



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LOS POLISACÁRIDOS DE FRIJOL COMÚN
(*Phaseolus vulgaris* L.) VARIEDAD NEGRO 8025 SOBRE LOS
NIVELES LIPÍDICOS EN ETAPAS TEMPRANAS DE CÁNCER DE
COLON INDUCIDO QUÍMICAMENTE”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ANA ABIGAIL MENDOZA VEGA.

DIRIGIDA POR

Dra. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA.

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2010

**BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

No. Adq. H73597

Clas. TS

616.99447

M539e



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LOS POLISACÁRIDOS DE FRIJOL COMÚN
(*Phaseolus vulgaris* L.) VARIEDAD NEGRO 8025 SOBRE LOS
NIVELES LIPÍDICOS EN ETAPAS TEMPRANAS DE CÁNCER DE
COLON INDUCIDO QUÍMICAMENTE”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ANA ABIGAIL MENDOZA VEGA.

DIRIGIDA POR

Dra. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA.

SINODALES

Dra. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA _____
DIRECTORA

Dra. ANA ANGÉLICA FERREGRINO PÉREZ _____
SINODAL

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA _____
SINODAL

Dra. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ _____
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	3
II.1.1 Generalidades	3
II.1.2 Componentes del frijol	3
II.1.2.1 Componentes bioactivos del frijol	5
II.1.2.2 Compuestos prebióticos	7
II.1.2.2.1 Definición de compuestos prebióticos	7
II.1.2.3 Polisacáridos	8
II.1.2.3.1 Fibra dietética	8
II.1.2.3.2 Oligosacáridos	10
II.1.2.3.3 Almidón resistente	11
II.2 Fermentación colónica de la fibra	12
II.2.1 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	12
II.3 Lípidos	14
II.3.1 Generalidades	14
II.3.2 Colesterol	15
II.3.3 Lipoproteínas	15
II.3.3.1 Generalidades	15
II.3.3.2 Lipoproteínas de baja densidad (LDL)	15
II.3.3.3 Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	17
II.3.4 Triacilglicéridos (TAG)	17
II.3.5 Transporte de lípidos	17
II.3.6 Importancia del perfil lipídico	19

II.4 Cáncer	21
II.4.1 Generalidades	21
II.4.2 Cáncer de colon	22
II.4.2.1 Función y estructura del colon	22
II.4.2.1.1 Células normales del epitelio colónico	23
II.4.3 Carcinogénesis de cáncer de colon	24
II.4.3.1 Factores de riesgo	25
II.4.4 Modelos animales de cáncer de colon.	27
II.4.4.1 Azoximetano (AOM)	27
II.4.4.1.1 Mecanismo de acción de AOM	28
III. HIPÓTESIS	30
IV. OBJETIVOS	31
IV.1 General	31
IV.2 Específicos	31
V. METODOLOGÍA	32
V.1 Materiales	32
V.1.1 Compuestos químicos	32
V.1.2 Material biológico	32
V.2 Métodos	33
V.2.1 Bioensayo	33
V.2.2 Cocción	33
V.2.3 Extracción de polisacáridos	34
V.2.4 Obtención de suero de rata	35
V.2.5 Determinación de colesterol total	35
V.2.6 Determinación de lipoproteínas de alta densidad (HDL)	36
V.2.7 Determinación de lipoproteínas de baja densidad (LDL)	36
V.2.8 Determinación de Triacilglicéridos (TAG)	37
V.2.9 Expresión de proteína IL-6	38
V.2.9.1 Extracción de proteína	38
V.2.9.2 Cuantificación de proteínas totales	38

V.2.9.3	Análisis de Western Blot	39
V.2.9.3.1	Electroforesis SDS-PAGE	39
V.2.9.3.2	Inmunoblot	40
V.2.10	Análisis estadístico	40
VI.	RESULTADOS	41
VI.1	Consumo de agua y alimento	41
VI.1.1	Ganancia de peso	42
VI.2	Efecto del consumo de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y su EP sobre el perfil lipídico en el suero de ratas	42
VI.2.1	Niveles de colesterol	42
VI.2.2	Niveles de triacilglicéridos (TAG)	43
VI.2.3	Niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL)	43
VI.2.4	Niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL)	45
VI.3	Efecto del consumo de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y su EP sobre la expresión de interleucina 6 (IL-6)	45
VII.	DISCUSIÓN	48
VII.1	Ganancia de peso	48
VII.2	Efecto del consumo de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y su EP sobre el perfil lipídico en el suero de ratas	48
VII.2.1	Niveles de colesterol	48
VII.2.2	Niveles de triacilglicéridos (TAG)	49
VII.2.3	Niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL)	50
VII.2.4	Niveles de lipoproteína de baja densidad (LDL)	50
VII.3	Efecto del consumo de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y su EP sobre la expresión de interleucina 6 (IL-6)	52
VIII.	CONCLUSIÓN	53
IX.	BLIBLIOGRAFÍA	54
	ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición del frijol	4
2	Caracterización de carbohidratos de frijol negro cocido	6
3	Mezcla de reactivos para la cuantificación de colesterol total	35
4	Mezcla de reactivos para la cuantificación de lipoproteínas HDL	36
5	Mezcla de reactivos para la cuantificación de lipoproteínas LDL	37
6	Mezcla de reactivos para la cuantificación de TAG	38
7	Mezcla de reactivos para la concentración de geles de SDS-PAGE	40
8	Consumo de agua y alimento en los diferentes tratamientos	41
9	Ganancia de peso en los diferentes tratamientos	42
10	Efecto del consumo de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y su EP sobre el perfil lipídico en suero de ratas	46
11	Influencia de los tratamientos sobre la expresión de Interleucina IL-6, de la porción distal de colon	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación de la fibra dietética	9
2	Fermentación bacteriana	13
3	Estructura general de una lipoproteína	16
4	Clasificación de las lipoproteínas	16
5	Esquema del metabolismo de los lípidos vía exógena	18
6	Esquema del metabolismo de los lípidos vía endógena	19
7	Anatomía del colon	22
8	Morfología del epitelio colónico normal	23
9	Desarrollo del cáncer del epitelio colónico normal	24
10	Patogénesis de cáncer de colon	26
11	Mecanismo de acción del azoximetano	29
12	Grupos de experimentación	34
13	Efecto del consumo de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y su EP sobre los niveles de colesterol	43
14	Efecto del consumo de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y su EP sobre los niveles de TAG	44
15	Efecto del consumo de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y su EP sobre los niveles de HDL	44
16	Efecto del consumo de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y su EP sobre los niveles de LDL	45
17	Expresión de interleucina IL-6 en la porción distal del colon	46

RESUMEN

El cáncer de colon es uno de los principales tipos de cáncer que contribuyen a la mortalidad a nivel mundial. El consumo de prebióticos se ha relacionado con efectos benéficos, ya que éstos llegan al colon generando gases y ácidos grasos de cadena corta (AGCC). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del frijol común cocido (FC) (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025 y su extracto de polisacáridos (EP), sobre los niveles lipídicos en un modelo de cáncer de colon inducido químicamente con azoximetano (AOM), mediante la cuantificación de colesterol total (CT), triglicéridos (TG), lipoproteínas HDL y lipoproteínas LDL. La mayor concentración de colesterol y de triacilglicéridos (TAG) lo presentó el grupo de tratamiento AOM + EP (97.98 ± 1.66 mg/dl y 44.12 ± 0.77 mg/dl, respectivamente), mientras que los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) se disminuyeron considerablemente en este grupo (3.16 ± 0.27 mg/dl) comparado con el control (6.52 ± 0.43 mg/dl). Los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) disminuyeron en los grupos de tratamiento de FC y EP (45.00 ± 1.38 mg/dl y 43.07 ± 0.93 mg/dl respectivamente). También la expresión de IL-6, mostró diferencia estadística en los grupos de AOM + FC ($57.78 \pm 2.1\%$) y AOM + EP ($92.38 \pm 2.3\%$), en intensidad de pixeles respecto al control ($100 \pm 2.8\%$). Los resultados sugieren que el FC y EP decrecen los niveles de LDL, en cáncer de colon por la posible acción de los carbohidratos no glicémicos fermentables en el intestino grueso.

I INTRODUCCIÓN

El organismo está continuamente expuesto a factores que incrementan el riesgo de sufrir algún tipo de cáncer. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer fue la primera causa de mortalidad a nivel mundial en el 2007, en donde la mayor parte de la mortalidad anual obedece a cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. En México el cáncer fue la tercera causa de muerte, representó el 12.9 % del total de fallecimientos registrado en el 2006 por el Instituto Nacional de Estadísticas, Geografía e Informática (INEGI) tanto en hombres como en mujeres. Uno de los principales tipos de cáncer que contribuyen a la mortalidad general anual es el cáncer de colon, el cual, es uno de los tumores más frecuentes, ocupando el tercer lugar a nivel mundial con más de 677, 000 muertes anuales en todo el mundo en el 2007 (OMS), mientras que en México representó el 5 % y el 4.6 % en hombres y mujeres respectivamente del total de los fallecimientos por tumores malignos en los datos reportados por el INEGI en el 2008. Se ha informado que el cáncer de colon se atribuye a la acción de factores dietéticos, genéticos, ambientales y/o relacionados con el estilo de vida y presenta una mayor prevalencia en los países que tienen una dieta de tipo occidental que incluye una alimentación rica en carne, grasa animal e hidratos de carbono refinado y pobre en fibra.

La grasa de la dieta aumenta la concentración en sangre de colesterol: Este es una biomolécula de gran importancia bioquímica por su amplia distribución en el organismo ya que es precursor de una gran cantidad de esteroides, entre los cuales se incluyen ácidos biliares, hormonas corticosuprarrenales, hormonas sexuales, vitamina D, glucósidos cardiacos y además forma parte de la composición de la membrana plasmática, y lipoproteínas plasmáticas. Las lipoproteínas juegan un papel muy importante en el metabolismo del colesterol y una concentración fuera de los intervalos de referencia de éstas en la circulación sanguínea, puede ocasionar un tipo de dislipidemia (alteración en el metabolismo de lípidos), como puede ser el descenso en los niveles de lipoproteínas de alta

densidad (HDL, por sus siglas en inglés) y aumento de lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés), que, acompañados de una hipertrigliceridemia representa una dislipidemia de carácter aterogénico. Así, el mantenimiento homeostático de los lípidos sanguíneos (colesterol total (CT), triglicéridos (TG), HDL y LDL) es importante, ya que el desequilibrio de éste puede originar o acelerar el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas como la aterosclerosis, obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Datos de la literatura informan que el cáncer de colon puede deberse a un incremento del colesterol en sangre. También se ha informado que un incremento en la síntesis del colesterol a nivel local (colon) o sistémico (por parte del hígado) puede incrementar el riesgo y desarrollo acelerado del cáncer de colon.

El frijol representa un alimento importante en la dieta de la población mexicana aportando cantidades apreciables de proteínas y carbohidratos, siendo éstos últimos a los que se ha atribuido la función prebiótica, en especial a la fracción indigestible de polisacáridos.

Por lo anterior, en el presente trabajo se realizó un perfil lipídico que incluyó la determinación de CT, TG, HDL y LDL en un modelo de cáncer de colon inducido químicamente el cual nos permitió establecer una relación entre los niveles de dicho perfil y el cáncer de colon en etapas tempranas, así como la posible quimioprotección de una dieta rica en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Negro 8025 y su extracto de polisacáridos a un estado de inflamación en este tipo de cáncer mediante la determinación de la expresión de interleucina IL-6.

II ANTECEDENTES

II.1 Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

II.1.1 Generalidades

Uno de los principales componentes en la dieta para gran parte de las poblaciones de países en vías de desarrollo son las leguminosas, debido a que son una fuente rica y económica de proteínas y calorías (Rehman y col., 2001). En México el frijol representa hasta el 15% de la dieta normal (Osorio-Díaz y col., 2004).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), pertenece a la familia Leguminosae, es un alimento básico en la dieta muchos países de América Latina, Oriente, Sur y los países africanos (Aggarwal y col., 2004). México, como parte de Mesoamérica, es considerado como uno de los centros de origen más importantes de varios tipos de frijol, entre los que destaca por su valor comercial *Phaseolus vulgaris* L., especie donde se encuentra el frijol negro (Salinas-Moreno y col., 2005) el cual representa cerca de 22% de frijol producido y se siembra en casi todas las regiones productoras, aunque se consume principalmente en el Altiplano del centro y sureste de México (Rosales y col., 2003). Para el 2008, se estimó el consumo rural per cápita anual del frijol de 12 Kg (SAGARPA, 2009).

II.1.2 Componentes del frijol

El frijol, además de ser una buena fuente de proteínas y carbohidratos, es rico en fibra dietética, tanto soluble como insoluble, se le considera una buena fuente de vitaminas (Cuadro1), así como de algunos minerales y de grasas no saturadas (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998).

El tratamiento térmico puede tener efectos diferentes en el contenido de fibra dietética en los alimentos, ya que la cocción promueve el rompimiento de sus componentes, además de propiciar la interacción y enlace de éstas con proteínas y

lípidos, generación de cambios cualitativos y/o cuantitativos que varían la composición total de la fibra dietética al comparar el alimento crudo con el cocido. Dichos cambios en las leguminosas favorecen la biodisponibilidad de la fibra dietética (González, 2000).

Cuadro 1. Composición del frijol (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998).

Componente	Composición
Proteína	16-33
Fibra dietética (%)	
Frijol crudo	
Fibra insoluble	0.1-13.1
Fibra soluble	3.3-7.6
Frijol cocinado	
Fibra insoluble	13.4-22.9
Fibra soluble	3.1-7.0
Ácidos grasos (g/100g)	
Linoléico	21-28
Linolénico	37-54
Vitaminas (mg/100g)	
Ácido fólico	22-28
Niacina	1.16-2.68
Riboflavina	0.14-0.27
Tiamina	0.9-1.2
Acido fítico (mg/g)	22-28
Taninos (mg cat. eq/mg)	9.6-131.4
Inhibidores de tripsina	13-29
Oligosacáridos (g/100g)	
Rafinosa	0.19-0.22
Estaquiosa	1.84-2.45

El frijol contiene varios componentes hidrocarbonados no glicémicos (resisten la acción de la α -amilasa digestiva): almidón resistente, polisacáridos de la fracción de fibra dietética y oligosacáridos no digestibles (Goñi y Martin-Carron, 2003). El conjunto representa el 57.65% de la materia seca del alimento cocinado, siendo la cáscara de mayor contenido de polisacáridos celulósicos estructurales (58.7% a 65%) y lignina (1.4% a 1.9%) (Srisuma y col., 1991). En el Cuadro 2 se muestra el contenido de carbohidratos del frijol negro cocido, teniendo en cuenta su naturaleza de glicémicos y no glicémicos, según la clasificación establecida por FAO/OMS en 1998 (Serrano y Goñi, 2004).

Como se indica en el Cuadro 2, el frijol negro cocido contiene un 4.5% de fibra dietética soluble y 22.6% de fibra dietética insoluble (Herrera y col., 1998), sin embargo para el cultivar Negro 8025 Feregrino-Pérez y col. (2008), informaron que el contenido de fibra soluble fue de 6% e insoluble de 20% dentro de la cual 30.8% es almidón resistente. En la fracción de fibra dietética total se incluyen los componentes propios de la fibra (polisacáridos no amiláceos y lignina) y otros compuestos asociados de naturaleza no hidrocarbonada tales como taninos, proteína fitatos. Todos estos componentes junto con almidón resistente, oligosacáridos no digestibles y otros componentes de los frijoles, no son digeridos en el intestino delgado y constituyen la fracción indigestible del alimento, los cuales pueden ser fermentados por la microflora colónica (Saura-Calixto y col., 2000).

II.1.2.1 Componentes bioactivos del frijol

Los frijoles contienen varios componentes bioactivos que podrían ser responsables de los efectos preventivos de cáncer de colon (Serrano y Goñi, 2004), entre los que se pueden citar: fibra dietética, almidón resistente y oligosacáridos no digestibles, y estos se han relacionado con la síntesis de ácidos grasos de cadena corta producidos por la fermentación colónica (Finley y col., 2007). Cada grano de materia orgánica de frijol produce aproximadamente 7.24 mmol de AGCC con un perfil de fermentación Acético: Propiónico: Butírico de 71: 12: 17 (Bednar y col.,

2001), mientras que para el frijol *P. vulgaris* variedad Negro 8025, Feregrino-Pérez y col. (2008), reportaron una proporción de 79: 12: 9 para los mismos ácidos. Las diferencias podrían atribuirse a que se trata de diferentes variedades.

Otros componentes bioactivos del frijol, además de la fibra, son el ácido fólico, magnesio, aminoácidos azufrados, taninos condensados, fitoestrógenos y aminoácidos no esenciales, los cuales contribuyen a la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, la diabetes y el cáncer (Rodríguez-Castillo y Fernández-Rojas, 2003).

Cuadro 2. Caracterización de carbohidratos de frijol negro cocido
(Serrano y Goñi, 2004).

Componentes	(% materia seca)	Referencia
Carbohidratos glicémicos		
Glucosa libre	0.1	Bednar y col., 2001
Almidón total	42.9	Bednar y col., 2001
Almidón rápidamente digerible	7.5	Bednar y col., 2001
Almidón lentamente digerible	8.4	Bednar y col., 2001
Índice glucémico (pan blanco como referencia)	28	Foster y col., 2002
Carbohidratos no glicémicos		
Fibra dietética total	27.0	Herrera y col., 1998
Fibra soluble	4.5	Herrera y col., 1998
Fibra insoluble	22.6	Herrera y col., 1998
Almidón resistente	26.9	Bednar y col., 2001
Oligosacáridos no digestibles		
Rafinosa	0.40	Costa y col., 2001
Estaquiosa	3.23	Costa y col., 2001
Verbascosa	0.12	Costa y col., 2001

Se ha informado el consumo de frijol mejora los niveles de colesterol sanguíneo y la respuesta glicémica, efectos proporcionados por los carbohidratos no glicémicos fermentables en el intestino grueso, tales como la fibra dietética, almidón resistente, oligosacáridos no digestibles, los cuales se han considerado como compuestos prebióticos (Serrano y Goñi, 2004).

