15.25.14). <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104>
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2014b). Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Current Protocols in Immunology*, (104), 1199–1216. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104>. Dextran
- Chavez-Santoscoy, R. A., Gutierrez-Uribe, J. A., Granados, O., Torre-Villalvazo, I., Serna-Saldivar, S. O., Torres, N., ... Tovar, A. R. (2014). Flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats modulate lipid metabolism and biliary cholesterol secretion in C57BL/6 mice. *The British Journal of Nutrition*, 112(6), 886–899. <https://doi.org/10.1017/S0007114514001536>
- Chávez-Santoscoy, R. A., Gutiérrez-Uribe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2013). Effect of Flavonoids and Saponins Extracted from Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seed Coats as Cholesterol Micelle Disruptors. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(4), 416–423. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0384-7>
- Chen, G., Yang, Y., Hu, C., Cheng, X., & Xu, Y. (2016). Protective effects of Huangqin Decoction against ulcerative colitis and associated cancer in mice. *Oncotarget*, 7(38), 61643–61655. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11426>
- Chen, H., Wang, B., Zhao, R., Gao, D., Guan, M., Zheng, L., ... Feng, W. (2015). Coculture with Low-Dose SWCNT Attenuates Bacterial Invasion and

- Inflammation in Human Enterocyte-like Caco-2 Cells. *Small*, 11(34), 4366–4378. <https://doi.org/10.1002/sml.201500136>
- Coll, R. C., Robertson, A. A. B., Chae, J. J., Higgins, S. C., Muñoz-Planillo, R., Inerra, M. C., ... O'Neill, L. A. J. (2015). A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature Medicine*, 21(3), 248–257. <https://doi.org/10.1038/nm.3806>
- Cruz, C. M., Rinna, A., Forman, H. J., Ventura, A. L. M., Persechini, P. M., & Ojcius, D. M. (2007). ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 2871–2879. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608083200>
- De Preter, V., Falony, G., Windey, K., Hamer, H. M., De Vuyst, L., & Verbeke, K. (2010). The prebiotic, oligofructose-enriched inulin modulates the faecal metabolite profile: An *in vitro* analysis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(12), 1791–1801. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000136>
- Dominguez-Uscanga, A., Loarca-Piña, G., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Baked corn (*Zea mays* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) snack consumption lowered serum lipids and differentiated liver gene expression in C57BL/6 mice fed a high-fat diet by inhibiting PPAR γ and SREBF2. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 50, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.08.011>
- ENVIGO. (2017). ICR (CD-1) Outbred mice.
- Escalante-Aburto, A., Mariscal-Moreno, R. M., Santiago-Ramos, D., & Ponce-García, N. (2019). An update of different nixtamalization technologies, and its effects on chemical composition and nutritional value of corn tortillas. *Food Reviews International*, 1–43. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1649693>
- Espín, J. C., González-Barrio, R., Cerdá, B., López-Bote, C., Rey, A. I., & Tomás-Barberán, F. A. (2007). Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10476–10485. <https://doi.org/10.1021/jf0723864>
- Evrensel, A., & Ceylan, M. E. (2015). The gut-brain axis: The missing link in

- depression. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 13(3), 239–244.
<https://doi.org/10.9758/cpn.2015.13.3.239>
- Fleetwood, A. J., Lee, M. K. S., Singleton, W., Achuthan, A., Lee, M.-C., O'Brien-Simpson, N. M., ... Hamilton, J. A. (2017). Metabolic Remodeling, Inflammasome Activation, and Pyroptosis in Macrophages Stimulated by *Porphyromonas gingivalis* and Its Outer Membrane Vesicles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(August), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00351>
- Forbes, S. L., Kahiya, E., & Balderstone, C. (2016). Analysis of Snack Food Purchasing and Consumption Behavior. *Journal of Food Products Marketing*, 22(1), 65–88. <https://doi.org/10.1080/10454446.2014.949992>
- Förstermann, U., Xia, N., & Li, H. (2017). Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation Research*, 120(4), 713–735. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309326>
- Fotschki, B., Juśkiewicz, J., Jurgoński, A., Kołodziejczyk, K., Milala, J., Kosmala, M., & Zduńczyk, Z. (2016). Anthocyanins in strawberry polyphenolic extract enhance the beneficial effects of diets with fructooligosaccharides in the rat cecal environment. *PLoS ONE*, 11(2), 1–17.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149081>
- Gaona-Pineda, E. B., Martínez-Tapia, B., Arango-Angarita, A., Valenzuela-Bravo, D., Gómez-Acosta, L. M., Shamah-Levy, T., & Rodríguez-Ramírez, S. (2018). Consumo de grupos de alimentos y factores sociodemográficos en población mexicana. *Salud Pública de México*, 60(3, may-jun), 272.
<https://doi.org/10.21149/8803>
- García-Lafuente, A., Moro, C., Manchón, N., Gonzalo-Ruiz, A., Villares, A., Guillamón, E., ... Mateo-Vivaracho, L. (2014). *In vitro* and anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. *Food Chemistry*, 161, 216–223.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.004>
- García-Lara, S., & Serna-Saldivar, S. O. (2019). Corn History and Culture. In S. O. Serna-Saldivar (Ed.), *Corn* (Third, pp. 1–18). <https://doi.org/10.1016/B978-0->