II.1.2.2 Compuestos prebióticos

II.1.2.2.1 Definición de compuestos prebióticos

Los prebióticos se definieron en 1995 como ingredientes alimentarios no digeribles que afectan de manera benéfica al hospedador estimulando el crecimiento o la actividad de una o varias bacterias del colon (ácido lácticas y bifidobacterias), y por tanto mejoran la salud (Moral y col., 2003). Los criterios para definir un prebiótico serán por tanto: resistencia a la digestión en intestino delgado, hidrólisis y fermentación por la microflora colónica y estimulación selectiva del crecimiento de bacterias benéficas en el colon (Roberfroid, 2001). Se ha demostrado que la proliferación de bacterias benéficas (ácido lácticas y bifidobacterias) mediante la fermentación de carbohidratos no digeribles, puede inhibir la colonización del intestino por patógenos, ejerciendo un efecto protector hacia los desórdenes intestinales agudos o crónicos. La fermentación de los prebióticos puede promover algunas funciones fisiológicas específicas a través de la liberación de metabolitos de las bacterias en especial de los AGCC (acético, propiónico, butírico y láctico, entre otros) al lumen intestinal (Moral y col., 2003), los cuales pueden actuar directa o indirectamente (mediante la modificación del pH) sobre las células intestinales y pueden participar en el control de varios procesos como la proliferación mucosal, la inflamación, la eliminación de compuestos nitrogenados, la absorción de minerales, la carcinogénesis de colon (Murphy, 2001), y debido a que muchos prebióticos comparten las propiedades fisiológicas de la fibra de la dieta, los estudios se han destinado a analizar su posible influencia sobre el metabolismo lipídico (Delzenne y Kok, 2001).

Las sustancias mejor estudiadas como prebióticos son los polisacáridos de origen vegetal, los oligosacáridos y glicoconjugados de la leche (Ferrer y Dalmau, 2001), siendo los oligosacáridos y los polisacáridos el grupo de sustratos fermentables más abundantes (Wong y col., 2006).

II.1.2.3 Polisacáridos

Los polisacáridos son todos los polímeros de hidratos de carbono que contienen al menos 20 residuos de monosacáridos. Dentro de este tipo de carbohidratos se encuentran la celulosa, los β -glucanos, hemicelulosas, pectinas y análogos, gomas y mucílagos.

Los polisacáridos pueden ser divididos en tres grandes categorías en cuanto a su efecto beneficioso sobre el organismo: prebióticos, que desempeñan un papel similar al de los probióticos (de acción correspondiente); la grasa-imitación, que sustituyen la grasa en los productos (acción indirecta) y fibras dietéticas con propiedades fisiológicas directas (acción directa) (Warrand, 2006).

Feregrino-Pérez y col. (2008), reportaron el contenido de polisacáridos en el frijol *P. vulgaris* L. Negro 8025 de 57.5% del peso seco del grano, porcentaje dentro del cual se encuentra la fibra dietética.

II.1.2.3.1 Fibra dietética

Las fibras son sustancias de origen vegetal, hidratos de carbono o derivados de los mismos, excepto la lignina, que resisten la hidrólisis por enzimas digestivas humanas y llegan intactos al colon, donde algunos pueden ser hidrolizados y fermentados por la flora colónica (Escudero y González, 2006). En la Figura 1 se muestra una clasificación de la fibra dietética.



Figura 1. Clasificación de la fibra dietética (Ha y col., 2000).

La fibra también se puede clasificar como soluble e insoluble. En base al grado de digestión o fermentación en el colon, la fibra soluble es aquella que es fermentada totalmente por el colon, en cambio, la fibra insoluble solo sufre una fermentación parcial en el mismo (García y Álvarez, 2000).

Las fuentes de fibra insoluble (y de fermentación lenta) son generalmente reconocidas como los mejores agonistas protectores de cáncer de colon, y los cereales y leguminosas ofrecen las mejores fuentes de ese tipo de fibra en la dieta (Marquart y col., 2002). Este tipo de fibra puede disminuir el paso de colesterol y grasa dentro del colon, durante la fermentación microbiana activa. El colesterol puede contribuir a incrementar el riesgo del cáncer como un resultado del metabolismo bacteriano de las grasas y proteínas tóxicas/metabolitos mutagénicos (ej., diacilgliceroles (DAG), ácidos biliares secundarios y ácidos grasos libres). Así, un alto contenido de fibra en los alimentos se ha considerado tradicionalmente como protector frente al cáncer de colon (Casimiro, 2002), y puede atribuirse a diversos mecanismos como: el aumento de materia fecal, vinculantes tóxicos/metabolitos mutagénicos, reducción de pH fecal, alterando la fermentación

bacteriana, producción de AGCC y prevención de resistencia a la insulina (Marquart y col., 2002).

Cabe señalar que el contenido de fibra dietética total en el frijol *P.vulgaris* L. Negro 8025 es de 26%, de acuerdo con lo reportado por Feregrino-Pérez y col. (2008), dentro del cual se encuentran los oligosacáridos resistentes, uno de los principales componentes de este tipo de fibra.

II.1.2.3.2 Oligosacáridos

Estos son los hidratos de carbono con un menor nivel de polimerización, entre 3 y 10 moléculas de monosacáridos. Están divididos en fructo-oligosacáridos (FOS) e inulina, galacto-oligosacáridos (GOS), xilo-oligosacáridos (XOS) e isomalto-oligosacáridos (IMOS). Se ha demostrado que tanto los FOS como la inulina resisten las enzimas digestivas humanas y se fermentan en el colon (García y col., 2002); Además, se ha demostrado que la administración de este tipo de carbohidratos puede modificar la composición de la flora y, en algunos casos, sus potenciales efectos beneficiosos en nutrición, como por ejemplo, en la mejora de la absorción de minerales y en la reducción de los niveles séricos de colesterol (Sanz y col., 2004). Los GOS son el tipo de oligosacáridos presentes en el frijol, tales como la rafinosa, estaquiosa y verbascosa (Serrano y Goñi, 2004).

A pesar de los efectos beneficiosos de los oligosacáridos, es necesario reconocer los problemas de digestibilidad y flatulencia que, algunos individuos presentan al consumir frijoles y que podrían limitar el consumo (Rodríguez-Castillo y Fernández-Rojas, 2003), dichos problemas son ocasionados por los oligosacáridos no digestibles (rafinosa y estaquiosa), que son fermentados en el colon por bacterias y producen hidrógeno, metano y dióxido de carbono (Messina,1999), aún cuando esos mismos oligosacáridos favorecen el crecimiento de bifidobacterias, que se ha demostrado disminuyen el riesgo de cáncer de colon (Sanders, 1999).

Otro componente importante de la fibra dietética es el almidón resistente, que también se encuentra en el frijol en cantidades apreciables (Osorio-Díaz y col., 2004).

II.1.2.3.3 Almidón resistente

Entre los carbohidratos presentes en las leguminosas destaca el almidón, constituyente que puede representar hasta el 40% del peso seco de la semilla (Osorio-Díaz y col., 2004). El almidón es a menudo presentado con la fibra de cereal y puede no estar disponible para la digestión en el intestino delgado porque es físicamente indisponible al ser resistente a la enzima amilasa intestinal. Tales almidones son llamados resistentes y pueden comportarse como fibra soluble una vez que entra en el colon, convirtiéndose en una buena fuente de AGCC cuando es fermentado por la bacteria residente (Marquart y col., 2002).

El almidón resistente está dividido en cuatro grupos: tipo 1 (atrapado) que se encuentra en los granos de cascarilla y leguminosas; tipo 2 (cristalizado) que no puede ser atacado por vía enzimática si no se convierte primero en un gel, sus fuentes son: la papa cruda, plátano verde, y harina de maíz; tipo 3 (retrogrado) el cual va cambiando su conformación en caliente o frío. Por el calentamiento del almidón en presencia de agua, existe una distorsión de las cadenas de polisacáridos adquiriendo una conformación al azar, este proceso se denomina gelatinización. Con la refrigeración, se inicia un proceso de cristalización, denominado retrogradación. Este fenómeno es el responsable, por ejemplo, del endurecimiento del pan. Sus fuentes son el pan, copos de cereales, la papa hervida y enfriada, y los alimentos pre-cocinados. Finalmente el almidón tipo 4 (modificado), el cual es química e industrialmente modificado. Se encuentra en alimentos procesados tales como pasteles, condimentos industriales, y alimentos pediátricos (Escudero y González, 2006).

En la caracterización realizada por Feregrino-Pérez y col. (2008), para el frijol *P. vulgaris* L., cocido variedad Negro 8025, se reportó un contenido de 30.8% de almidón resistente. Cabe destacar que el almidón resistente se comporta en el colon como un importante sustrato para la fermentación bacteriana colónica (Escudero y González, 2006).

II.2 Fermentación colónica de la fibra

En los últimos años cada vez se considera al colon como un órgano central de la digestión. En él tiene lugar la fermentación bacteriana de aquellos sustratos, fundamentalmente hidratos de carbono, que escapan de la digestión por los enzimas de individuos monogástricos en el intestino delgado. De ellos, la fibra ocupa un lugar preferente. Como resultado de esa fermentación colónica se producen AGCC, con funciones importantes a nivel del colon (disminución del pH, efecto trófico, producción de energía, etc.), y a nivel sistémico, (metabolismo lipídico, glucémico, etc.). No más importantes que éstas, son los efectos que a nivel de proliferación bacteriana produce ese mismo metabolismo colónico de la fibra y que le confiere a ésta efectos prebióticos.

La fermentación colónica de la fibra produce energía y su valor oscila entre 1 y 2.5 cal/g, considerando que el valor energético de la fibra dependerá de su grado de fermentabilidad.

II.2.1 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Los AGCC se generan en el metabolismo del ácido pirúvico producido por la oxidación de la glucosa a través de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof. Existen dos vías para la metabolización del piruvato. En una de ellas se genere propionato, a través del succinato. En la otra vía se convierte el piruvato en acetil-CoA (Figura 2) que posteriormente es hidrolizado para formar acetato o reducido para formar butirato (García y col., 2002).

El tipo y cantidad de la producción de AGCC depende de la especie y cantidad de microflora presente en el colon, el sustrato y tiempo de tránsito intestinal (Wong y col., 2006).

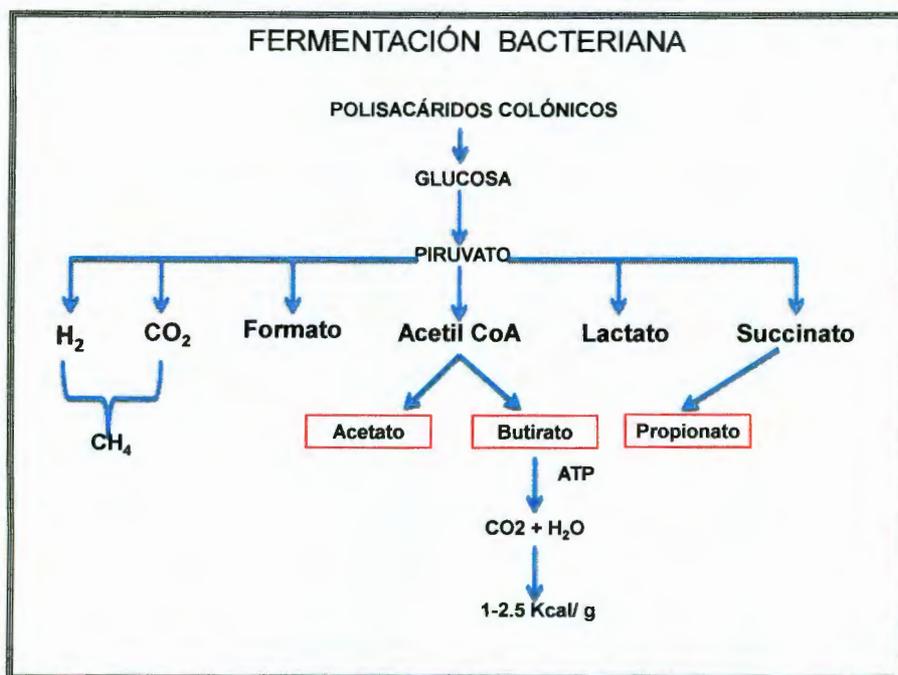


Figura 2. Fermentación bacteriana (García y col., 2002).

Los AGCC son fácilmente absorbidos. El ácido butírico es la mayor fuente de energía para los colonocitos, además ha sido estudiado por su papel en la mucosa colónica, en la prevención de cáncer de colon, mediante la promoción de la diferenciación celular, arresto del ciclo celular y la apoptosis de los colonocitos transformados; la inhibición de la enzima histona deacetilasa y la disminución de la transformación de los ácidos biliares primarios a secundarios, como consecuencia de la acidificación de colon. El ácido acético entra en la circulación periférica para ser metabolizado por los tejidos periféricos, es el AGCC que se forma mayoritariamente en el colon, y después de su absorción se ha demostrado que aumenta la síntesis de colesterol (Wong y col., 2006), ya que una vez que entra en el hepatocito se activa la enzima acetil-coenzima A sintetasa 2 citosólica quedando incorporado a los procesos de colesterogénesis y lipogénesis, motivo por el cual se

ha propuesto como la base del efecto hipercolesteremiante de algunos hidratos de carbono no digeribles. De forma contraria, el ácido propiónico (que es en gran medida tomado por el hígado) se ha reportado como un inhibidor competitivo de la proteína que se encarga de la entrada del ácido acético a la célula hepática, un fenómeno que contribuye a la disminución de la lipogénesis y colesterogénesis, al menos *in vivo* en hepatocitos de rata (Delzenne y Williams, 2002). Esto ha demostrado que la disminución de la síntesis hepática de colesterol se debe a la inhibición de la actividad de la hidroximetil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, aún cuando el ácido propiónico es un gluconeogenerador. La producción de altas concentraciones de ácido propiónico, mediante fermentación, se ha propuesto como un mecanismo que explicaría la disminución de los niveles séricos y hepáticos de colesterol en ratas alimentadas con almidones resistentes o fructanos (Delzenne y Kok, 2001).

II.3 Lípidos

II.3.1 Generalidades

Los lípidos son diversos en su estructura y propiedades. Los lípidos incluyen las vitaminas liposolubles, hormonas esteroideas, prostaglandinas, ácidos grasos, triacilgliceroles, glicerofosfolípidos y esfingolípidos (Mathews y col., 2004).

Las combinaciones de grasas y proteínas (lipoproteínas) son importantes constituyentes celulares y se encuentran en la membrana celular y en las mitocondrias citoplasmáticas; también sirven como medio de transporte de lípidos en la sangre.

El conocimiento de la bioquímica de los lípidos es importante para la comprensión de muchas áreas biomédicas de interés actual, como obesidad, aterosclerosis y funciones de varios ácidos grasos poliinsaturados en la nutrición y la salud (Murray y col., 2001). Las enfermedades cardiovasculares son la causa más común de

muerdes en el mundo, siendo los niveles elevados de lípidos en sangre la mayor determinante de enfermedades coronarias (Smith y col., 2004).

II.3.2 Colesterol

El colesterol es el esteroide mejor conocido debido a su vínculo con la aterosclerosis. Tiene importancia desde el punto de vista bioquímico, ya que es precursor de una gran cantidad de esteroides igualmente importantes, entre los cuales se incluyen ácidos biliares, hormonas corticosuprarrenales, hormonas sexuales, vitamina D, glucósidos cardiacos; Se requiere para la formación de lípidos involucrados en la endocitosis y señalización celular (Ryan y col., 2007), además es un constituyente importante de la membrana plasmática y de las lipoproteínas plasmáticas (Murray y col., 2001).

II.3.3 Lipoproteínas

II.3.3.1 Generalidades

Las lipoproteínas son complejos de lípido-proteína que permiten el movimiento de los lípidos apolares a través de los ambientes acuosos. La clasificación estándar de las lipoproteínas incluye, por orden creciente de densidad: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). En la Figura 3 se muestra un esquema general de cómo está constituida una lipoproteína y en la Figura 4 se muestra la clasificación de las lipoproteínas.

II.3.3.2 Lipoproteínas de baja densidad (LDL)

Son producidas por el hígado y son la principal forma en que el colesterol es transportado a los tejidos. Mas del 50% del peso de las partículas LDL está compuesto por esteres de colesterol y colesterol libre. Las LDL son absorbidas por las células diana en un proceso llamado endocitosis mediada por receptor.

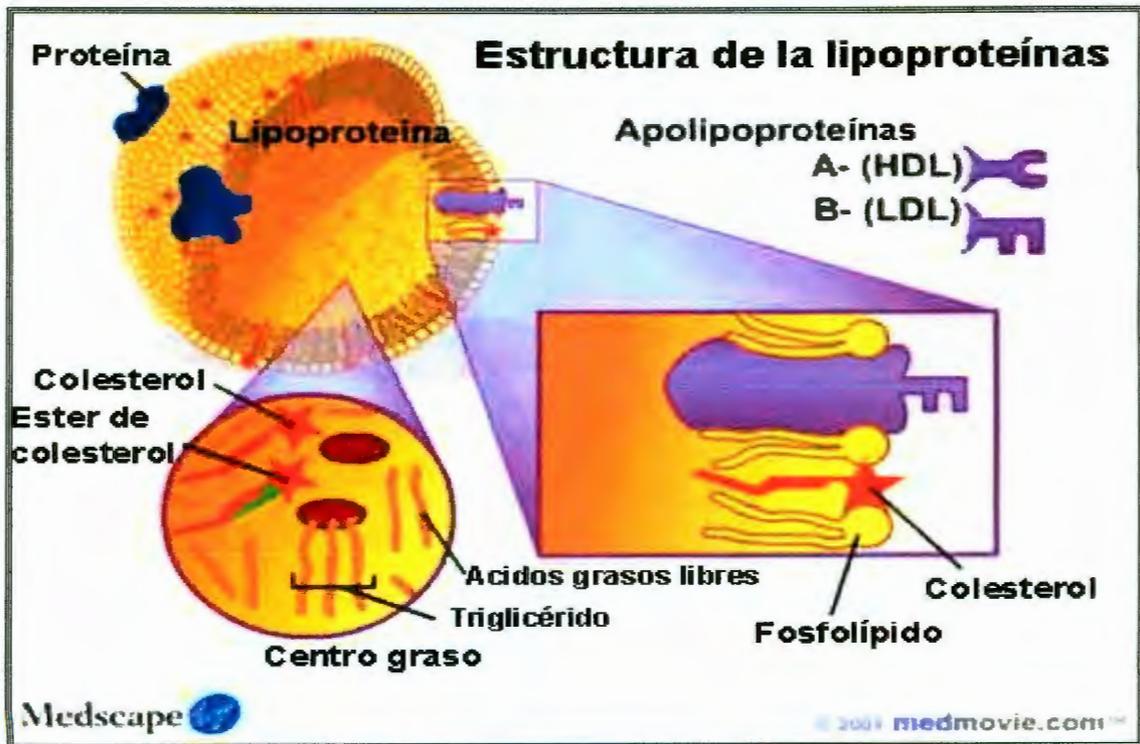


Figura 3. Estructura general de una lipoproteína (www.medscape.elmundo.es).

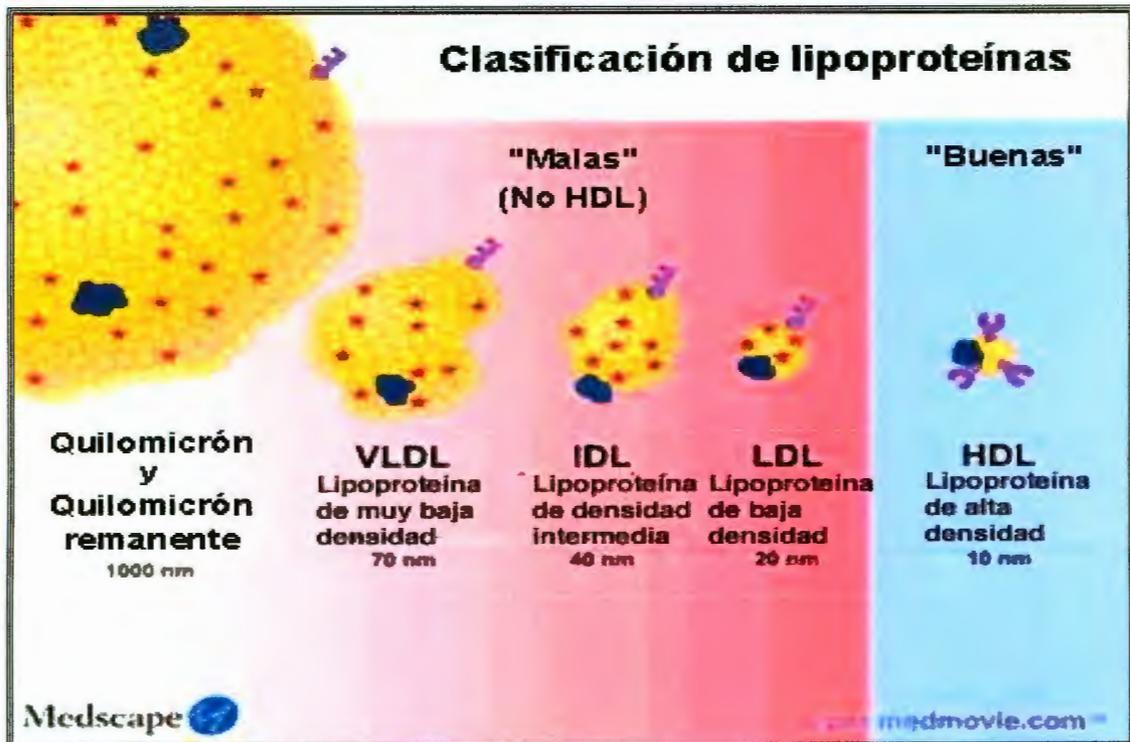


Figura 4. Clasificación de las lipoproteínas (www.medscape.elmundo.es).

Esto ocurre cuando la LDL interactúa con el receptor específico LDL. Los componentes de las LDL como los ácidos grasos insaturados, el colesterol y aminoácidos residuos de las apoproteínas son fácilmente oxidadas (LDL en su forma oxidada). Las LDL oxidadas son absorbidas por los glóbulos blancos a través de su receptor. El colesterol incrementa el diámetro de los glóbulos blancos y estos son llamados células espumosas, que son los principales constituyentes de la placa aterosclerótica. Como resultado de ello, la LDL es comúnmente llamada “colesterol malo”.

II.3.3.3 Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Llevan el exceso de colesterol de los tejidos al hígado para su metabolismo o excreción. También es llamado colesterol bueno porque remueve el colesterol de las células blancas y regresa al hígado.

II.3.4 Triacilglicéridos (TAG)

Son compuestos de glicerol esterificado de tres ácidos grasos. Los triacilglicéridos se obtienen de tres fuentes principales: 1) la dieta, 2) biosíntesis de Novo sobre todo de hígado y 3) depósitos de almacenamiento en adipocitos (Mathews y col., 2004).

II.3.5 Transporte de lípidos

El transporte de los lípidos entre los lugares de absorción, depósito, utilización y eliminación puede agruparse en dos grandes vías, la exógena y la endógena. La vía exógena (Figura 5) transporta la grasa dietética en forma de quilomicrones desde el intestino a los tejidos periféricos y al hígado durante los períodos posprandiales. La lipoproteinlipasa (LPL), localizada en el endotelio capilar, hidroliza los TAG de los quilomicrones y permite la captación de los ácidos grasos libres resultantes por las células musculares y los adipocitos. Los remanentes de los quilomicrones, que contienen el colesterol de origen intestinal, son captados por

receptores hepáticos gracias a la interacción con la apo E. La vía endógena (Figura 6) proporciona la energía necesaria a los tejidos en forma de TAG durante los períodos interdigestivos y depende de la secreción hepática de lipoproteínas ricas en TAG, las VLDL, que también son deslipidadas por la LPL y eventualmente se convierten en lipoproteínas LDL, las partículas que transportan el colesterol a los tejidos. Las HDL transportan el colesterol desde los tejidos al hígado (transporte reverso del colesterol) para su eliminación por la bilis (Ros y Laguna, 2006).

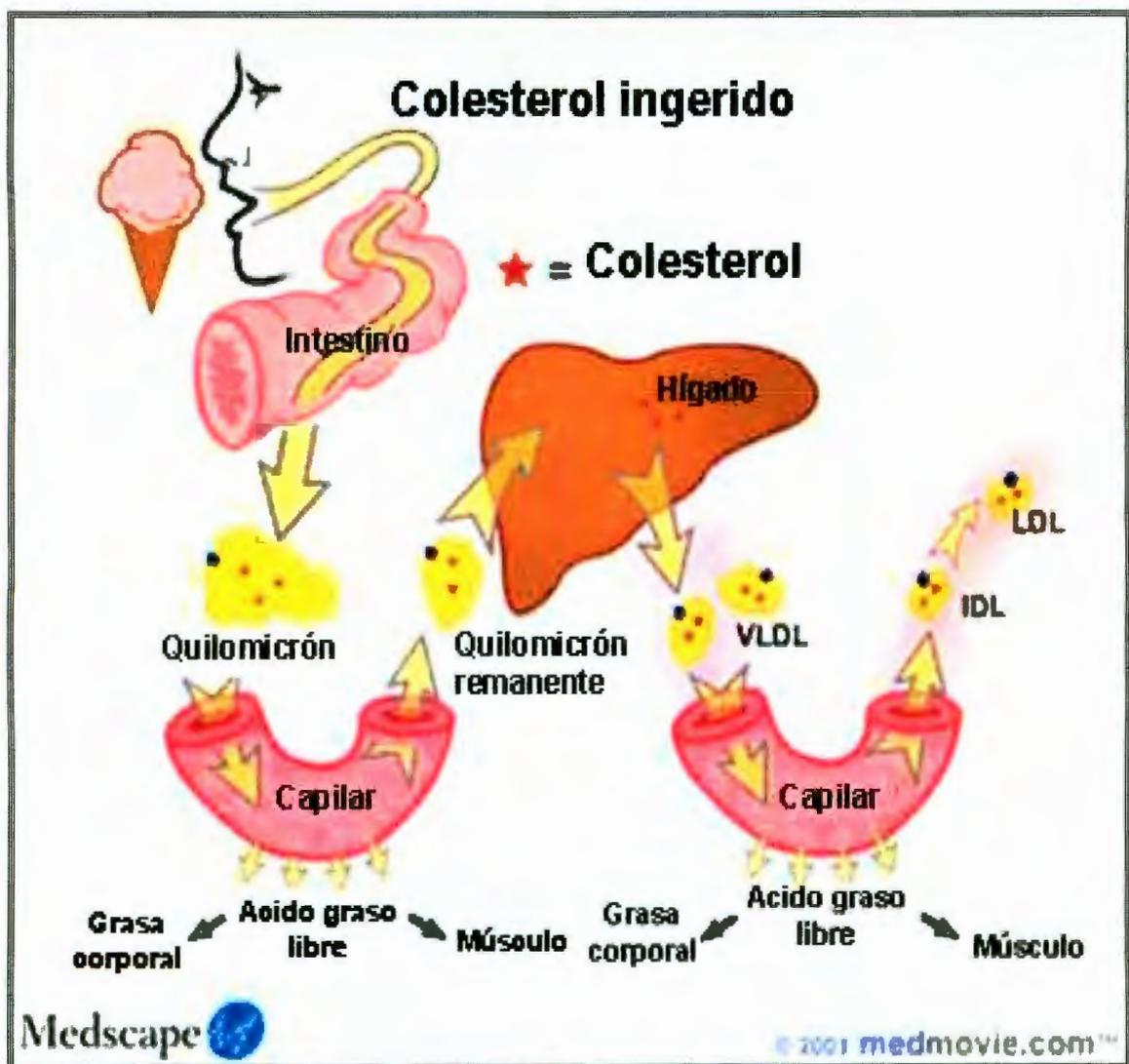


Figura 5. Esquema del metabolismo de los lípidos vía exógena (www.medscape.elmundo.es).

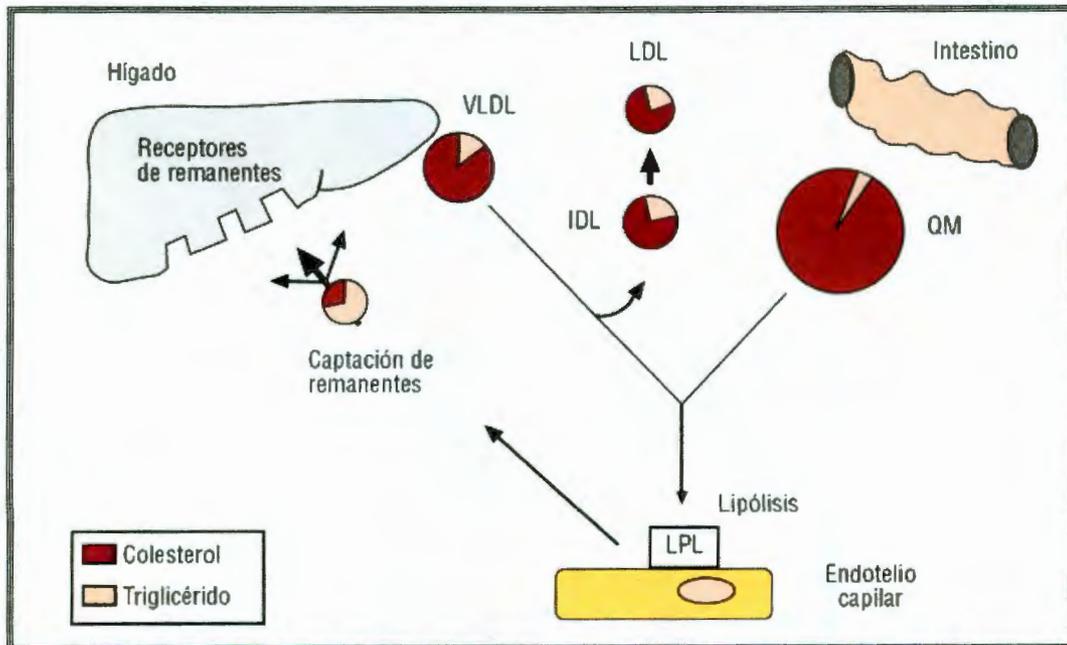


Figura 6. Esquema del metabolismo de los lípidos vía endógena
(Ros y Laguna, 2006).

II.3.6 Importancia del perfil lipídico

El estudio del perfil lipídico humano incluye la medición en el plasma del colesterol total (CT), el colesterol unido a las lipoproteínas VLDL, el colesterol unido a las lipoproteínas LDL, el colesterol unido a las lipoproteínas HDL además de los TAG (Eblen-Zaifur, 2001).

Las cifras normales de colesterol en el plasma varían fundamentalmente según el horario, el sexo y el laboratorio, pero de forma general oscilan en una persona de mediana edad entre 150 y 250 mg/dL en el caso del varón, y entre 140 y 230 mg/dL en el caso de la mujer; La cifra normal del colesterol LDL es de 70-190 mg/dL en el primer caso, y de 30-70 mg/dL si se trata de una mujer. El valor normal del colesterol HDL es de 30-70 mg/dL en el caso del varón, y de 35-80 mg/dL en la mujer. Sin embargo, en la práctica, se emplea más una clasificación por objetivo de cifra de colesterol y de sus subfracciones, cuyo valor se estima que no supone un riesgo cardiovascular. Estas cifras objetivo se publicaban regularmente a partir de

documentos de consenso internacionales. Así, las Guías Europeas para la prevención cardiovascular (2003) señalan como deseable un nivel de colesterol total inferior a 190 mg/dL y de colesterol LDL de 115 mg/dL pero de 175 mg/dL y 100 mg/dL, respectivamente, en los pacientes con diabetes y enfermedad cardiovascular establecida. Aunque en el documento referido no se marcaron objetivos para la cifra de colesterol HDL, se señala que suponen un factor de riesgo cardiovascular cifras inferiores a 40 mg/dL en el varón y a 46 mg/dL en la mujer, mientras que para TAG el riesgo cardiovascular es de valores superiores a 150 mg/dL (Prieto, 2006).

El perfil lipídico también presenta cambios asociados con el medio ambiente, la etnia y las diferencias biológicas y metabólicas. La contribución del ambiente o de los factores biológicos en las variaciones de lípidos y lipoproteínas parece ser diferente según la variable lipídica. También se ha informado que las concentraciones de colesterol total, colesterol HDL, están más influenciadas por factores genéticos, mientras que las concentraciones de triglicéridos varían principalmente por el efecto ambiental (Rodríguez y col., 2002). Las LDL constituyen la principal forma de transporte del colesterol a los tejidos, y las HDL, desempeñan el papel principal de disolver el exceso de colesterol de los tejidos al hígado para su metabolismo o excreción (Mathews y col., 2004).

Las anomalías en el metabolismo de las lipoproteínas se presentan en los sitios de producción y/o de utilización de las mismas, y producen hipo o hiperlipoproteinemias (Murray y col., 2001).

Cabe destacar que la grasa de la dieta aumenta el colesterol y la síntesis de ácidos biliares por el hígado, y se incrementa la cantidad de estos esteroides en colon. Las bacterias anaerobias de colon convierten estos compuestos en ácidos biliares secundarios, que promueven la carcinogénesis de colon (Valencia y Muñiz, 2000).

II.4 Cáncer

II.4.1 Generalidades

El cáncer es un trastorno de los mecanismos que controlan la proliferación y diferenciación de las células de los organismos pluricelulares (Torroella y Villa-Treviño, 1998). Todos los cánceres empiezan en las células que son las unidades básicas que forman los tejidos del cuerpo, el cual está compuesto de muchos tipos de células. Estas células crecen y se dividen para producir nuevas células conforme el cuerpo las necesita. Cuando las células envejecen, mueren y éstas son reemplazadas por células nuevas. Este proceso ordenado de división celular puede descontrolarse y las células nuevas se siguen formando cuando el cuerpo no las necesita. Cuando esto pasa, las células viejas no mueren cuando deberían morir. Estas células que no son necesarias pueden formar una masa de tejido que es lo que denomina tumor. No todos los tumores son cancerosos y pueden ser benignos o malignos (INC, 2008).

La incidencia del cáncer aumenta considerablemente con la edad, sobre todo debido a la acumulación de riesgos a lo largo de la vida, combinada con la tendencia a la pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular a medida que aumenta la edad (OMS, 2008).

El cáncer se clasifica de acuerdo con el tejido y el tipo de células de donde se origina (Alberts y col., 2000). La enfermedad surge principalmente como consecuencia de la exposición individual a agentes cancerígenos en las personas que los inhalan, comen y beben, o están expuestos en el trabajo personal. Los hábitos personales, tales como el uso del tabaco, la dieta y los patrones de actividad física, así como las condiciones del medio ambiente, siendo los factores genéticos los que desempeñan el principal papel en el desarrollo de cáncer (OMS, 2008).

Los factores nutricionales y de estilo de vida, son los que pueden inferir en un mayor riesgo para el desarrollo del cáncer de colon (Casimiro, 2002).

II.4.2 Cáncer de colon

II.4.2.1 Función y estructura del colon

El colon es un órgano fundamental en la digestión, de todos aquellos nutrientes (proteínas y carbohidratos) que escapan de la digestión por las enzimas digestivas en el intestino delgado, siendo que, la flora bacteriana colónica produce enzimas capaces de digerir dichos nutrientes (Guarner, 2000).

El colon o intestino grueso es la última estructura en procesar los alimentos. El colon tiene forma de tubo y su interior está cubierto de una delgada lámina llamada mucosa (Figura 7). La mucosa está formada de células. Cuando una de estas células se transforma en maligna y si se empieza a multiplicar sin control, puede dar origen al cáncer de colon (López y Picazo, 2008).

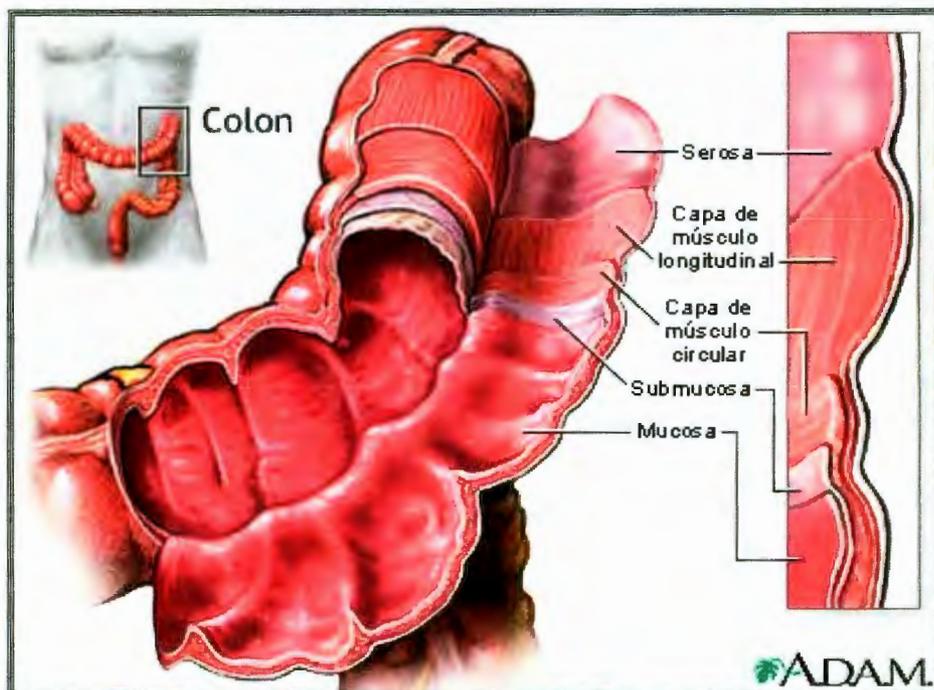


Figura 7. Anatomía del colon (Gund, 2008).