12-811971-6.00001-2

- Gaudio, E., Taddei, G., Vetuschi, A., Sferra, R., Frieri, G., Ricciardi, G., & Caprilli, R. (1999). Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: Clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Digestive Diseases and Sciences*, 44(7), 1458–1475. <https://doi.org/10.1023/A:1026620322859>
- Ghia, J. E., Blennerhassett, P., Kumar-Ondiveeran, H., Verdu, E. F., & Collins, S. M. (2006). The Vagus Nerve: A Tonic Inhibitory Influence Associated With Inflammatory Bowel Disease in a Murine Model. *Gastroenterology*, 131(4), 1122–1130. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.08.016>
- Greer, J. B., & O’Keefe, S. J. (2011). Microbial induction of immunity, inflammation, and cancer. *Frontiers in Physiology*, 1(168), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2010.00168>
- Griffiths, H. R., Gao, D., & Pararasa, C. (2017). Redox regulation in metabolic programming and inflammation. *Redox Biology*, 12, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.023>
- Gruen, M. E., Messenger, K. M., Thomson, A. E., Griffith, E. H., Paradise, H., Vaden, S., & Lascelles, B. D. X. (2016). A comparison of serum and plasma cytokine values using a multiplexed assay in cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 182(3), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.10.003>
- Gutiérrez, J. P., García-Saisó, S., Espinosa-de la Peña, R., & Balandrán, D. A. (2016). Desigualdad en indicadores de enfermedades crónicas y su atención en adultos en México: análisis de tres encuestas de salud. *Salud Pública de México*, 58(6), 666–675. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i6.7923>
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>
- Hoffman, R. (2013). Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis. Retrieved February 11, 2017, from Dr. Ronald Hoffman Medical Center website: <http://drhoffman.com/article/crohns-disease-and-ulcerative-colitis-2/>

- Hoshimoto, A., Suzuki, Y., Katsuno, T., Nakajima, H., & Saito, Y. (2002). Caprylic acid and medium-chain triglycerides inhibit IL-8 gene transcription in Caco-2 cells: comparison with the potent histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *British Journal of Pharmacology*, 136(2), 280–286. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704719>
- Huber, K., Brigide, P., Bretas, E. B., & Canniatti-Brazaca, S. G. (2014). Effect of Thermal Processing and Maceration on the Antioxidant Activity of White Beans. *PLoS ONE*, 9(7), e99325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099325>
- Hur, S. J., Kang, S. H., Jung, H. S., Kim, S. C., Jeon, H. S., Kim, I. H., & Lee, J. D. (2012). Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. *Nutrition Research*, 32(11), 801–816. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.09.013>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Jan A. Delcour, & R. Carl Hosney. (2010). Structure of Cereals. In *Principles of Cereal Science and Technology* (Tercera, pp. 1–22). Leuven: AACC International.
- Jenab, M., Rickard, S. E., Orcheson, L. J., & Thompson, L. U. (1999). Flaxseed and lignans increase cecal beta-glucuronidase activity in rats. *Nutr Cancer*, 33(2), 154–158. <https://doi.org/10.1207/S15327914NC330206>
- Juśkiewicz, J., Milala, J., Jurgoński, A., Król, B., & Zduńczyk, Z. (2011). Consumption of polyphenol concentrate with dietary fructo-oligosaccharides enhances cecal metabolism of quercetin glycosides in rats. *Nutrition*, 27(3), 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.02.002>
- Kämpfer, A. A. M., Urbán, P., Gioria, S., Kanashe, N., Stone, V., & Kinsner-Ovaskainen, A. (2017). Development of an in vitro co-culture model to mimic the human intestine in healthy and diseased state. *Toxicology in Vitro*, 45(1), 31–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.08.011>
- Kelley, W. N. (1992). *Textbook of Internal Medicine* (2nd ed.). Philadelphia,

Pennsylvania, USA: Editorial Médica Panamericana.