II.4.2.1.1 Células normales del epitelio colónico

La mucosa colónica se caracteriza por la presencia de múltiples criptas cubiertas con una monocapa de células epiteliales de auto-renovación (Figura 8).

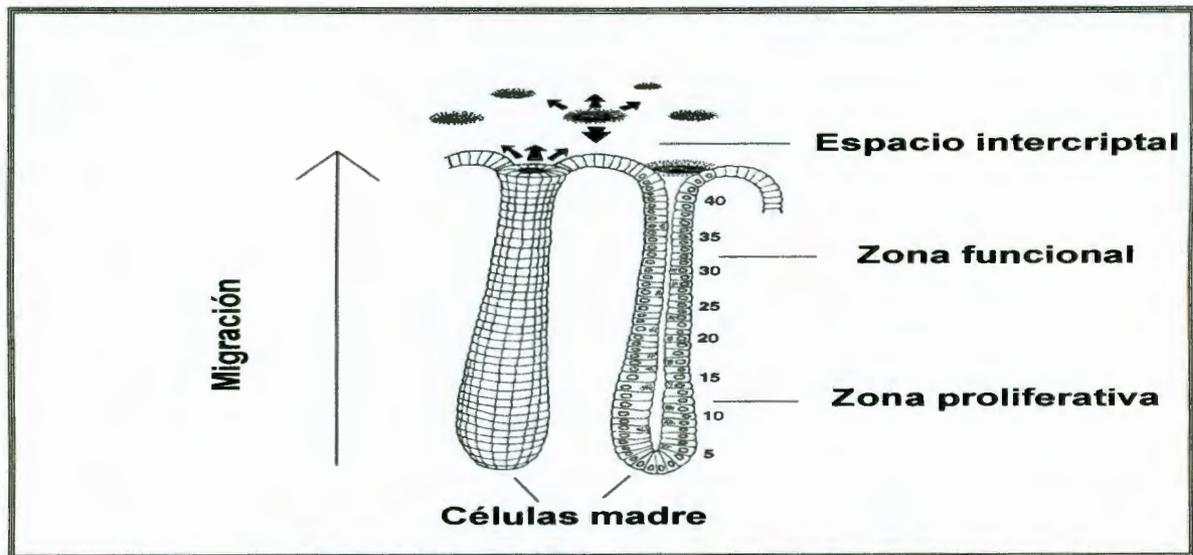


Figura 8. Morfología del epitelio colónico normal (Adaptado de Potten, 1998).

Estas células se derivan de las células madre, que se encuentran en la base de la cripta. Hay una constante migración de las células de la parte inferior de la cripta hacia la luz del colon, renovándose el epitelio colónico de los humanos cada 4-8 días. Cuando las células están todavía en la parte inferior y media de la cripta, se someten a varias rondas de replicación celular para suministrar una cantidad suficiente para llenar toda la cripta. Este compartimento proliferativo puede funcionar como parte de un proceso homeostático para controlar el número total de células de la cripta. Durante su migración hacia la luz del colon, las células pierden su capacidad de dividirse, y se diferencian principalmente en enterocitos de absorción o de células producción-mucina que cubren la parte superior de la cripta y el espacio intercriptal en la superficie mucosa, y, una vez llegado a la parte superior de la cripta, las células mueren por apoptosis y, a veces por necrosis, y son destruidas dentro del conducto fecal o localmente son eliminadas por los

macrófagos intra-epiteliales. Para mantener la arquitectura del epitelio colónico, la tasa de pérdida de células en la parte superior de la cripta y en la superficie intercriptal está estrechamente unida a la producción de células en la base de la cripta (Sesink, 2001).

II.4.3 Carcinogénesis de cáncer de colon

El desarrollo de cáncer de colon es un proceso que tarda entre 10 y 15 años. Es una enfermedad clonal, es decir, se desarrolla a partir de una célula que experimenta algunas mutaciones genéticas que le brindan una mejor supervivencia y expansión proliferativa (Darce, 2007). Se considera que un evento muy temprano en el desarrollo multifásico de cáncer de colon es la supresión de la distinción espacial normal, entre el compartimento funcional y el proliferativo. La Figura 9 muestra la zona proliferativa que se expande hacia la parte superior de la cripta del colon, sin un aumento neto del número de células (la tasa de natalidad = tasa de destrucción (lesión de fase I, parte B)), lo que supone un estado menos diferenciado del epitelio.

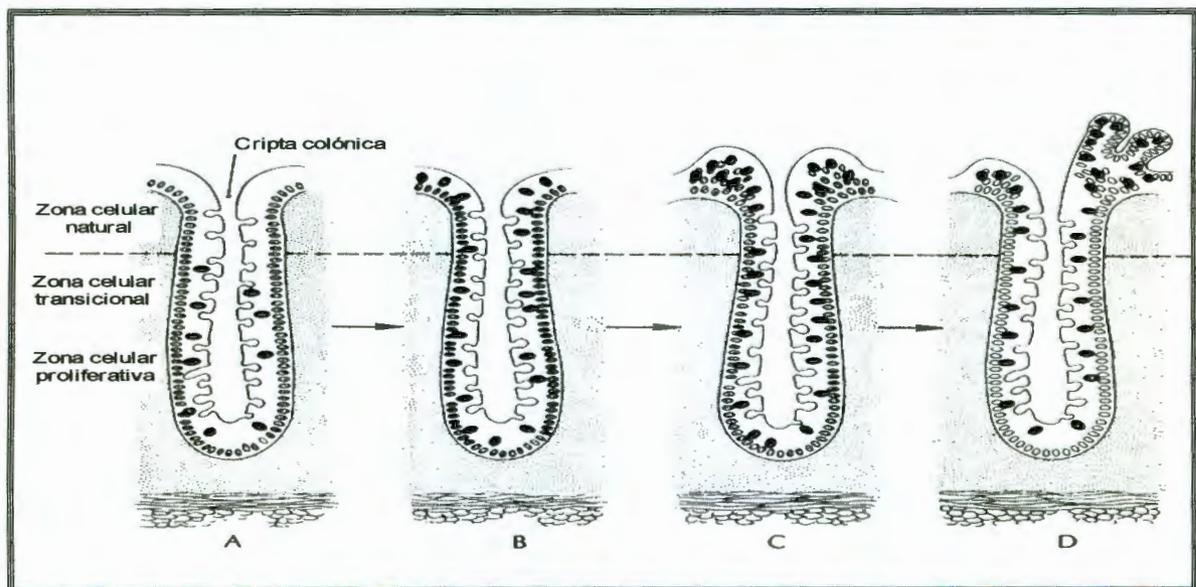


Figura 9. Desarrollo del cáncer del epitelio colónico normal (Sesink, 2001). Epitelio colónico normal (A), lesión de fase I (B), lesión de fase II (C), adenoma (D).

En una etapa posterior, la tasa de proliferación celular es superior a la muerte, generando la acumulación neta de células epiteliales en la mucosa (fase II de lesión), y se inicia la producción de tejido en el lumen del colon. Estos resultados patológicamente definidos son adenomas (parte D). En un número limitado de casos, estos adenomas se desarrollan a malignos, carcinomas invasivos (Sesink, 2001). Paralelamente a este proceso, se manifiesta un proceso inflamatorio en cual se expresan citoquinas o interleucinas (IL) que desencadenan dicho proceso, induciendo la producción de otras proteínas consideradas como marcadores de inflamación, como la Proteína C Reactiva (PCR), un activador de complemento. Una de las principales interleucinas proinflamatorias es la IL-6, la cual es mediador de la respuesta de fase aguda y el determinante primario de la producción de PCR (Lars, 2003). Datos recientes de modelos de cáncer en ratones y humanos han establecido que la inflamación, la cual promueve un microambiente tumoral, es un componente crítico de la promoción y progresión tumoral.

La mayoría de los genes diana IL-6 están implicados en la progresión y supresión de apoptosis en el ciclo celular, lo cual pone de relieve la importancia de IL-6 en la carcinogénesis (Wan-Wan y Karin, 2007).

Basado en un análisis genético, el modelo mejor aceptado para la patogénesis del cáncer de colon es el que se muestra en la Figura 10.

Los factores dietéticos, de hecho, pueden tener una influencia en todos los pasos de desarrollo del cáncer, incluyendo la angiogénesis/metástasis, una etapa crítica en el crecimiento y extensión del cáncer maligno (Marquart y col., 2002).

II.4.3.1 Factores de riesgo

El inicio y la evolución del proceso de cáncer dependen de la interacción entre factores genéticos y ambientales. El tabaco parece suponer un riesgo importante de cáncer de colon, incluso con el consumo reducido. El alcohol (sobre todo los

licores fuertes y la cerveza) parece ser otro factor de riesgo directo además de tener un efecto cocarcinogénico junto con el tabaco. Los trabajadores industriales que están en contacto durante años con polvos inorgánicos de sustancia plásticas y combustibles pueden tener un mayor riesgo de cáncer de colon. El consumo de carne roja o procesada parece suponer un aumento de riesgo, que no se ha encontrado para carne blanca. La ingesta de una dieta de alto contenido calórico, el sobrepeso y la cantidad total de grasa en la dieta parecen relacionarse con un aumento de incidencia de cáncer de colon.

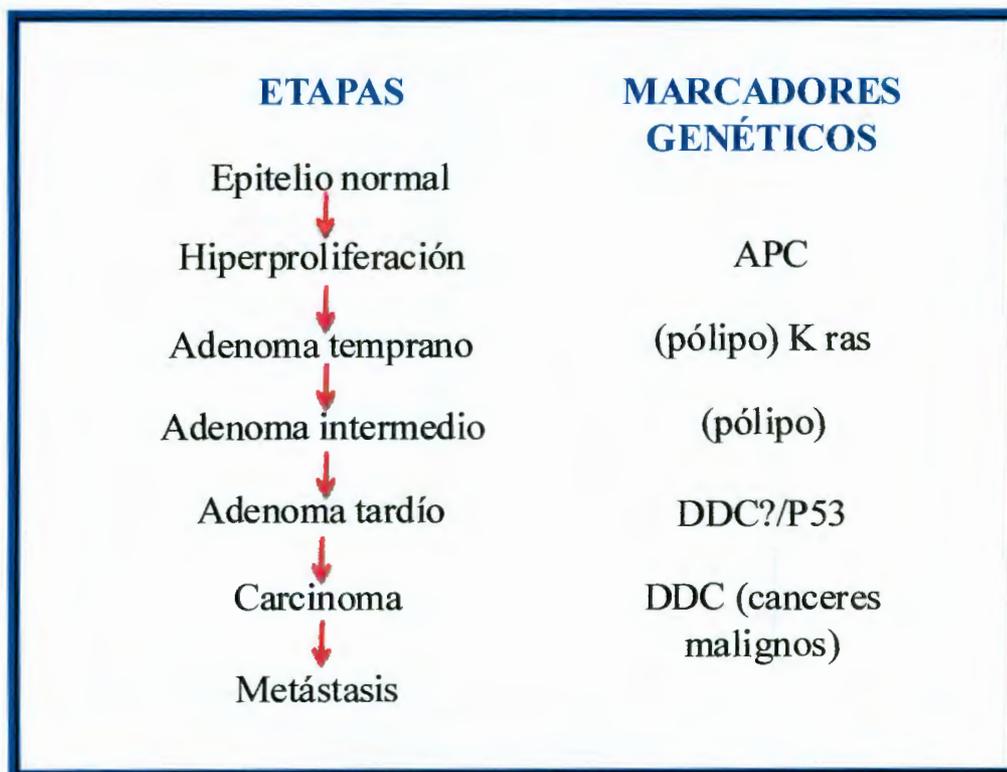


Figura 10. Patogénesis de cáncer de colon (Marquart y col., 2002).

El cáncer de colon presenta una mayor prevalencia en los países que tienen una dieta tipo occidental (rica en carne, grasa animal, e hidratos de carbono refinados y pobre en fibra), en donde la ingesta de una dieta de alto contenido calórico, el sobrepeso y la cantidad total de grasa en la dieta parecen relacionarse con un aumento de incidencia de cáncer de colon (Casimiro, 2002).

II.4.4 Modelos animales en cáncer de colon

Es razonable suponer que la presencia de mutágenos es el principal factor causal del cáncer de colon. Entre los mutágenos que juegan un papel en la carcinogénesis del colon están las aminas heterocíclicas y los N-nitrosocomponentes que ocasionan otras mutaciones de ADN que los encontrados en los genes de los carcinomas esporádicos de colon. Experimentos *in vitro* y estudios en animales muestran que ambas clases de mutágenos forman preferentemente aductos con bases de purina (adenina y guanina), lo que dan sustituciones de G a T o G a A o mutaciones en las pares de bases AT (Sesink, 2001).

Las fosas crípticas aberrantes (FCA) son lesiones intestinales preneoplásicas que aparecen después de la administración de carcinógenos en las ratas. Los FCA son criptas con una abertura luminal alterada y la capa epitelial engrosada. Destacan sobre el resto de criptas normales por su mayor tamaño y por la existencia de una separación pericriptal. Estas lesiones premalignas se consideran precursoras del desarrollo adenoma-carcinoma intestinal en humanos (Pretlow y Pretlow, 2005).

Entre los modelos experimentales de cáncer de colon no espontáneo destacan los inducidos por derivados de 1,2-dimetilhidrazina como el Azoximetano (AOM) (Reddy, 2004).

II.4.4.1 Azoximetano (AOM)

El azoximetano es un agente químico que induce alta incidencia de adenomas y adenocarcinomas en intestino grueso y delgado de ratas administrado subcutáneamente o por infusión rectal (Toth, 1982; Reddy, 2004).

El azoximetano a una dosis de 10-20 mg/kg produce carcinoma intestinal en el 100% de ratas por vías subcutánea o intramuscular (Williamson y col., 1980). Ratas inyectadas con una dosis relativamente alta (≥ 20 mg/kg) de AOM desarrollan más

tumores en duodeno y el colon distal, y aquellas inyectadas con dosis bajas ($\leq 10\text{mg/kg}$) tienen más tumores en ciego y colon proximal (King y Varasdi, 1959). El AOM produce una toxicidad hepática de hasta un 20% y los animales fallecen durante el periodo de inducción debido a necrosis hepática (Ward y col., 1974).

II.4.4.1.1 Mecanismo de acción de AOM

El metabolismo de este carcinógeno genera sustancias citotóxicas para los colonocitos a las pocas horas de la inducción (Reddy, 2004). Esta etapa de iniciación se caracteriza por cambios en la homeostasis del epitelio intestinal que conducen al aumento de la proliferación. Paralelamente, el AOM puede introducir mutaciones que confieren un elevado potencial de transformación neoplásica a las células intestinales que escapan de la apoptosis. Se ha observado un progresivo aumento en la formación de FCA, la aparición de mutaciones en *K-ras* y *β -catenina*, e inestabilidad de microsatélites en el colon de animales inducidos con AOM. Estas características fenotípicas de progresión oncogénica por administración de AOM son similares histopatológicamente a la progresión del cáncer de colon humano (Pretlow y Pretlow, 2005).

El mecanismo de acción del AOM es mediante el proceso de N-hidroxilación convirtiéndose en metilazoximetanol por varios sistemas enzimáticos en el hígado (fase I). El metilazoximetanol es inestable a temperatura corporal e *in vitro*, por lo que se forma el agente alquilante metildiazonio, llamado carcinógeno final. Este último es una sustancia altamente reactiva que forma iones metil-carbonio, los cuales son responsables de las mutaciones de macromoléculas tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 11). Por lo tanto, al administrarse el azoximetano y este es absorbido por los capilares, llega al torrente sanguíneo, por vía vena porta llega al hígado y forma metilazoximetanol (fase I de biotransformación) y luego puede conjugarse con ácido glucorónico (enzima de fase II) y de ahí eliminarse vía orina o intestinal. Al ser eliminado por vía intestinal el conjugado interacciona con la flora microbiana del intestino que puede biotransformarlo por la enzima β -glucoronidasa y dar

metilazoximetano y por su reactividad producir el ión metilcarbonio, produciendo mutaciones en los enterocitos y en consecuencia las fosas crípticas aberrantes (FCA). La alteración de las propiedades de las macromoléculas críticas como ADN, ARN y proteínas, por alquilación y otras reacciones, es un paso esencial en la carcinogénesis química; en el caso del colon la macromolécula que se altera es el ADN de las células epiteliales. Así, el AOM es el mejor carcinógeno para la inducción de FCA en modelos *in vivo*, en tiempos experimentales relativamente cortos, ya que las FCA resultan ser el principal marcador en el estadio temprano del cáncer de colon (Feregrino-Pérez y col., 2008).

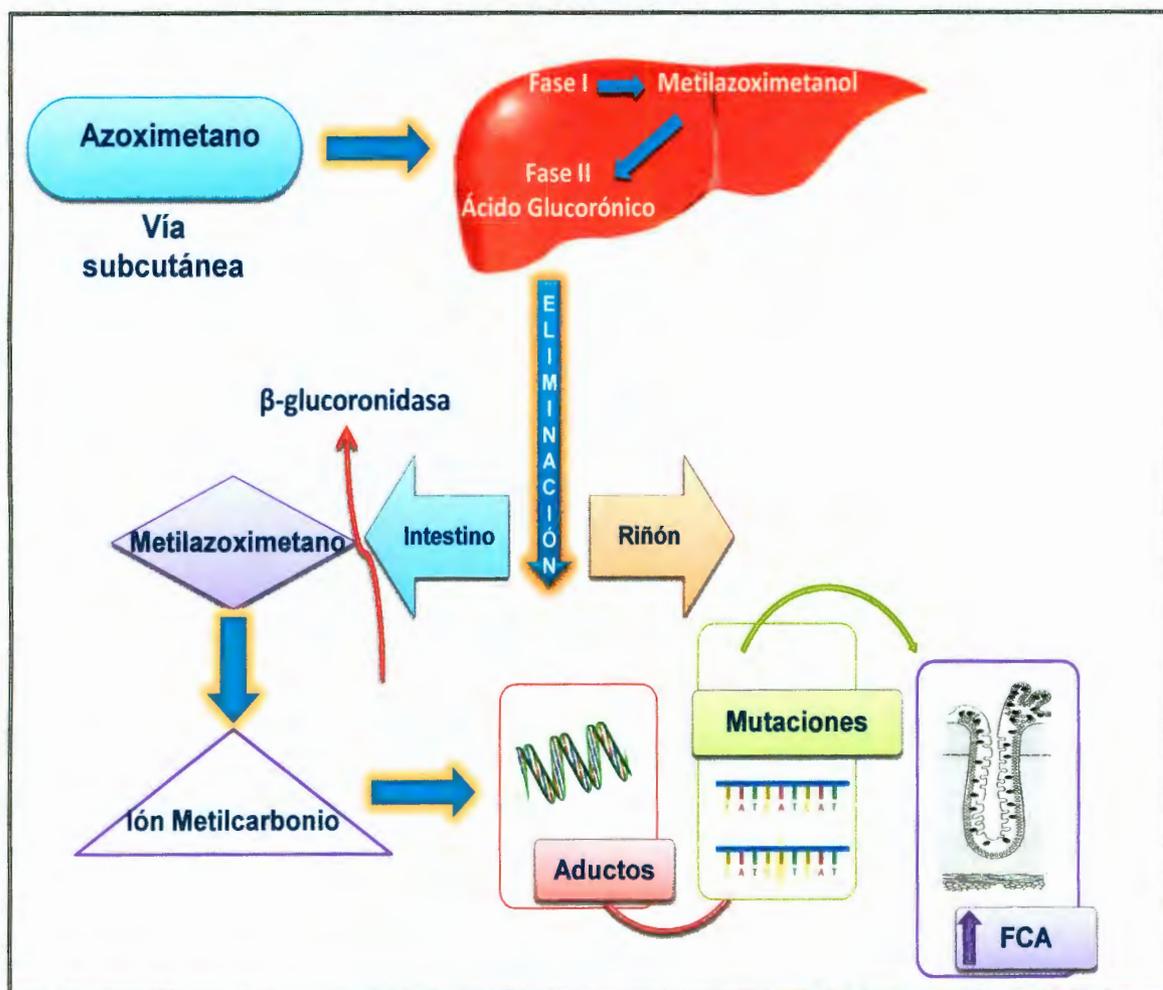


Figura 11. Mecanismo de acción del azoximetano (Modificado de Feregrino-Pérez y col., 2008).

III HIPÓTESIS

Los polisacáridos presentes en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025, modifican los niveles lipídicos en etapas tempranas de cáncer de colon inducido químicamente.

IV OBJETIVOS

IV.1 General

- Evaluar el efecto del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025 cocido y sus polisacáridos sobre los niveles lipídicos en etapas tempranas de cáncer de colon inducido químicamente.

IV.2 Específicos

- Determinar el perfil lipídico en el suero de ratas inducidas químicamente a cáncer de colon.
- Evaluar el efecto quimioprotector del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025 cocido sobre el perfil lipídico en el suero de ratas inducidas químicamente a cáncer de colon.
- Evaluar el efecto quimioprotector de los polisacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025 sobre el perfil lipídico.
- Medir la expresión de interleucina IL-6 en tejido de colon de ratas inducidas químicamente a cáncer de colon, como indicador de inflamación.
- Evaluar la influencia del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025 sobre la expresión de interleucina IL-6.
- Evaluar la influencia de los polisacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025 sobre la expresión de interleucina IL-6.

V METODOLOGÍA

V.1 Materiales

V.1.1 Compuestos químicos

Los métodos enzimáticos para la cuantificación de colesterol sérico total, cuantificación de triglicéridos, y de método de precipitación para la cuantificación de colesterol en sus fracciones HDL y LDL fueron adquiridos de Wiener laboratorios y el azoximetano (AOM) de Sigma Chemical (UAS).

Acilamida, bis-acilamida, tris, SDS, TEMED, persulfato de amonio, mercaptoetanol, azul de Coomassie R-250, glicina, azul de bromofenol, de Bio-Rad. El kit de quimioluminiscencia y solución bloqueadora de Roche. El glicerol de la marca Promega. El tween 20 de la marca Hycel de México. El ácido etilendiamonio tetra acético (EDTA), ácido tánico, acetona, NaCl, Tris, MgCl₂, KCl, acetona, etanol, HCl, cloroformo, metanol de la marca J. T Baker.

Los anticuerpos para Actina e IL-6 de la marca Santa Cruz. Las películas y soluciones de revelado de la marca Kodak. La membrana PVDF de Millipore.

V.1.2 Material biológico

Se usaron ratas macho Sprague-Dawley de 4 semanas de edad, se obtuvieron del Instituto de Neurobiología UNAM Campus Juriquilla.

Se utilizó alimento para roedores (Harlan Tekland 2018S) *ad libitum*.

Se empleó frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Negro 8025 donado por el INIFAP Estación Bajío.

V.2 Métodos

V.2.1 Bioensayo

El frijol cocido (FC) y su extracto de polisacáridos (EP) se evaluaron en el modelo de inducción temprana de cáncer de colon, en donde sesenta ratas macho Sprague Dawley de cuatro semanas de edad fueron divididas en 6 grupos (n=10), se mantuvieron en jaulas metálicas para su aclimatación por un periodo de una semana, con ciclos de luz- oscuridad de 12 hrs y temperatura de 25 °C. El diseño se muestra en la Figura 12, todos los grupos de experimentación tuvieron dieta basal (DB) (agua y alimento *ad libitum*). 1) El grupo blanco al que se le administró vía zona intragástrica solución salina. 2) Se le administró frijol cocido (FC) (3.2 g/Kg de peso corporal) vía sonda intragástrica diariamente. 3) Extracto de polisacáridos (EP) el cual se administró diariamente en una sola toma (1.84 g/Kg de peso corporal) vía sonda intragástrica. 4) Se le administró el carcinógeno Azoximetano (AOM) (15 mg/Kg de peso) una vez a la semana durante dos semanas vía subcutánea en una sola dosis y diariamente solución salina intragástricamente. 5) AOM (15 mg/Kg de peso) + FC (3.2 g/Kg de peso corporal). 6) AOM (15 mg/Kg de peso) + EP (1.84 g/Kg de peso corporal). Una vez concluido el periodo de siete semanas de tratamiento, los animales se sacrificaron, se extrajo sangre y disectó el colon. El tejido (colon) se congeló en Nitrógeno líquido, y se almacenó a -70 °C (en ultracongelador) hasta la extracción de proteína

V.2.2 Cocción

El frijol se trató térmicamente siguiendo el protocolo propuesto por Aparicio-Fernández y col., 2005. Brevemente, 50 gr de frijol en 250 mL de agua destilada. La cocción se llevó a cabo por 2.5 hrs a 90 ± 1 °C. Con la muestra se formó un homogeneizado el cual se liofilizó y almacenó a 4 °C hasta su uso.

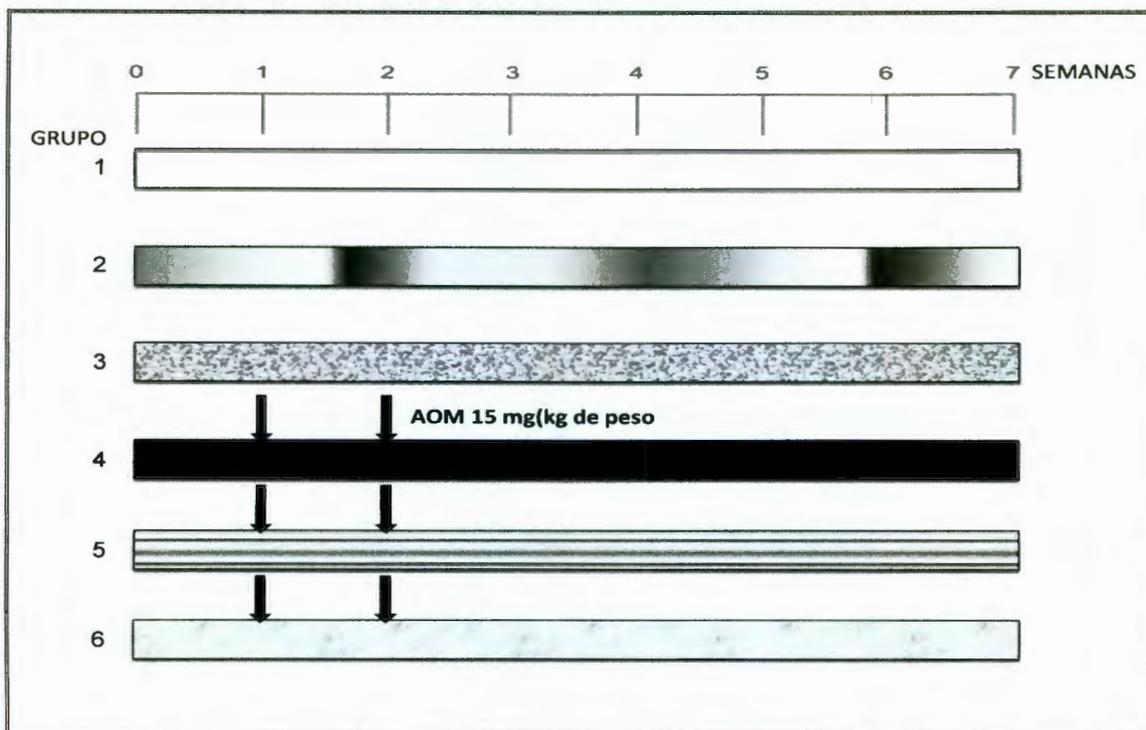


Figura 12. Grupos de experimentación. Grupo 1 blanco; grupo 2 y 3 FC (3.2 g) y EP (1.84 g) por kilogramo de peso respectivamente; grupo 4 AOM (15 mg/Kg de peso); grupo 5 y 6, AOM (15 mg/Kg de peso) con FC y EP respectivamente. FC = frijol cocido, EP = extracto de polisacáridos, AOM = azoximetano.

V.2.3 Extracción de polisacáridos

La extracción de polisacáridos del frijol se realizó con la técnica de Kurtzman y Halbrock (1970). Se pesó 300 gr de muestra molida y pasada por una malla 0.05 cm, se adicionó 1500 ml de agua agitando por 1 min. La mezcla homogénea se centrifugó y al precipitado se le adicionó 100 ml de ácido tánico 10%. En seguida se ajustó el pH a 4 y se agitó durante 5 min. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. Al precipitado se le adicionó un total de 300 ml de acetona en tres lavados cada uno de 100 ml. Después de homogenizar la muestra se centrifugó a 13000 rpm por 10 min y el precipitado obtenido fueron los polisacáridos.

V.2.4 Obtención de suero de rata.

Se obtuvo una muestra de sangre completa (punción cardiaca con jeringa desechable de 5 mL) en un tubo de vidrio y se incubó a 37 °C durante 1 hr, hasta que la sangre fue coagulada. La muestra fue refrigerada a 4 °C durante 2 - 6 hrs para permitir que el coágulo sanguíneo se retraiga. Utilizando una pipeta Pasteur, se retiró cuidadosamente el coágulo apoyándolo en la pared del tubo. Es importante no lisar los eritrocitos del coágulo. El suero se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min a 4 °C y después se etiquetó y conservó el sobrenadante a -70 °C.

V.2.5 Determinación de colesterol total

Se pipetearon los reactivos como se indica en el Cuadro 3, en tubos de reacción de 1 cm de espesor a temperatura de 20 - 25 °C. Se procedió a mezclar y luego a incubar 5 min en baño de agua a 37 °C y después se midió absorbancia de la muestra y del patrón contra el blanco de reactivos en espectrofotómetro a 505 nm. Los cálculos realizados fueron los siguientes:

Colesterol total (mg/dL) = (Absorbancia de la muestra/Absorbancia del patrón) X 200 (Concentración del patrón).

Cuadro 3. Mezcla de reactivos para la cuantificación de colesterol total.

Reactivos	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón	-	10 µL	-
Muestra (suero)	-	-	10 µL
Reactivo de colesterol	1000 µL	1000 µL	1000 µL

V.2.6 Determinación de lipoproteínas de alta densidad (HDL)

En tubo para centrifugar se pipeteó 200 µL de muestra (suero) y se adicionó 500 µL de reactivo precipitante y posteriormente se homogeneizó agitando (sin invertir) durante 20 segundos e incubó 10 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido en tiempo de incubación la mezcla se centrifugó 15 min a 3000 rpm y se separó el sobrenadante. El colesterol se determinó antes de 2 hrs como se indica en el Cuadro 4. Se pipeteó en tubos de reacción de 1 cm de espesor a temperatura de 25 °C, y después se mezcló e incubó en un baño de agua 5 min a temperatura de 37 °C. Después de enfriarse, se midió la absorbancia de la muestra y del patrón contra el blanco de reactivos a 505 nm en espectrofotómetro antes de las 2 hrs y los cálculos que se realizaron son los siguientes:

Concentración de colesterol HDL (mg/dL) = (Absorbancia de la muestra / Absorbancia del patrón) X 76.2 (concentración del patrón).

Cuadro 4. Mezcla de reactivos para la cuantificación de lipoproteínas HDL

Reactivos	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón	-	20 µL	-
Sobrenadante	-	-	200 µL
Reactivo de colesterol	2000 µL	2000 µL	2000 µL

V.2.7 Cuantificación de lipoproteínas de baja densidad (LDL)

Se pipeteó en un tubo para ultracentrífuga 200 µL de muestra (suero) y se adicionó 100 µL de reactivo precipitante, posteriormente se homogeneizó agitando sin invertir durante 20 segundos y se dejaron 15 min a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Transcurrido el tiempo, se centrifugó la mezcla durante 15 min a 3000 rpm y el sobrenadante fue separado. La cuantificación del colesterol LDL se realizó como se

indica en el Cuadro 5. Se pipeteó en tubos de reacción de 1 cm de espesor a temperatura de 20 - 25 °C, y después de mezclar e incubar 5 min en baño de agua a temperatura de 37 °C, se midió la absorbancia de la muestra y del patrón contra el blanco de reactivos a 505 nm y los cálculos que se realizaron son los siguientes:

Concentración de colesterol LDL (mg/dL) = (Absorbancia de la muestra /Absorbancia del patrón) X 62.4 (concentración del patrón).

Cuadro 5. Mezcla de reactivos para la cuantificación de lipoproteínas LDL

Reactivos	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón	-	20 µL	-
Sobrenadante	-	-	100 µL
Reactivo de colesterol	2000 µL	2000 µL	2000 µL

V.2.8 Determinación de Triacilglicéridos (TAG)

Se pipetearon los reactivos en tubos de reacción de 1 cm de espesor a temperatura de 20 – 25 °C como se indica en el Cuadro 6. Se mezcló e incubó 20 min a temperatura ambiente (15 - 25 °C) y se procedió a medir en espectrofotómetro a 505 mn frente a un blanco de reactivos. Se corrigieron las lecturas con el blanco de reactivos. Los cálculos realizados fueron los siguientes:

Concentración de colesterol TAG (mg/dL) = (Absorbancia de la muestra /Absorbancia del patrón) X (concentración del patrón).

Cuadro 6. Mezcla de reactivos para la cuantificación de TAG.

Reactivos	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón	-	5 µL	-
Sobrenadante	-	-	5 µL l
Reactivo de triglicéridos	500 µL	500 µL	500 µL

V.2.9 Expresión de proteína IL-6

V.2.9.1 Extracción de proteína

Se tomó 500 mg de tejido congelado (zona distal del colon) de cada muestra. Las muestras fueron colocadas en tubos cónicos en donde se adicionaron cuatro volúmenes de solución amortiguadora pH 7.5 (Anexo A.1). Posteriormente las muestras fueron homogeneizadas con un politrón (Cinémática, Suiza), hasta que no se observó ningún grumo de tejido. Los homogeneizados fueron incubados por 45 min a 4 °C con agitación. Concluida la incubación, se procedió a centrifugar las muestras por 15 min a 13000 rpm a 4 °C en un centrífuga Hermle Z323K (Hermle Labortechnik, Alemania). El sobrenadante fue separado con ayuda de una pipeta Pasteur y se colocó en tubos, los cuales se centrifugaron por una hora a 13000 rpm a 4 °C. La fracción microsomal se encuentra en la pastilla y el citosol se removió con ayuda de una pipeta Pasteur. Los extractos citosólicos (proteína) se almacenaron en tubos ependorf a -70 °C hasta su análisis.

V.2.9.2 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas de los extractos citosólicos, se realizó por el método de Bradford (Anexo A.2), utilizando la albúmina bovina como estándar en una curva de calibración (Anexo A.3) de 0 a 100 µg. Se colocaron 10 µL de cada una de las muestras en una micro-placa y se adicionó 240 µL de reactivo de Bardford. Se

incubó 5 min a temperatura ambiente y se analizó en el Multiskan Ascent (Lab. Tech) a una longitud de onda de 540 nm. Con la ecuación obtenida en la curva se calculó la concentración de proteínas de cada muestra.

V.2.9.3 Análisis de Western Blot

El análisis de Western Blot se utilizó para medir los niveles de expresión de proteínas IL-6, de acuerdo por lo descrito por Lakshman y col. (2004). La proteína fue separada de acuerdo a su peso molecular en una matriz desnaturizante de poliacrilamida (SDS – PAGE), después, fue transferida a una membrana PVDF y finalmente incubada con el anticuerpo que reconoce la proteína.

V.2.9.3.1 Electroforesis SDS-PAGE

De los extractos citosólicos obtenidos (proteína de zona distal del colon) se realizó una dilución 1:1 con solución digestora (Anexo B.1), la cual contiene β -mercaptoetanol, la desnaturización se consiguió manteniendo la mezcla en baño de agua a 60 °C por 20 min. Se realizó la carga de las muestras (100 μ g de proteína) en un gel al 10% (SDS – PAGE) con espesor de 1 mm (Cuadro 7) y posteriormente se separaron a través de un sistema Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad Laboratories) durante 80 min a 120 Volts a 4 °C.