- Kiesler, P., Fuss, I. J., & Strober, W. (2015). Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 1(2), 154–170. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.01.006>
- Koch, M. A., Tucker-Heard, G., Perdue, N. R., Killebrew, J. R., Urdahl, K. B., & Campbell, D. J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nature Immunology*, 10(6), 595–602. <https://doi.org/10.1038/ni.1731>
- Kusunoki, Y., Ikarashi, N., Hayakawa, Y., Ishii, M., Kon, R., Ochiai, W., ... Sugiyama, K. (2014). Hepatic early inflammation induces downregulation of hepatic cytochrome P450 expression and metabolic activity in the dextran sulfate sodium-induced murine colitis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.12.019>
- Lao, F., Sigurdson, G. T., & Giusti, M. M. (2017). Health Benefits of Purple Corn (*Zea mays* L.) Phenolic Compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 234–246. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12249>
- Lara Flores, M. (2015). El cultivo del frijol. *Revista Digital Universitaria UNAM*, 16(2), 2–11. Retrieved from <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art09/art09.pdf>
- Leakey, C. D. B., Attrill, M. J., Jennings, S., & Fitzsimons, M. F. (2008). Stable isotopes in juvenile marine fishes and their invertebrate prey from the Thames Estuary, UK, and adjacent coastal regions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 77(3), 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.10.007>
- Lei-Leston, A. C., Murphy, A. G., & Maloy, K. J. (2017). Epithelial cell inflammasomes in intestinal immunity and inflammation. *Frontiers in Immunology*, 8(SEP), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01168>
- Limón Celorio, B., & León Félix, M. A. (2014). Snacks: mitos y realidades de las botanas en México. Retrieved November 5, 2017, from Food Technology Summit & Expo website: http://www.enfasis.com/Presentaciones/FTSMX/2014/Gratis/Snacks_BLim onALeon.pdf
- Loarca-Piña, G., Luna-Vital, D., Mojica, L., Ramírez-Jiménez, A. K., & Luzardo-

- Ocampo, I. (2018a). Health benefits from beans. In R. Campos-Vega, P. Zaczuk Basissinello, & B. D. Oomah (Eds.), *Phaseolus vulgaris: Cultivars, Production and Uses* (First, pp. 201–227). Retrieved from <https://novapublishers.com/shop/phaseolus-vulgaris-cultivars-production-and-uses/>
- Loarca-Piña, G., Luna-Vital, D., Mojica, L., Ramírez-Jiménez, A. K., & Luzardo-Ocampo, I. (2018b). Health benefits of beans. In *Phaseolus vulgaris: Cultivars, Production and Uses* (pp. 201–227).
- López-Barrera, D. M., Vázquez-Sánchez, K., Loarca-Piña, M. G. F., & Campos-Vega, R. (2016). Spent coffee grounds, an innovative source of colonic fermentable compounds, inhibit inflammatory mediators in vitro. *Food Chemistry*, 212, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.175>
- Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Gaytán-Martínez, M., Preciado-Ortiz, R., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2017). Bioaccessibility and antioxidant activity of free phenolic compounds and oligosaccharides from corn (*Zea mays* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) chips during in vitro gastrointestinal digestion and simulated colonic fermentation. *Food Research International*, 100(Pt 1), 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.018>
- Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Cuellar-Nuñez, M. L., Vázquez-Landaverde, P. A., Mojica, L., Acosta-Gallegos, J. A., & Loarca-Piña, G. (2018). Fermented non-digestible fraction from combined nixtamalized corn (*Zea mays* L.)/cooked common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) chips modulate anti-inflammatory markers on RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*, 259(C), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.096>
- Luzardo-Ocampo, Ivan, Campos-Vega, R., Gonzalez de Mejia, E., & Loarca-Piña, G. (2020). Consumption of a baked corn and bean snack reduced chronic colitis inflammation in CD-1 mice via downregulation of IL-1 receptor, TLR, and TNF- α associated pathways. *Food Research International*, 132(C), 109097. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109097>
- Luzardo-Ocampo, Ivan, Cuellar-Nuñez, M. L., Oomah, B. D., Campos-Vega, R., & Loarca-Piña, G. (2018). Common Bean-Based Food Products. In Rocio

- Campos-Vega, P. Z. Bassinello, & B. D. Oomah (Eds.), *Phaseolus vulgaris: Cultivars, Production and Uses* (pp. 319–342).
- Macfarlane, G. T., Steed, H., & Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(2), 305–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03520.x>
- Man, S. M., Karki, R., & Kanneganti, T. D. (2017). Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunological Reviews*, *277*(1), 61–75. <https://doi.org/10.1111/imr.12534>
- Martin, D. A., & Bolling, B. W. (2015). A review of the efficacy of dietary polyphenols in experimental models of inflammatory bowel diseases. *Food & Function*, *6*(6), 1773–1786. <https://doi.org/10.1039/C5FO00202H>
- Masoodi, I., Tijjani, B. M., Wani, H., Hassan, N. S., Khan, A. B., & Hussain, S. (2011). Biomarkers in the management of ulcerative colitis: a brief review. *German Medical Science: GMS e-Journal*, *9*, 1–7. <https://doi.org/10.3205/000126>
- McEntee, C. P., Finlay, C. M., & Lavelle, E. C. (2019). Divergent roles for the IL-1 family in gastrointestinal homeostasis and inflammation. *Frontiers in Immunology*, *10*(June), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01266>
- Mendoza-Díaz, S., Ortiz-Valerio, M. del C., Castaño-Tostado, E., Figueroa-Cárdenas, J. de D., Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M., ... Loarca-Piña, G. (2012). Antioxidant Capacity and Antimutagenic Activity of Anthocyanin and Carotenoid Extracts from Nixtamalized Pigmented Creole Maize Races (*Zea mays* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, *67*(4), 442–449. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0326-9>
- Mendoza, J. (2016). Snack product market value in Latin America in 2016 and 2021.
- Mercer, P. F., Shute, J. K., Bhowmik, A., Donaldson, G. C., Wedzicha, J. A., & Warner, J. A. (2005). MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. *Respiratory Research*, *6*, 151. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-151>

- México, S. de S. de. (1994). NOM-086-SSA1-1994.
- Mintel. (2015). A snacking nation: 94% of Americans snack daily.
- Monk, J. M., Lepp, D., Zhang, C. P., Wu, W., Zarepoor, L., Lu, J. T., ... Power, K. A. (2016). Diets enriched with cranberry beans alter the microbiota and mitigate colitis severity and associated inflammation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 28, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.10.014>
- Monk, J. M., Wu, W., Hutchinson, A. L., Pauls, P., Robinson, L. E., & Power, K. A. (2018). Navy and black bean supplementation attenuates colitis-associated inflammation and colonic epithelial damage. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 56, 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.013>
- Monk, J. M., Zhang, C. P., Wu, W., Zarepoor, L., Lu, J. T., Liu, R., ... Power, K. A. (2015). White and dark kidney beans reduce colonic mucosal damage and inflammation in response to dextran sodium sulfate. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(7), 752–760. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.02.003>
- Moreno-Jiménez, M. R., Cervantes-Cardoza, V., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Estrella, I., García-Gasca, T. de J., ... Rocha-Guzmán, N. E. (2015). Phenolic composition changes of processed common beans: Their antioxidant and anti-inflammatory effects in intestinal cancer cells. *Food Research International*, 76(P1), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.003>
- Moses, T., Papadopoulou, K. K., & Osbourn, A. (2014). Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(6), 439–462. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953628>
- Mroczyńska, M., Galecka, M., Szachta, P., Kamoda, D., Libudzisz, Z., & Roszak, D. (2013). Beta-glucuronidase and Beta-glucosidase activity in stool specimens of children with inflammatory bowel disease. *Polish Journal of Microbiology*, 62(3), 319–325. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24459840>
- Mroczyńska, M., & Libudzisz, Z. (2010). Beta-glucuronidase and beta-glucosidase activity of Lactobacillus and Enterococcus isolated from human feces. *Polish Journal of Microbiology*, 59(4), 265–269.

- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Naito, Y., & Yoshikawa, T. (2005). Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4-5 SPEC. ISS.), 379–390. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.009>
- Nakanishi, S., Kataoka, K., Kuwahara, T., & Ohnishi, Y. (2003). Effects of high amylose maize starch and *Clostridium butyricum* on metabolism in colonic microbiota and formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Microbiology and Immunology*, 47(12), 951–958. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03469.x>
- Neurath, M. F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 329–342. <https://doi.org/10.1038/nri3661>
- Nishida A, Lau C, Zhang M, Andoh A, Shi H, Mizoguchi E, & Mizoguchi A. (2012). The Membrane-Bound Mucin Muc1 Regulates T Helper 17-Cell Responses and Colitis in Mice. *Gastroenterology*, 142(4), 865–874. <https://doi.org/10.1016/j.gastro.2012.08.002>.
- Oficjalska, K., Raverdeau, M., Aviello, G., Wade, S. C., Hickey, A., Sheehan, K. M., ... Creagh, E. M. (2015). Protective Role for Caspase-11 during Acute Experimental Murine Colitis. *The Journal of Immunology*, 194(3), 1252–1260. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400501>
- Oh, S. Y., Cho, K. A., Kang, J. L., Kim, K. H., & Woo, S. Y. (2014). Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease. *International Journal of Molecular Medicine*, 33(2), 333–340. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1569>
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., & Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98(3), 694–702. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(90\)90290-H](https://doi.org/10.1016/0016-5085(90)90290-H)
- Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., & Wetzler, L. M. (2012). The role of TLR2 in infection and immunity. *Frontiers in Immunology*, 3(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00079>