Separadas las proteínas, se realizó la transferencia (Anexo C-1) de éstas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando una cámara semi-seca (Trans-Blot SD de Bio-Rad Laboratories), durante 18 min para Actina y 9 min para IL-6, ambos a 15 volts. Se verificó la transferencia de las mismas tiñendo el gel con rojo de ponceau.

Utilizando el Snap i.d. Protein Detection Sistem de Millipore, los sitios no específicos de la membrana se bloquearon con solución bloqueadora al 0.5% (Anexo C.2), después se incubó la membrana con el anticuerpo monoclonal de

interés (IL-6, Actina, 1:3333 en solución bloqueadora al 0.5%) 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se lavó tres veces con TTBS (Anexo C.3). Una vez lavada la membrana se incubó con el segundo anticuerpo (1:3333 en solución bloqueadora al 0.5%) 10 min a temperatura ambiente, después, se hicieron tres lavados con TTBS.

Finalmente la membrana se incubó con solución de quimioluminiscencia (Roche Molecular Biochemicals) en la oscuridad y se expuso a una película fotográfica Kodak BioMax Light (Eastman Kodak Company Rochester, NY) a distintos tiempos, dependiendo de la proteína a detectar. Para el revelado y fijación de la película se emplearon soluciones comerciales (Kodak). Las bandas se cuantificaron con Software Image J versión 1.39, y los valores se presentaron como porcentaje de intensidad de pixeles.

Cuadro 7. Mezcla de reactivos para la concentración de geles para SDS-PAGE (Anexo B.2)

Reactivos	Gel separador 10%	Gel condensador 3%
Acrilamida-Bis-Acrilamida	2.49 mL	0.6 mL
Tris-HCl-SDS pH 8.8	2.5 mL	-----
Tris-HCl-SDS pH 6.8	-----	0.75 mL
Glicerol	1.0 mL	-----
H ₂ O °HPLC	1.5 mL	1.95 mL
Persulfato de amonio	80 µL	80 µL
Temed	8 µL	8 µL

V.2.9.3.2 Inmunoblot

V.2.10 Análisis estadístico

Todos los resultados fueron analizados en el programa estadístico JMP (versión 5.0.1), mediante ANOVA (P<0.05), utilizando la prueba de Tukey y Dunnett.

VI RESULTADOS

VI.1 Consumo de agua y alimento

En el Cuadro 8, se muestra el consumo de agua y alimento para los diferentes tratamientos. Se observa que el grupo de menor consumo tanto de agua como de alimento al día, corresponde al grupo de EP (330.0 ± 11.54 mL/día y 107.0 ± 17.35 gr/día, en agua y alimento respectivamente) con diferencia estadística respecto al Control (613.33 ± 6.66 mL/día y 206.58 ± 29.54 gr/día, en alimento y agua respectivamente), mientras que los grupos que mayor consumo tuvieron tanto de agua como de alimento fueron el Control y el AOM (556.67 ± 17.63 mL/día y 228.1 ± 26.12 gr/día, en alimento y agua respectivamente).

Cuadro 8. Consumo de agua y alimento en los diferentes tratamientos.

GRUPO	ADMINISTRACIÓN	CONSUMO DE AGUA* (mL/día)	CONSUMO DE ALIMENTO* (gr/día)
Control	Solución salina	613.33 ± 6.66^A	206.58 ± 29.54^{AB}
FC	Frijol cocido	490.0 ± 20.0^{BC}	146.66 ± 24.56^{AB}
EP	Extracto de polisacáridos	330.0 ± 11.54^{DE}	107.0 ± 17.35^B
AOM	-----	556.67 ± 17.63^{AB}	228.1 ± 26.12^A
AOM + FC	Frijol Cocido	450.0 ± 11.55^C	124.66 ± 22.4^{AB}
AOM + EP	Extracto de polisacáridos	396.66 ± 52.38^{CD}	130.0 ± 20.81^{AB}

FC = Frijol cocido (3.2 g/Kg de peso corporal) EP = Extracto de polisacáridos (1.84 g/Kg de peso corporal), AOM = Azoximetano (15 mg/Kg de peso corporal). * Delta representativa del promedio de cada grupo (n=10) \pm error estándar. Letras diferentes por columna indican diferencia estadística con prueba de Tukey, $\alpha=0.05$.

VI.1.1 Ganancia de peso

En el Cuadro 9 se muestra el efecto de los diferentes tratamientos sobre la ganancia de peso. Se observa que en los grupos FC (166.0 ± 6.18 gr/5 semana), AOM + FC (145.0 ± 3.75 gr/5 semana) y AOM + EP (162.0 ± 4.16 gr/5 semana) hay menor ganancia de peso respecto al Control (194.0 ± 6.53 gr/5 semana), presentando diferencia estadística.

Cuadro 9. Ganancia de peso en los diferentes tratamientos.

GRUPO	ADMINISTRACIÓN	GANANCIA DE PESO* (gr/5 semana)
Control	Solución salina	194.0 ± 6.53^{AB}
FC	Frijol cocido	166.0 ± 6.18^{CD}
EP	Extracto de polisacáridos	173.0 ± 8.69^{BC}
AOM	-----	208.0 ± 7.42^A
AOM + FC	Frijol Cocido	145.0 ± 3.75^D
AOM + EP	Extracto de polisacáridos	162.0 ± 4.16^{CD}

FC = Frijol cocido (3.2 g/Kg de peso corporal) EP = Extracto de polisacáridos (1.84 g/Kg de peso corporal), AOM = Azoximetano (15 mg/Kg de peso corporal). *Delta representativa del promedio de cada grupo (n=10) \pm error estándar. Letras diferentes por columna indican diferencia estadística con prueba de Tukey, $\alpha=0.05$.

VI.2 Efecto del consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su EP sobre el perfil lipídico en el suero de ratas.

VI.2.1 Niveles de colesterol

El contenido de colesterol sérico (Figura 13) no mostró diferencia estadística significativa entre los tratamientos FC, EP y AOM + FC. El grupo de tratamiento de AOM + EP presentó la mayor concentración (97.98 ± 1.66 mg/dL).

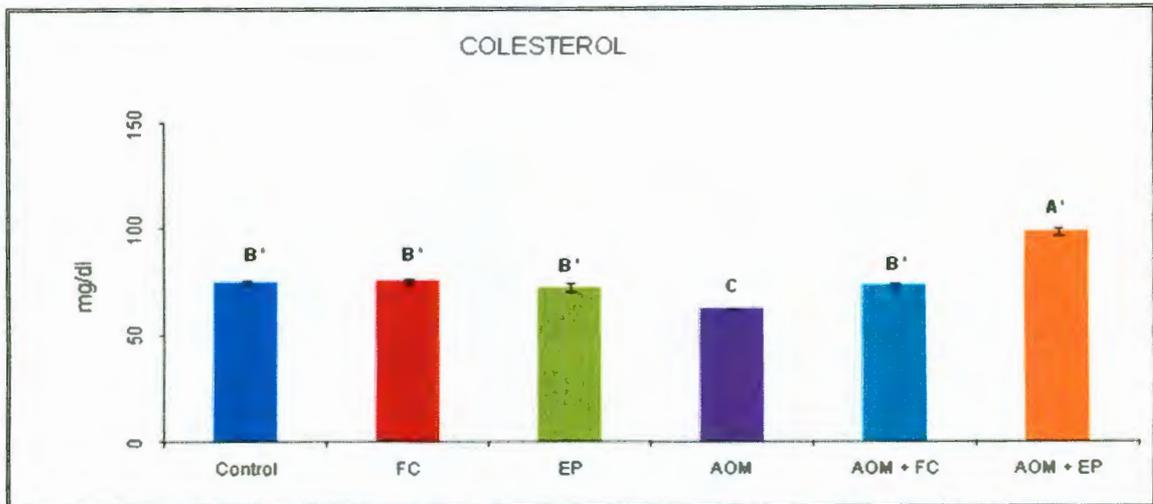


Figura 13. Efecto del consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su EP sobre los niveles de colesterol. Cada valor representa la media \pm el error estándar de 3 repeticiones. FC = Frijol cocido (3.2 g/Kg de peso corporal), EP = Extracto de polisacáridos (1.84 g/Kg de peso corporal), AOM = Azoximetano (15 mg/Kg de peso corporal). Las letras diferentes indican diferencia con base en la prueba de Tukey y los asteriscos diferencia con respecto al control de AOM por prueba de Dunnett $\alpha=0.05$.

VI.2.2 Niveles de triacilglicéridos (TAG)

En los triacilglicéridos (Figura 14), se observan mayores niveles de éstos en los diferentes grupos respecto al Control (16.72 ± 0.73 mg/dL) y es estadísticamente diferente a comparación del grupo AOM + FC. El grupo de tratamiento que presentó mayor nivel de TAG fue AOM + EP (44.12 ± 0.77 mg/dL).

VI.2.3 Niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL)

En cuanto a los niveles de lipoproteínas HDL (Figura 15), éstos se ven modificados por los tratamientos FC (45.00 ± 1.38 mg/dL) y EP (43.07 ± 0.93 mg/dL) respecto al Control (53.71 ± 0.72 mg/dL), mientras que los tratamientos AOM + FC (53.10 ± 1.31 mg/dL) y AOM + EP (53.79 ± 1.78 mg/dL) no se modifican.

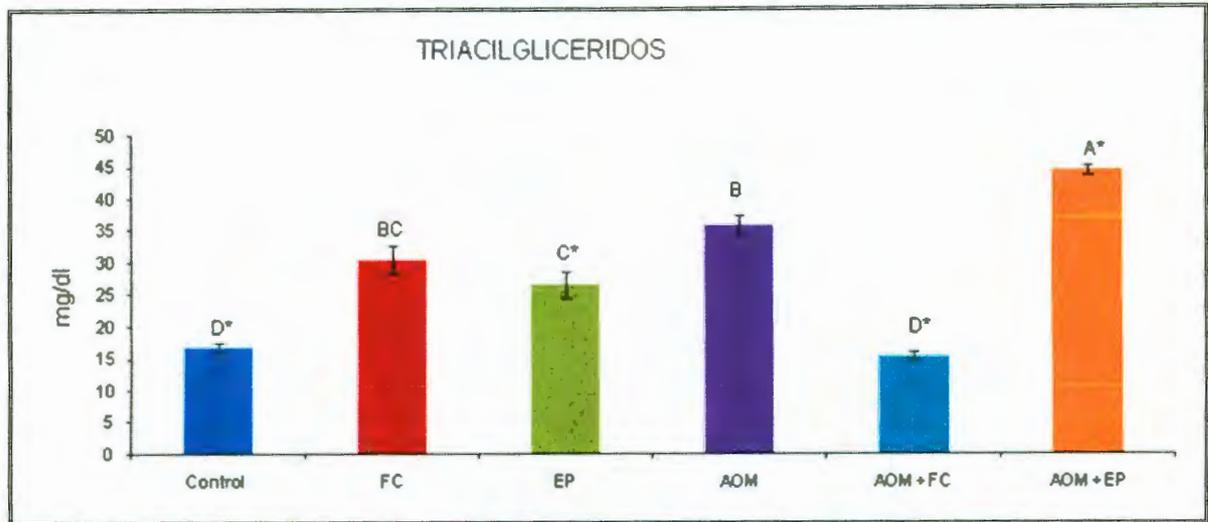


Figura 14. Efecto del consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su EP sobre los niveles de TAG. Cada valor representa la media \pm el error estándar de 3 repeticiones. FC = Frijol cocido (3.2 g/Kg de peso corporal), EP = Extracto de polisacáridos (1.84 g/Kg de peso corporal), AOM = Azoximetano (15 mg/Kg de peso corporal). Las letras diferentes indican diferencia con base en la prueba de Tukey y los asteriscos diferencia con respecto al control de AOM por prueba de Dunnett $\alpha = 0.05$.

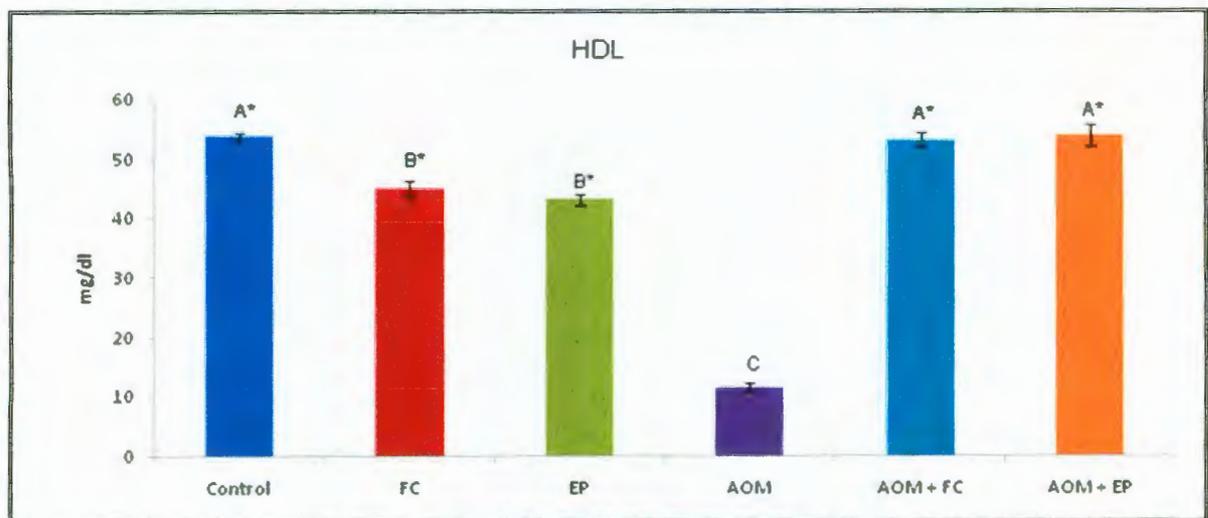


Figura 15. Efecto del consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su EP sobre los niveles de HDL. Cada valor representa la media \pm el error estándar de 3 repeticiones. FC = Frijol cocido (3.2 g/Kg de peso corporal), EP = Extracto de polisacáridos (1.84 g/Kg de peso corporal), AOM = Azoximetano (15 mg/Kg de peso corporal). Las letras diferentes indican diferencia con base en la prueba de Tukey y los asteriscos diferencia con respecto al control de AOM por prueba de Dunnett $\alpha = 0.05$.

VI.2.4 Niveles de lipoproteína de baja densidad (LDL)

Los niveles séricos de lipoproteínas LDL (Figura 16), también se ven modificados por los tratamientos. Se observa mayor decremento en el grupo tratado con FC (0.74 ± 0.06 mg/dL).

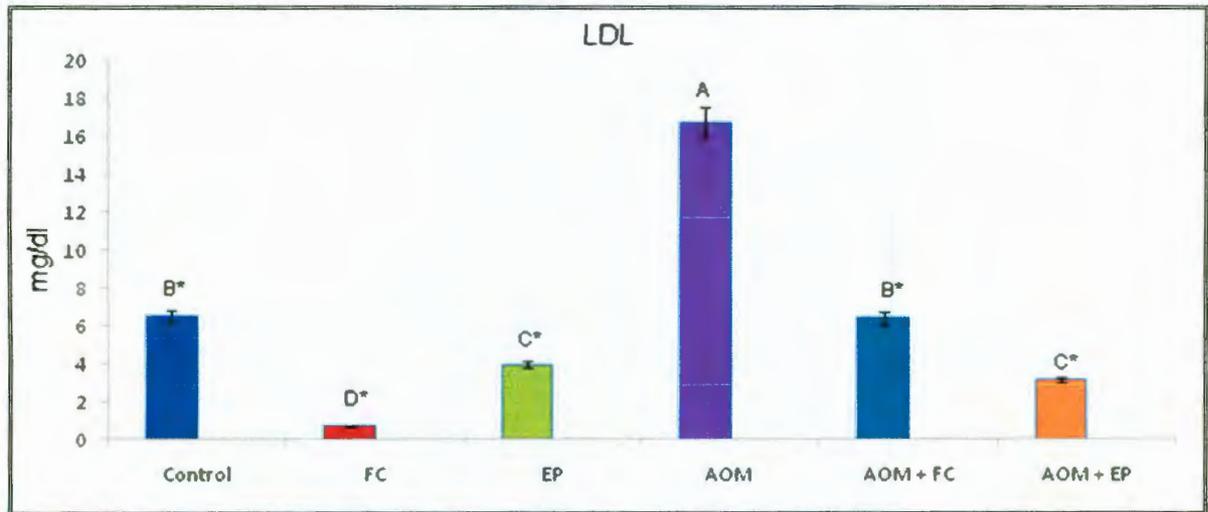


Figura 16. Efecto del consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su EP sobre los niveles de LDL. Cada valor representa la media \pm el error estándar de 3 repeticiones. FC = Frijol cocido (3.2 g/Kg de peso corporal), EP = Extracto de polisacáridos (1.84 g/Kg de peso corporal), AOM = Azoximetano (15 mg/Kg de peso corporal). Las letras diferentes indican diferencia con base en la prueba de Tukey y los asteriscos diferencia con respecto al control de AOM por prueba de Dunnett $\alpha = 0.05$.

En el Cuadro 10 se muestran los datos numéricos de los niveles de colesterol, TAG, HDL y LDL en los diferentes tratamientos (Control, FC, EP, AOM, AOM + FC y AOM + EP).

VI.3 Efecto del consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su EP sobre la expresión de interleucina 6 (IL-6)

En la Figura 17 se muestra la expresión de la interleucina IL-6 como indicador de inflamación, y de actina, la cual se utilizó como control de carga.

Cuadro 10. Efecto del consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su EP sobre el perfil lipídico en suero de ratas.