- Ombra, M. N., d'Acierno, A., Nazzaro, F., Riccardi, R., Spigno, P., Zaccardelli, M., ... Fratianni, F. (2016). Phenolic Composition and Antioxidant and Antiproliferative Activities of the Extracts of Twelve Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Endemic Ecotypes of Southern Italy before and after Cooking. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1398298. <https://doi.org/10.1155/2016/1398298>
- Paredes-López, O., Guevara-Lara, F., & Bello-Pérez, L. A. (2013). *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas* (Tercera). México, D.F.: Fondo de Cultura Económica.
- Paredes-López, Octavio, Guevara-Lara, F., & Bello Pérez, L. A. (2013). El Maíz. In *Los Alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas* (Segunda, pp. 36–124). Ciudad de México: Fondo de Cultura Económica.
- Park, M. Y., Ji, G. E., & Sung, M. K. (2012). Dietary Kaempferol suppresses inflammation of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Digestive Diseases and Sciences*, 57(2), 355–363. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1883-8>
- Perera, A. P., Sajjani, K., Dickinson, J., Eri, R., & Körner, H. (2018). NLRP3 inflammasome in colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Mammalian Genome, In Press*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00335-018-9783-2>
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>
- Piechota-Polanczyk, A., & Fichna, J. (2014). Review article: The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 387(7), 605–620. <https://doi.org/10.1007/s00210-014-0985-1>
- Pituch-Zdanowska, A., Banaszkiwicz, A., & Albrecht, P. (2015). The role of dietary fibre in inflammatory bowel disease. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 10(3), 135–141. <https://doi.org/10.5114/pg.2015.52753>

- Power, K. A., Monk, J. M., Lepp, D., Robinson, L. E., Wu, W., Carey, C., ... McGillis, L. (2016). Common Bean and Chickpea Supplemented Diets Beneficially Enhance the Colonic Microenvironment and Reduce Colitis-Associated Inflammation. *The FASEB Journal*, *30*(1 Supplement), 893.6-893.6.
- Ramakers, J. D., Verstege, M. I., Thuijls, G., Te Velde, A. A., Mensink, R. P., & Plat, J. (2007). The PPAR γ agonist rosiglitazone impairs colonic inflammation in mice with experimental colitis. *Journal of Clinical Immunology*, *27*(3), 275–283. <https://doi.org/10.1007/s10875-007-9074-2>
- Ramírez-Jiménez, A. K., Reynoso-Camacho, R., Mendoza-Díaz, S., & Loarca-Piña, G. (2014). Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. *Food Chemistry*, *161*, 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.008>
- Rathinam, V. A. K., & Chan, F. K. M. (2018). Inflammasome, Inflammation, and Tissue Homeostasis. *Trends in Molecular Medicine*, *24*(3), 304–318. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.01.004>
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., De los Reyes-Gavilán, C. G., & Salazar, N. (2016). Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in Microbiology*, *7*(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- Rodríguez-leal, G. A. (2001). Enfermedad inflamatoria intestinal : Epidemiología y patogénesis. *Medigraphic*, *8*(3), 84–89.
- Roh, K.-B., Kim, H., Shin, S., Kim, Y.-S., Lee, J.-A., Kim, M. O., ... Park, D. (2016). Anti-inflammatory effects of *Zea mays* L. husk extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*(1), 298. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1284-9>
- Rosas-Castor, J. M., Guzmán-Mar, J. L., Hernández-Ramírez, A., Garza-González, M. T., & Hinojosa-Reyes, L. (2014). Arsenic accumulation in maize crop (*Zea mays*): A review. *Science of The Total Environment*, *488*(1), 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.075>
- Ross-Ibarra, J., Sawers, R., & Hufford, M. B. (2017). Maize Diversity and Climate Change. Retrieved September 24, 2017, from University of California website:

<http://escholarship.org/uc/item/9v4627sv#page-3>

- Salinas Moreno, Y., Gómez Montiel, N. O., Cervantes Martínez, J. E., Sierra Macías, M., Palafox Caballero, A., Betanzos Mendoza, E., & Coutiño Estrada, B. (2010). Calidad nixtamalera y tortillera en maíces del trópico húmedo y sub-húmedo de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(4), 509–523.
- Santiago-Ramos, D., Figueroa-Cárdenas, J. de D., Mariscal-Moreno, R. M., Escalante-Aburto, A., Ponce-García, N., & Véles-Medina, J. J. (2018). Physical and chemical changes undergone by pericarp and endosperm during corn nixtamalization-A review. *Journal of Cereal Science*, 81, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.04.003>
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.006>
- Secretaría de Educación Pública, M. (2010). Diario Oficial de la Federación. Retrieved November 5, 2017, from Secretaría de Educación Pública de México website: http://www.sep.gob.mx/work/models/sep1/Resource/635/1/images/acuerdolin_eamientos_sept.pdf
- Serna-Saldívar, S. O., Gómez, M. H., & Rooney, L. W. (1990). Technology, chemistry, and nutritional value of alkaline-cooked corn products. In *Advances in cereal science and technology (USA)* (pp. 243–307). St. Paul: American Association of Cereal Chemists.
- Shahidi, F., & Chandrasekara, A. (2017). Interaction of Phenolics and their Association with Dietary Fiber. In F. Hosseinian, B. D. Oomah, & R. Campos-Vega (Eds.), *Dietary fibre functionality in food and nutraceuticals. From plant to gut*. (First, pp. 21–44). Hoboken: Wiley-Blackwell.
- Shivappa, N. (2019). Diet and Chronic Diseases: Is There a Mediating Effect of Inflammation? *Nutrients*, 11(7), 1639. <https://doi.org/10.3390/nu11071639>
- Singh, A., & Sharma, S. (2017). Bioactive components and functional properties of biologically activated cereal grains: A bibliographic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14), 3051–3071.

- <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1085828>
- Singh, U. P., Singh, N. P., Murphy, E. A., Price, R. L., Fayad, R., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. S. (2016). Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. *Cytokine*, 77, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.10.008>
- Story, M., Kaphingst, K. M., Robinson-O'Brien, R., & Glanz, K. (2008). Creating Healthy Food and Eating Environments: Policy and Environmental Approaches. *Annual Review of Public Health*, 29(1), 253–272. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.29.020907.090926>
- Stuper-Szablewska, K., & Perkowski, J. (2019). Phenolic acids in cereal grain: Occurrence, biosynthesis, metabolism and role in living organisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(4), 664–675. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1387096>
- Suárez-Martínez, S. E., Ferriz-Martínez, R. A., Campos-Vega, R., Elton-Puente, J. E., De La Torre Carbot, K., & García-Gasca, T. (2016). Bean seeds: Leading nutraceutical source for human health. *CYTA - Journal of Food*, 14(1), 131–137. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1063548>
- Sun, M., Wu, W., Liu, Z., & Cong, Y. (2017). Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *Journal of Gastroenterology*, 52(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1242-9>
- Treviño-Mejía, D., Luna-Vital, D. A., Gaytán-Martínez, M., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2016). Fortification of Commercial Nixtamalized Maize (*Zea mays* L.) with Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Increased the Nutritional and Nutraceutical Content of Tortillas without Modifying Sensory Properties. *Journal of Food Quality*, 39(6), 569–579. <https://doi.org/10.1111/jfq.12251>
- Uhlig, H. H., & Powrie, F. (2018). Translating Immunology into Therapeutic Concepts for Inflammatory Bowel Disease. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 755–781. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053055>
- Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L., & Colombel, J. F. (2017). Ulcerative colitis. *The Lancet*, 389(10080), 1756–1770. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32126-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32126-2)

- Valdés, S. T., Coelho, C. M. M., Michelluti, D. J., & Tramonte, V. L. C. G. (2011). Association of genotype and preparation methods on the antioxidant activity, and antinutrients in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2104–2111. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.06.014>
- van de Veerdonk, F. L., Netea, M. G., Dinarello, C. A., & Joosten, L. A. B. (2011). Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends in Immunology*, 32(3), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.01.003>
- Vázquez-Carrillo, M. G., Santiago-Ramos, D., Salinas-Moreno, Y., López-Cruz, J., Ybarra-Moncada, M. C., & Ortega-Corona, A. (2014). Genotipos de maíz (*Zea mays* L.) con diferente contenido de aceite y su relación con la calidad y textura de la tortilla. *Agrociencia*, 48(2), 159–172.
- Vergara-Castañeda, H. A., Guevara-González, R. G., Ramos-Gómez, M., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Maldonado, H., Feregrino-Pérez, A. A., ... Loarca-Piña, G. (2010). Non-digestible fraction of cooked bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Bayo Madero suppresses colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-induced rats. *Food & Function*, 1(3), 294–300. <https://doi.org/10.1039/c0fo00130a>
- von Mering, C., Jensen, L. J., Kuhn, M., Chaffron, S., Doerks, T., Krüger, B., ... Bork, P. (2007). STRING 7 - Recent developments in the integration and prediction of protein interactions. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL. 1), 358–362. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl825>
- Wang, Dantong, Van Der Horst, K., Jacquier, E. F., Afeiche, M. C., & Eldridge, A. L. (2018). Snacking patterns in children: A comparison between Australia, China, Mexico, and the US. *Nutrients*, 10(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu10020198>
- Wang, Dingzhi, DuBois, R. N., & Richmond, A. (2009). The role of chemokines in intestinal inflammation and cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(6), 688–696. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.08.003>
- Wang, X., He, G., Peng, Y., Zhong, W., Wang, Y., & Zhang, B. (2015). Sodium butyrate alleviates adipocyte inflammation by inhibiting NLRP3 pathway.