Grupo	Colesterol	TAG	HDL	LDL
Control	75.05 ± 0.85 ^{B*}	16.72 ± 0.73 ^{D*}	53.71 ± 0.72 ^{A*}	6.56 ± 0.43 ^{B*}
FC	75.83 ± 0.93 ^{B*}	30.38 ± 2.13 ^{BC}	45.00 ± 1.38 ^{B*}	0.74 ± 0.06 ^{D*}
EP	72.46 ± 1.95 ^{B*}	26.43 ± 1.98 ^{C*}	43.07 ± 0.93 ^{B*}	3.96 ± 0.406 ^{C*}
AOM	62.35 ± 0.42 ^C	35.65 ± 1.57 ^B	11.39 ± 0.82 ^C	16.75 ± 0.69 ^A
AOM + FC	73.20 ± 1.04 ^{B*}	15.12 ± 0.79 ^{D*}	53.10 ± 1.31 ^{A*}	6.42 ± 0.58 ^{B*}
AOM + EP	97.98 ± 1.66 ^{A*}	44.12 ± 0.77 ^{A*}	53.79 ± 1.78 ^{A*}	3.16 ± 0.27 ^{C*}

Los resultados son expresados en mg/dl y representan la media ± el error estándar de 3 repeticiones. FC = Frijol cocido (3.2 g/Kg de peso corporal) EP = Extracto de polisacáridos (1.84 g/Kg de peso corporal), AOM = Azoximetano (15 mg/Kg de peso corporal). Las letras diferentes indican diferencia con base en la prueba de Tukey y los asteriscos diferencia con respecto al control de AOM por prueba de Dunnett $\alpha = 0.05$.

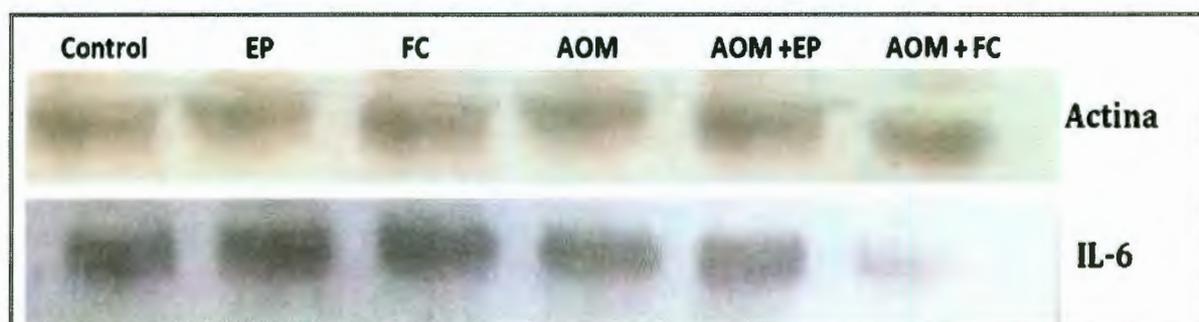


Figura 17. Expresión de Interleucina IL-6 en la porción distal del colon. FC = Frijol cocido (3.2 g/Kg de peso corporal), EP = Extracto de polisacáridos (1.84 g/Kg de peso corporal), AOM = Azoximetano (15 mg/Kg de peso corporal).

En el Cuadro 11 se muestra la influencia de los tratamientos sobre la expresión de IL-6 en intensidad de pixeles, mostrando diferencia estadística en los grupos de AOM + FC (57.78 ± 2.1%) y AOM + EP. (92.38 ± 2.3 %), en intensidad de pixeles respecto al Control.

Cuadro 11. Influencia de los tratamientos sobre la expresión de Interleucina IL-6, de la porción distal de colon

Grupo	Intensidad de pixeles (%)
Control	100 \pm 2.8 ^{A*}
FC	95.21 \pm 2.0 ^{A*}
EP	102.65 \pm 3.5 ^{A*}
AOM	85.28 \pm 2.6 ^B
AOM + FC	57.78 \pm 2.1 ^{C*}
AOM + EP	92.38 \pm 2.3 ^B

*Los resultados representan la media \pm el error estándar. FC = Frijol cocido (3.2 g/Kg de peso corporal) EP = Extracto de polisacáridos (1.84 g/Kg de peso corporal), AOM = Azoximetano (15 mg/Kg de peso corporal). Las letras diferentes indican diferencia con base en la prueba de Tukey y los asteriscos diferencia con respecto al control de AOM por prueba de Dunnett $\alpha= 0.05$.

Cuadro 11. Influencia de los tratamientos sobre la expresión de Interleucina IL-6, de la porción distal de colon

Grupo	Intensidad de pixeles (%)
Control	100 \pm 2.8 ^{A*}
FC	95.21 \pm 2.0 ^{A*}
EP	102.65 \pm 3.5 ^{A*}
AOM	85.28 \pm 2.6 ^B
AOM + FC	57.78 \pm 2.1 ^{C*}
AOM + EP	92.38 \pm 2.3 ^B

*Los resultados representan la media \pm el error estándar. FC = Frijol cocido (3.2 g/Kg de peso corporal) EP = Extracto de polisacáridos (1.84 g/Kg de peso corporal), AOM = Azoximetano (15 mg/Kg de peso corporal). Las letras diferentes indican diferencia con base en la prueba de Tukey y los asteriscos diferencia con respecto al control de AOM por prueba de Dunnett $\alpha= 0.05$.

VII. DISCUSIÓN

VII.1 Ganancia de peso

La mayor ganancia de peso al término del experimento se observó en el grupo Control y el AOM (Cuadro 9). Muestra que la menor ganancia de peso fue para los tratamientos en los que se administró el FC y su EP solos o en presencia de AOM, misma tendencia que se observó en el consumo de agua y alimento (Cuadro 8). Los resultados sugieren que, debido al consumo de frijol, como fuente de fibra, se produce una mayor sensación de saciedad y por lo tanto reduce el volumen de ingesta (Serrano y Goñi, 2004),

VII.2 Efecto del consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su EP sobre el perfil lipídico en el suero de ratas.

VII.2.1 Niveles de colesterol

Los niveles de colesterol sérico no presentan diferencia entre los tratamientos FC, EP, AOM + EP, comparados con el Control (Figura 13 y Cuadro 10), sin embargo en el tratamiento AOM el nivel de colesterol disminuye y es estadísticamente diferente al Control. Contrario a lo que se esperaba, el tratamiento AOM + EP fue el que presentó mayor valor de colesterol.

El efecto hipercolesteromiante observado en el grupo AOM + EP se podría atribuir en parte, a los efectos mediados por los AGCC derivados del metabolismo de los polisacáridos, principalmente el ácido acético, ya que éste se produce en mayor proporción, de acuerdo a lo informado por Feregrino Pérez y col. (2008), para el mismo modelo (Ácido acético: Ácido propiónico: Ácido butírico / 79:12:9) . Se ha demostrado que el ácido acético aumenta los niveles de colesterol (Teitelbaum y Walker, 2002; Sanz y col., 2004) y además, estudios realizados por Zambell y col. (2003), reportan que los colonocitos operan en la síntesis de lípidos, vía distinta a la del hígado, mediante la incorporación a lípidos de AGCC y cuerpos cetónicos

principalmente. Otros autores informan que el ácido acético (principal AGCC en el colon) entra en la circulación periférica para ser metabolizado por los tejidos periféricos. Después de su absorción se ha demostrado que aumenta la síntesis de colesterol, ya que una vez que entra en el hepatocito se activa la enzima acetil-coenzima A sintetasa 2 citosólica y queda incorporado a los procesos de colesterogénesis y lipogénesis, motivo por el cual se ha propuesto como la base del efecto hipercolesterolemiante de algunos hidratos de carbono no digeribles (Delzenne y Williams, 2002; Wong y col, 2006).

VII.2.2 Niveles de triacilglicéridos (TAG)

Los niveles de TAG (Figura 14 y Cuadro 10) se ven modificados por los tratamientos observándose una disminución con diferencia estadística en el grupo de tratamiento de AOM + FC (15.12 ± 0.79 mg/dl), respecto al AOM (35.65 ± 1.57 mg/dl) en las concentraciones probadas (15 mg/Kg y 3.2 g/Kg de peso corporal, de AOM y FC respectivamente). Se observa un incremento estadísticamente diferente con respecto al Control en el grupo de FC, EP, AOM y AOM + EP. El aumento de TAG en los grupos FC y EP podría estar dado por los procesos de lipogénesis a los que son sometidos los hidratos de carbono no digeribles presentes en el frijol, debido a los efectos mediados por los AGCC derivados del metabolismo de los polisacáridos como anteriormente se detalló. Moral y col. (2003), mencionan que al parecer no solo la acción de los prebióticos modifican el contenido lipídico sérico, sino que también están influyendo por el estado nutricional y fisiológico. Así, puede sugerirse que la disminución de los niveles de TAG en el grupo de AOM + FC se debe al estado fisiológico, en donde las ratas de experimentación se encuentran en etapas tempranas de cáncer de colon inducido químicamente, teniendo sólo así el efecto positivo al administrarles el FC. Este dato es conveniente ya que Bruce y col., 2000, señalan que los TAG pueden tender a incrementar el crecimiento de lesiones precursoras del cáncer de colon y por lo tanto, un control hacia la baja de las concentraciones séricas de TAG tendría un efecto protector sobre cáncer de colon en estadios tempranos, al haber una menor absorción de grasa.

VII.2.3 Niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL)

En cuanto a los niveles de lipoproteínas HDL (Figura 15 y Cuadro 10), se observa que los valores son menores respecto al Control al implementar los tratamientos de FC y EP por sí solos, mostrando el grupo de AOM el menor valor, pero en los grupos FC + AOM y EP + AOM, los valores no son estadísticamente diferentes al Control.

Contrario a lo que se esperaba, tanto el FC como su EP administrados por sí solos, tienen efecto sobre las HDL (llamado colesterol "bueno", ya que lleva el exceso de colesterol de los tejidos al hígado para su metabolismo o excreción), dato que no sería conveniente, aún cuando se ha informado que el almidón resistente tipo 1 (presente tanto en FC como en EP) se relaciona con el aumento de lipoproteínas HDL (Moral y col, 2003). Cabe destacar que en los tratamientos AOM + FC y AOM + EP los valores de HDL son muy similares a los del Control, un hallazgo que podría ser prometedor debido a la valiosa función de dicha lipoproteína, ya que estaría contribuyendo con la menor absorción de grasa en tejido y por lo tanto, al menor riesgo de promover el crecimiento de lesiones precursoras del cáncer de colon, en presencia del AOM inductor de cáncer de colon.

VII.2.4 Niveles de lipoproteína de baja densidad (LDL)

Los niveles séricos de las lipoproteínas LDL (Figura 16 y Cuadro 10), son menores en los grupos de tratamiento de FC, EP, y AOM + EP respecto al Control, siendo del grupo de AOM el que mayor nivel presentó. Se puede apreciar que los tratamientos de AOM + FC y el AOM + EP presentan niveles menores y son estadísticamente diferentes al grupo AOM. Resultados que sugieren que en presencia del carcinógeno (AOM), tanto el FC como el EP ayudan a controlar los niveles de LDL. Estudios en animales y humanos apoyan la hipótesis de que la fibra dietética disminuye la absorción de lípidos y la reabsorción de sales biliares, aumentan su excreción fecal y reduce los niveles de colesterol total y LDL (Cañedo-

Argüelles, 2006). Se ha informado que el consumo de dietas ricas en fibra se asocia con una menor prevalencia de algunas enfermedades crónicas tales como el estreñimiento, la diverticulosis, obesidad, dislipidemia, diabetes tipo II y algunos tipos de cáncer. Un estudio realizado por Notarnicola y col., 2005, reporta el perfil lipídico sérico en pacientes con cáncer de colon con y sin metástasis a distancia, demostrando una asociación positiva entre los valores altos de colesterol total y LDL con la metástasis, independientemente del sexo, edad y el índice de masa corporal.

La asociación entre el riesgo y desarrollo acelerado de la carcinogénesis de colon con los niveles altos de LDL se podría fundamentar en la oxidación de esta lipoproteína y en sus efectos, ya que los componentes de las LDL como los ácidos grasos insaturados, el colesterol y residuos de aminoácidos de las apoproteínas son fácilmente oxidadas (LDL en su forma oxidada) (Mathews y col., 2004). Estos, una vez oxidados pueden dañar moléculas biológicas esenciales, tales como ácidos grasos poliinsaturados, DNA, proteínas y carbohidratos, conduciendo a un daño en el funcionamiento celular. Además, las LDL oxidadas producen una respuesta inflamatoria por activación de factores nucleares, apoptosis, estimulación de la coagulación, inducción de la peroxidación masiva en las lesiones e inhibición de la producción de monóxido de nitrógeno (Pérez, 2007). Datos recientes de modelos de cáncer en ratones y humanos han establecido que la inflamación promueve un microambiente tumoral y es un componente crítico de la promoción y progresión tumoral (Wan-Wan y Karin, 2007).

Por lo tanto, la administración de FC y/o su EP en presencia o no de AOM modifican positivamente los valores de las lipoproteínas LDL con una tendencia hacia el decremento, mostrándose más favorecido un estadio temprano de cáncer de colon con la administración de EP.

VII.3 Efecto del consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) y su EP sobre la expresión de interleucina 6 (IL-6)

Para la expresión de interleucina IL-6 (Figura 17 y Cuadro 11), se observa que en los grupos tratados con AOM existe diferencia estadística respecto al Control, siendo el grupo AOM + FC el que presentó menor expresión de IL-6 (42% respecto al Control), mientras que en el grupo AOM + EP la expresión de IL-6 solo fue 7.6 % menor. Este efecto de menor expresión revela una respuesta positiva ante la administración de FC en etapas tempranas de cáncer, debido a la baja expresión de interleucina IL-6 (un potente inductor de fase aguda de inflamación). Al respecto, se ha informado que IL-6 incrementa su nivel de expresión en estadios hiperplásico/displásicos de carcinogénesis de colon, atenuándose sus valores con dietas de frijol Navy y sus fracciones en ratones inducidos con AOM (Mentor-Marcel y col., 2009). Así se puede decir que aún, en un estadio temprano de cáncer se puede atenuar el nivel de expresión de IL-6 con la administración de FC, siendo éste el de mayor efecto positivo. Los grupos de tratamiento FC y EP, no mostraron diferencia estadística respecto al Control, lo que sugiere que este tipo de dieta no tiene relación con un estado de inflamación en las condiciones probadas.

Por otro lado, IL-6 parece estar también relacionada con alteraciones en el perfil lipídico. De hecho, la IL 6 se ha relacionado con la aparición de dislipidemia en sujetos con síndrome metabólico. El efecto de IL-6 sobre el metabolismo lipídico podría depender del grado de activación de la citoquina pudiendo llegar a inhibir la acción de lipoproteín-lipasa hepática, sin afectar a la concentración plasmática de colesterol (Goyenechea y col., 2005).

Así, IL-6 además de estar involucrada en el ambiente pro-inflamatorio, estaría participando en parte del metabolismo lipídico, por lo que se sugiere que IL-6 podría ser estudiada en distintas rutas metabólicas del equilibrio lipídico y poder establecer una mejor participación y comportamiento ante sus posibles variables dependientes de su expresión.

VIII. CONCLUSION

A las concentraciones estudiadas, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) y su extracto de polisacáridos de la variedad Negro 8025 modifican los niveles séricos de lipoproteínas, positivamente las lipoproteínas de baja densidad (LDL), en etapas tempranas de cáncer de colon inducido químicamente.

VII BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal V. S., Pastor-Corrales M. A., Chirwa R. M., Buruchara R. A. 2004.** Andean bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with resistance to angular leaf spot pathogen (*Phaeoisariopsis griseola*) in southern and eastern Africa. *Euphytica*. Vol.136: 201 - 210.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Rark M., Robert K., Watson J. 2000.** *Biología Molecular de la célula*. 3a ed. Omega, México D.F: 1345 - 1347, 1365, 1378 -1382.
- Aparicio-Fernandez X., Manzo-Bonilla L. y Loarca-Pina G. F. 2005.** Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans *Phaseolus vulgaris* against aflatoxin B1. *J Food Sci*. Vol. 70(1): S73 - S78.
- Bednar G., Patil A., Murray S., Grieshop C., Merchen N., Fahey G. 2001.** Starch and fiber fractions in selected foods and feed ingredients affect their small intestine digestibility and fermentability and their large bowel fermentability and their large bowel fermentability in vitro in a canine model. *J Nutr*. Vol. 131: 276 -286.
- Bruce W, Wolever T, Giacca A. 2000.** Mechanisms linking diet and colorectal cancer: the possible role of insulin resistance. *Nutr Cancer*. Vol. 37 (1):19 - 26.
- Cañedo-Argüelles C, 2006.** Fibra dietética. *Rev Pediatr Aten Primaria*. Vol. 8: Supl 1: S83 - 97.
- Casimiro C. P. 2002.** Factores etiopatogénicos en el cáncer colorrectal. Aspectos nutricionales y de estilo de vida (segunda de dos partes). *Nutr. Hosp*. Vol. 17(3): 128 - 138.
- Darce G. E. 2007.** Comportamiento Clínico-patológico y endoscópico del Cáncer Colorrectal en pacientes del Hospital. Escuela Oscar Danilo Rosales Argüello 2003 - 2006. Tesis para optar al título de especialista en cirugía general.
- Delzenne N. M., y Kok N. 2001.** Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *Am J Clin Nutr*. Vol. 73 (2 suppl): 456S - 458S.
- Delzenne N. M. y Williams C. M. 2002.** Prebiotics and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. Vol.13: 61 - 67.

Eblen-Zaifur A., y Eblen-Zaifur M. 2001. Cálculo de la concentración de colesterol de la lipoproteína de baja densidad: análisis de regresión *versus* fórmula de Friedewald. *Revista Médica de Chile.* Vol. 129 (11): 1267 - 1270.

Escudero Álvarez E., and González P. 2006. Dietary fibre. *Nutr. Hosp.* Vol. 21 (Supl. 2): 60 - 71.

Feregrino-Pérez A. A., Berumen L. C., García-Alcocer G., Guevara-González R. G., Reinoso-Camacho R., Acosta-Gallegos J. A., and Loarca-Piña G. 2008. Composition and Chemopreventive Effect of Polysaccharides from Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on Azoxymethane-Induced Colon Cancer. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 56: 8737 - 8744.

Ferrer B., Dalmau J. 2001. Alimentos funcionales. *Acta Pediatr Esp.* Vol. 59: 150 - 155.

Finley J. W., Burrell J. B., and Reeves P. G. 2007. Pinto Bean Consumption Changes SCFA Profiles in Fecal Fermentations, Bacterial Populations of the Lower Bowel, and Lipid Profiles in Blood of Humans. *American Society for Nutrition J. Nutr.* Vol. 137: 2391 - 2398.

García P. P., Álvarez V: 2000. Fibra y salud. *Nutrición y obesidad.* Vol. 3: 127 -135.

García P. P., Breton L. C., de la Cuerda C., y Álvarez M. C. 2002. Metabolismo colónico de la fibra. *Nutr Hosp.* Vol. 17: 11 - 16.