Scientific Reports, 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep12676>

Xiang, M. S., Tan, J. K., & Macia, L. (2018). Fatty Acids, Gut Bacteria, and Immune Cell Function. In V. B. Patel (Ed.), *The Molecular Nutrition of Fats*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811297-7.00011-1>

Yamamoto Furusho, J. K. (2015). La epidemiología cambiante de la EII y su relevancia en latinoamérica. In A. M. de Gastroenterología (Ed.), *Gastrotrilogía V “Rompiendo paradigmas en el diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal”* (First, pp. 44–50). Retrieved from <https://www.gastro.org.mx/wp-content/uploads/2015/06/Gastro-trilogia-V.compressed-1.pdf>

Youm, Y. H., Nguyen, K. Y., Grant, R. W., Goldberg, E. L., Bodogai, M., Kim, D., ... Dixit, V. D. (2015). The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nature Medicine*, 21(3), 263–269. <https://doi.org/10.1038/nm.3804>

Zamora-Gasga, V. M., Loarca-Piña, G., Vázquez-Landaverde, P. A., Ortiz-Basurto, R. I., Tovar, J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015). In vitro colonic fermentation of food ingredients isolated from Agave tequilana Weber var. azul applied on granola bars. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 766–772. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.032>

Zhang, C., Monk, J. M., Lu, J. T., Zarepoor, L., Wu, W., Liu, R., ... Power, K. A. (2014). Cooked navy and black bean diets improve biomarkers of colon health and reduce inflammation during colitis. *British Journal of Nutrition*, 111(09), 1549–1563. <https://doi.org/10.1017/S0007114513004352>

Zhao, G., Nyman, M., & Jönsson, J. Å. (2006). Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomedical Chromatography*, 20(8), 674–682. <https://doi.org/10.1002/bmc.580>

Dirección General de Bibliotecas UAQ

X. ANEXO I

X.1 Manejo y manipulación de animales

Para este trabajo experimental se emplearon ratones machos de la cepa CD1, de 6 semanas de edad con un peso de 22 ± 2 g, los cuales fueron adquiridos del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla, con Registro SAGARPA-SENASICA No. AUT-B-C-0815-024.

Los animales se alojaron en jaulas (187 cm^2 de ancho y 18 cm de alto) de acero inoxidable (4 animales por jaula), las cuales permitieron la entrada de aire y luz. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad ($50 \pm 10 \%$), con ciclos día/noche de 12/12 h, así como temperatura adecuada ($23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) y ventilación constante. Se realizaron lavados con hipoclorito de cada canastilla cada tercer día, así como de todo el material que estuvo en contacto con los animales. Los animales se mantuvieron durante todo el experimento en las jaulas anteriormente mencionadas y fueron identificados por medio de una marca con colorante en la cola, lo cual no ha sido reportado que cause toxicidad en roedores.

El M en C. Iván Andrés Luzardo fue el encargado de la alimentación, limpieza y cuidado de los animales, también se encargó de realizar el lavado de bebederos, comederos, pisos y charolas de recolección, y estos procesos los realizarán de acuerdo a la NOM-O62-Z00-1999.

De igual manera para la manipulación de los animales durante el trabajo experimental, se siguieron las especificaciones de la NOM-O62-200-199 en su apartado 10.4 que indica que se debe usar guantes, cubre bocas y bata mientras se estuvo en contacto con los animales. El tiempo estimado del trabajo con los animales fue de tres meses (julio a septiembre de 2017)

X.2 Características de las dietas y administración de tratamientos

Para la implementación del modelo de colitis con DSS, se utilizaron 30 ratones de la cepa CD1 divididos en 5 grupos con n=6 (grupo 1: control; grupo 2: 1% DSS; grupo 3: 1.5% DSS; grupo 4: 2.5% DSS). Todos los ratones fueron alimentados con dieta estándar (Rodent Lab Chow 5001, Nupec®) la cual tiene una composición de 28% de proteína, 58% de carbohidratos y 13% de grasa. Después de una semana de aclimatación, en el día cero de experimentación se les administró, como dosis de iniciación de colitis, DSS a cada una de las concentraciones indicadas, en una sola dosis vía intraperitoneal (*i.p*), ésta dosis fue elegida con base en estudios previos donde se ha reportado una incidencia de colitis con daño severo a mucosa colónica (Monk *et al.*, 2015; Monk *et al.*, 2016). Se realizó la limpieza de la materia fecal a las 24 y 48 horas después de la inducción del cáncer. Al día 7, 21 y 28 de experimentación dependiendo de cada grupo se les administró DSS en el agua de beber como promotor de inflamación en concentraciones ya indicadas.