González G. 2000. Efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de fibra dietética total, soluble e insoluble en algunas leguminosas. *Arch. Lat. Nutr:* Vol. 50: 281 - 285.

Goñi I., Martin-Carron N. 2003. Fermentación colónica de fibra dietética y almidón resistente. En: Lajolo F, Saura-Calixto F, Witting de refina E. Menezes. *Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología Sr salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos.* Editorial Varela, Sao Paulo: 311 - 338.

Goyenechea E., Parra M. D., Martínez J. A. 2005. Implicación de la IL-6 y su polimorfismo -174>C en el control del peso corporal y en las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad. *An Sist Sanit Navar.* Vol. 28(3): 357 - 366.

Guarner F. 2000. El colon como órgano: hábitat de la flora bacteriana. *Alim Nutri Salud.* Vol. 7(4): 99 - 106.

- Gund S. 2008.** www.nlm.nih.gov. Enero de 2009.
- Guzmán-Maldonado S. H., y Paredes- López L. O. 1998.** Functional products of plant indigenous to Latin America, quinoa, common beans and botanicals. Functional Foods. Biochemical and processing Aspects. Technomic, Lancaster. Vol. 37: 239 - 28.
- Ha M. A., Jarvis M. C., Mann J. L. 2000:** A definition for dietary fibre. Eur J Clin Nutr. Vol. 54: 861 - 864.
- Herrera I., González E., Romero J.1998.** Fibra dietética soluble, insoluble y total en leguminosas crudas y cocidas. Arch Lat. Nutr. Vol. 48: 179 - 182.
- INC. 2008.** Instituto Nacional del Cáncer. Noviembre 16 de 2008.
- King E. S. J., Varasdi G. 1959.** Experimentally induced tumors of the intestine. Aust New Zeal. J Surg. Vol. 29: 38 - 53.
- Kurtzman R. H. J. R, y Halbrook W. U. 1970.** Polysaccharide from dry Navy beans, *Phaseolus vulgaris*: Its isolation and stimulation of *Clostridium perfringens*. Applied Microbiology. Vol. 20(5): 715 - 719.
- Lakshman M., Subraniam V., Jothy S. 2004.** CD44 negatively regulates apoptosis in murine colonic epithelium via the mitochondria pathway. Exp Mol Path. Vol. 76: 196 - 204.
- Lars Lind. 2003.** Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. Atherosclerosis. Vol. 169: 203 - 214.
- López J. M., y Picazo. 2008.** www.cun.es/areadesalud/enfermedades/aparato-digestivo/cancer-de-colon/. Diciembre 16 de 2008.
- Marquart L., Slavin J.L., and Fulcher R.G. 2002.** Whole-Grain foods in health and disease. American Association of cereal Chemists, Inc. St. Pauli Minesota, U.S.A.: 210 - 211, 214 - 222.
- Mathews C.K.,Holde K.E., Ahern K.G. 2004.** Bioquímica.3ª. ed., PEARSON. Madrid España: 701 - 714.
- Mentor-Marcel R. A., Bobe G., Barrett K. G. Young M. R., Albert P. S., Bennink M. R., Lanza E. Colburn N. H. 2009.** Inflammation-associated serum and colon markers as indicators of dietary attenuation of colon carcinogenesis in ob/ob mice. Cancer Prev Res. Vol. 2(1): 60 - 9.

- Messina M. 1999.** Legumes and soybeans: Overview of their nutritional profiles and Health Effects: Am J Cl Nutr. Vol.(Suppl) 70: 439S - 50S.
- Moral A. M., Moreno A., Martínez J. A. 2003.** Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. Nutr. Hosp. Vol. XVIII: 181 - 188.
- Murphy O. 2001.** Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. Br J. Nutr. Vol. 85 Suppl 1: S47 - S53.
- Murray R. K., Mayes P. A., Granner D. K, Rodwell. 2001.** Bioquímica de Harper. 15ª.ed., El Manual Moderno, México: 187-199, 309 - 311, 901 - 902.
- Notarnicola M., Altomare D. F., Correale M., Ruggieri E., Attoma B. D., Mastrosimini A., Guerra V., Caruso M. G. 2005.** Serum Lipid Profile in Colorectal Cancer with and without Synchronous Distant Metastases. Oncology. Vol. 68:371 - 374.
- OMS., 2008.** Organización Mundial de la Salud. Julio de 2008
- Osorio-Díaz P., Agama-Acevedo E, Carmona-García R., Tovar J., Paredes-López O., Bello-Pérez L.A. 2004.** Resistant starch and in vitro starch digestibility of cooked "ayocote" bean (*Phaseolus coccineus*). Interciencia. Vol 29: 510 - 514.
- Pérez G. Y. 2007.** Oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) y su relación con la patogénesis de la aterosclerosis. Rev CENIC Ciencias Biológicas. Vol. 38: 1: 3 - 11
- Potten, C. S. 1998.** Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death, Philos Trans R. Soc Lond B Biol Sci. Vol. 353: 821 -830.
- Pretlow T. P., Pretlow T.G. 2005.** Mutant K-RAS in aberrant crypt foci (AFC): Initiation of colorectal cancer? Biochim Biophys Acta. Vol. 1756: 83 - 96.
- Prieto J. M. 2006.** La clínica y el laboratorio: interpretación de análisis y pruebas funcionales, explicación de los síndromes, cuadro biológico de las enfermedades. 20ª. Ed., MASSON :86.
- Reddy B. S. 2004.** Studies with Azoxymethane-rat preclinical model for assessing colon tumor development and chemoprevention. Environ Mol Mutagen. Vol. 44: 26 - 35.

- Rehman Z. A. M., Salariya, and Zafar S. I. 2001.** Effect of processing on available carbohydrate content and starch digestibility of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem.* Vol. 73: 351 - 355.
- Roberfroid M. B. 2001.** Prebiotics; preferential substrates for specific germs?. *Am J Clin Nutr.* Vol.73 (suppl): 406S - 409S.
- Rodríguez C, Pablos A., Palmas W., Lantigua R., Mayeux R., Berglund L. 2002** Comparison of modifiable determinants of lipids and lipoprotein levels among Africans-Americans, Hispanics and Non-Hispanic Caucasians \leq 65 years of age living in New York City. *Am J Cardiol.* Vol. 89: 178 - 83.
- Rodríguez-Castillo L., Fernández-Rojas X. 2003.** Los frijoles (*Phaseolus vulgaris*): Su aporte a la dieta del costarricense. *Acta médica Costarricense.* Vol. 45: 120 - 125.
- Ros E y Laguna J. C. 2006.** Tratamiento de la hipertrigliceridemia: fibratos frente a ácidos grasos omega-3. *Rev Esp Cardiol Supl.* Vol. 6: 52D - 61D.
- Rosales S. R., Acosta J. A., Durán R. P., Guillén H., Pérez P., Esquivel G., y Muruaga J. S. 2003.** Diversidad genética del germoplasma mejorado de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. *Agric. Téc. Méx.* Vol. 29(1): 11 - 24.
- Ryan E.T., Yinyan M., Lawrence L.R., Mark C.W., Yiannis A.I., Davies J.P., Nilsson L.M., and Yu L. 2007** Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *The Journal of Clinical Investigation.* Vol. 117: 1968 - 1978.
- SAGARPA. 2009.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Agosto de 2009.
- Salinas-Moreno Y., Rojas-Herrera L., Sosa-Montes E. y Pérez-Herrer P. 2005.** Anthocyanin composition in black bean (*phaseolus vulgaris* l.) varieties grown in México *Agrociencia.* Vol. 39: 385 - 394.
- Sanders M. 1999,** Probiotics: a publication of the Institute of Food Safety and Nutrition. *Food technology.* Vol. 53 (11): 67 - 76.
- Sanz Y, Collado M.C., Haros M., Dalmau J. 2004.** Funciones metabólico-nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. *Acta Pediatr Esp.* Vol. 62: 520 - 526.

- Saura-Calixto F**, García-Alonso A, Goñi I., and Bravo L. **2000**. In vitro determination of the indigestible fraction in food. An alternative to dietary fiber analysis. *J Agric Food Chem.* Vol. 48: 3342 - 3347.
- Serrano J.**, y Goñi I. **2004**. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. *Archivos latinoamericanos de nutrición.* Vol. 54(1):36 - 44.
- Sesink A. L. A.** **2001**. Red meat and colon cancer: a possible role for heme. Tesis para obtener el título de Profesor: 3 - 5.
- Smith S. C.**, Jackson R., Pearson T.A., Fuster V., Yusuf S., Faergeman O., Wood D. A., Alderman M., Horgan J., Home P., Hunn M., Grundy S. M. **2004**. Principles for National and Regional Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention A Scientific Statement From the World Heart and Stroke Forum. *Circulation.* Vol.109: 3112 - 3121.
- Srisuma N**, Reungsakulrach S, Uebersax M, Bennink M. Hammerschmidt R. **1991** Cell wall polysaccharides of Navy Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* Vol. 39: 855 - 858.
- Teitelbaum J. E.** Walker W. A. **2002**. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev. Nutr.* Vol. 22:107 - 138.
- Toth B.** **1982**. Hydrazines and related compounds in colon carcinogenesis : Malt R. A. ,Williamson R. C. N. (eds). *Colonic Carcinogenesis.* 1a. Ed. Lancaster. MTP Press Limited: 165 - 176.
- Toroella M.** y Villa-Treviño S. **1998**. Bases genéticas del cáncer. Fondo de cultura Económica. México, D.F: 9 - 41.
- Valencia E.**, Muñiz J. **2000**. Frecuencia del cáncer colorrectal en el hospital regional del cusco en los años 1996,1997 y 1998. *SITUA: Setiembre 1999 - Febrero 2000, Año 8 N° 15.*
- Wan-Wan Lin** and Karin M. **2007**. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of Clinical investigation.* Vol. 17: 1175 - 1183.

- Ward J. M., Yamamoto R. S., Benjamin T., Brown C. A., Weisburger J. H. 1974.** Experimentally induced cancer of the colon in rats and mice. *JAVMA*. Vol. 164: 729 - 732.
- Warrand J. 2006:** Healthy Polysaccharides, *Food Technol. Biotechnol.* Vol. 44 (3): 355 - 370.
- Williamson R.C. Baver F. L., Terpstra O. T., Ross J. S., Malt R. A. 1980.** Contrasting effects of subtotal enteric bypass enterectomy and colectomy on azoxymethane induced intestinal carcinogenesis. *Cancer*. Vol. 40: 538 - 543.
- Wong, J. M. de Souza R., Kendall, C. W., Emam A. M., Jenkins D.J. 2006.** Fermentation and Short Chain Fatty Acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*. Vol. 40(3): 235 - 243.
- Www.medscape.elmundo.es. 2001.** Estatinas: El Desarrollo de la Enfermedad Cardiovascular y su Tratamiento con Inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A Reductasa. Noviembre de 2008.
- Zambell K., Fitch M and Fleming S. 2003.** Acetate and butyrate are the major substrates for the novo lipogénesis in rat colonic Epitelial cells. *J. Nutr.* Vol. 133: 3509 - 3515.

ANEXOS

A Cuantificación de proteínas

A.1 Solución amortiguadora pH 7.5 (Solución de extracción)

a) Reactivos

- HEPES 500 mM
- NaCl 1500 mM
- NaPP 100 mM
- Na₃VO₄ 200 mM
- MgCl₂ 10 Mm
- NaF 500 mM
- EDTA 20 mM
- PMSF 80 mM
- NP-40 1%
- Glicerol 10%
- CaCl₂ 25 mM

b) Activación de Na₃VO₄

Se realizan los calculos para la concentración deseada, se ajusta el pH a 10, usando NaOH 1N o HCl 1N (la solución se toma amarilla). Esta solución se calienta a ebullición hasta obtener una solución transparente, se enfría y se reajusta el pH a 10, se repite esta operación hasta que la solución sea totalmente transparente y el pH estable. Finalmente se alícuota y congela.

c) Preparación de la solución amortiguadora.

Para 1 mL de solución amortiguadora, se adicionan 100 µL de solución HEPES 500 mM, 100 µL de NaCl 1500 mM, 100 µL de NaPP 100 mM, 100 µL de MgCl₂ 10 mM, 20 µL de NaF 500 mM, 100 µL de EDTA 20 Mm, 66.6 µL de PMSF 60 Mm, 10 µL de Na₃VO₄ 200 mM, 100 µL de glicerol 10% y finalmente se adiciona 40 µL de

25 CaCl₂ mM, el volumen se lleva a 1 mL con agua HPLC. La solución amortiguadora se homogeniza y se mantiene en hielo durante su uso.

A.2 Reactivo de Bradford

a) Reactivos

- Azul de Coomassie G-25 (5 mg)
- Etanol 2.5 mL
- Ácido fosfórico 5 mL
- Aforar a 50 mL con agua HPLC.

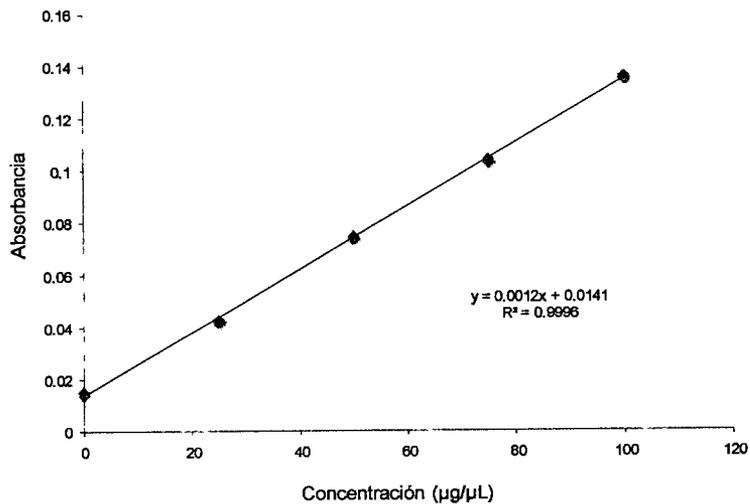
Mezclar en el orden indicado y disolver con agitación. Filtrar.

A.3 Curva de calibración

Preparar albúmina a una concentración de 1 mg/mL en un tubo de 1.5 mL y partir de ésta se hacen las diluciones respectivas para obtener las concentraciones de 100, 75, 50, 25, 0 µg/µL.

JHJHJ

Curva de Albúmina



B Electroforesis SDS-PAGE

B.1 Reactivos y preparación de solución digestora.

SDS 10%

Glicerol 30%

Tris-HCl 100 mM

Azul de bromofenol

Mercaptoetanol 4%

Agua HPLC al aforo

Se mezclan los reactivos en el mismo orden. A las muestras se les agrega la solución digestora a la misma proporción (v/v), se le colocan en baño de agua por 20 minutos a 60°C y posteriormente se ponen en hielo.

B.2 Reactivos y procedimiento.

a) Reactivos

Acrilamida 30%

Bis-acrilamida 0.938%

Tris 3M-HCl 1M-sds 0.3% pH 8.8

Tris-HCl 1M

Glicerol 79.5 % (v/v)

Solución de electroforesis inferior

Solución de electroforesis superior.

b) Gel separador 10%

En un vaso de precipitado y con agitación constante se mezclan los reactivos: Acrilamida 30% (Acrilamida + Bis-acrilamida), Tris 3M-HCl 1M-sds 0.3%, glicerol 79.5%, agua HPLC, persulfato de amonio 10% y Temed,

c) Gel de condensación

En un vaso de precipitado y con agitación constante se mezclan los reactivos: Acrilamida 30%, Tris-HCl 1M-sds 0.3% pH 6.8, agua HPLC, persulfato de amonio 10% y Temed.

d) Solución de electroforesis superior

Tris 0.1 M

Tricina 0.1 M

SDS 0.1%

Agua HPLC

Se disuelven los reactivos, se afora y se refrigera hasta su uso.

e) Solución de electroforesis inferior.

Tris-HCl pH 8.9 (0.2M).

f) Procedimiento de electroforesis SDS-PAGE

Se monta la cámara para hacer geles y se comprueba que no existan fugas, se coloca el gel separador, se sella con unas gotas de agua HPLC y se deja solidificar por aproximadamente 7 minutos. Ya solidificado se quita el residuo de agua que se observa en la superficie. Se agrega el gel de condensación, se coloca el peine y se marcan los pozos. Ya solidificado, se lavan los pozos con solución de electroforesis superior y se dejan llenos con éste. Se cargan las muestras en el gel (15 a 25 μ L). Se coloca 4 μ L del marcador o estándar para verificar el peso molecular de la proteína de interés. Se corre el gel a 120 volts por 80 minutos a 4°C.

C. Inmunoblot.

C.1 Transferencia de membrana

a) Solución de transferencia

- Tris 48 mM.
- Glicina 39 mM.

- Agua HPLC.

Se prepara 1 litro de solución y se refrigera.

b) Solución para teñir membrana

Rojo de ponceu 0.2% en metanol al 50%. Se agrega 7 mL de ácido acético por cada 100 mL.

c) Solución para destañir

Solución 1: Metanol 30% y ácido acético 10%. Se afora con agua HPLC.

Solución 2: Metanol al 50% y ácido acético al 10%. Se afora con agua HPLC.

Se destañe la membrana con solución 1 por 5 minutos, después se destañe con solución 2 por 10 minutos.

d) Procedimiento

Una vez terminada la electroforesis se despega el gel y se lava dos veces con solución de transferencia por 10 minutos. Se activa la membrana PVDF en metanol por unos segundos y luego se pasa por agua HPLC. La membrana se coloca en solución de transferencia. Se coloca el gel y la membrana en la cámara de transferencia en el siguiente orden:

1. Tres papeles filtro húmedos con solución de transferencia.
2. Membrana activada
3. Gel
4. Tres papeles filtro húmedos con solución de transferencia.

La cámara se cierra y se programa a 15 volts por 18 minutos. Al término se marca la membrana y se tiñe con rojo de ponceau.

C.2 Solución Bloqueadora al 0.5% (En TBS)

a) TBS: Se mezcla Tris-HCl pH8 0.01M, NaCl 5M (0.15M) y agua HPLC c.b.p. 1L.

La solución se prepara al momento de su uso con leche en polvo (0.05%) libre de grasa en solución de TBS. Se filtra antes de usar.

C.3 Solución de lavado TTBS

Mezclar Tris-HCl 1M pH 8 (0.001M), NaCl 5M (0.5M), Tween 20 (0.1%), agua HPLC c.b.p. 1L. Se homogeniza y se filtra.