Para realizar la evaluación del efecto quimioprotector de la botana horneada, se emplearon 56 ratones de la cepa CD1, los cuales fueron divididos en 7 grupos con n=8 (grupo 1: Control sano; grupo 2: Control inducido; grupo 3: Control con antiinflamatorio; grupo 4: 0.5 g botana; grupo 5: 1.0 g botana; grupo 6: 1.5 g botana; grupo 7: 2.5 g botana). Los animales fueron alimentados con botana y dieta basal (Rodent Lab Chow 5001, Nupec®). La botana fue suministrada a los animales en las dosificaciones indicadas siguiendo las buenas prácticas de manufactura.

X.3 Justificación de la selección del modelo

La cepa de ratón CD1 ha sido previamente utilizada en la evaluación de compuestos con capacidad quimioprotectora en modelos de colitis inducida por DSS. Es importante señalar que el uso de animales con cáncer inducido ha permitido evidenciar la capacidad de algunos componentes de los alimentos para alterar rutas de carcinogénesis, por lo que emplear este tipo de modelo es de gran

relevancia para el presente estudio. El número mínimo para realizar el estudio es de 8 animales por grupo, sin embargo, un mayor número de animales permitirá tener una menor variabilidad y una mayor confianza estadística.

X.4 Monitoreo de conducta

Durante todo el experimento, se llevará a cabo el monitoreo de conducta de los animales. Se realizarán mediciones semanales de consumo de agua, alimento y peso corporal. Para el registro del peso corporal, se sujetará la cola del animal entre el pulgar y el dedo índice, y se levantará para depositarla en el canasto para roedores de la balanza. Se realizarán movimientos lentos para evitar el estrés y lastimar al animal. También se realizará el monitoreo del número de veces de defecación y la evaluación de presencia/ausencia de sangre en heces.

X.5 Condiciones de sacrificio

Administración de anestesia: Al finalizar el experimento, los animales serán anestesiados con cámara de dióxido de carbono, el cual tiene la propiedad de ser anestésico, ya que disminuye la tensión de oxígeno que conduce a la somnolencia en pocos minutos (método descrito por la norma NOM-062-ZOO-1999, punto 9.4.1.3.3). Cuando el animal estuvo perfectamente anestesiado, se realizó una toma de muestra de sangre del corazón por punción. Una vez que se tomó la muestra, se realizó un corte de la vena porta para asegurar la muerte clínica con tijeras quirúrgicas esterilizadas (en acuerdo a la norma NOM-062-ZOO-1999, punto 9).

X.6 Recolección de muestras biológicas

Posteriormente se realizó una incisión con bisturí esterilizado desde el tórax hasta el ano separando la piel y el músculo para tener acceso a las vísceras abdominales. Se extrajo intestino delgado, colon, hígado, y riñones, los cuales, posteriormente fueron lavados con solución fisiológica. Parte de las muestras obtenidas se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenarán a -70 °C para estudios moleculares y otra parte se fijará con formaldehído al 4% en solución amortiguadora de sales (PBS) para los estudios histopatológicos. Esta técnica garantiza la seguridad del personal y la integridad del animal (NOM-062-ZOO-1999, punto 9.4.1.3).

X.7 Desecho de animales y material quirúrgico

Los desechos se almacenaron en bolsas color amarillo (cadáveres) o rojo (residuos peligrosos), cuidando de no rebasar el 80% de su capacidad en un congelador (temperatura máxima 4 °C), las bolsas se marcaron con la leyenda “desechos patológicos”, éstas fueron almacenadas en un periodo máximo de 15 días hasta su debido transporte e incineración, los cuales estuvieron a cargo de la empresa Planta Incineradora de Residuos Bio-Infecciosos S.A. de C.V. procedimiento establecido en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

X.8 Referencias Anexo 1

- Monk, J. M., Zhang, C. P., Wu, W., Zarepoor, L., Lu, J. T., Liu, R., . Power, K. A. (2015). White and dark kidney beans reduce colonic mucosal damage and inflammation in response to dextrin sodium sulfate. *Journal of Nutritional Biochemistry*(26), 752-760.
- Monk, J., Lepp, D., Zhang, C., Wu, W., Zarepoor, L., Lu, J., Pauls, K. P., Tsao, R., Wood. G., Robinson, L. & Power, K. (2016). Diets enriched with cranberry beans alter the microbiota and mitigate colitis severity and associated inflammation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 28, 129 - 139

Norma Oficial Mexicana (1999). NOM-062-zOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Norma Oficial Mexicana (2002). NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológico-infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo.

Shi, N., Clinton, S. K., Liu, Z., Wang, Y., Riedl, K. M., & Chen, T. (2015). Strawberry phytochemicals inhibit azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced colorectal carcinogenesis in Crj: CD-1 mice. *Nutrients*, 7(3), 1696-1715.

Zhang, L. (2011). Voluntary oral administration of drugs in mice. *Protoc. Exch*, 1-11.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.