



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPUBLICA (PROPAC)

MAESTRÍA CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Efecto de los extractos acuosos de diferentes variedades de frijol
(*Phaseolus vulgaris*) sobre células normales intestinales tratadas
con TNF α**

TESIS

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

PRESENTA

Victoria Guadalupe Aguilar Raymundo

DIRIGIDA POR

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Santiago de Querétaro, Abril 2008



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPUBLICA (PROPAC)

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Efecto de los extractos acuosos de diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) sobre células normales intestinales tratadas con TNF α

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

IBQ. Victoria Guadalupe Aguilar Raymundo

Dirigida por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

SINODALES

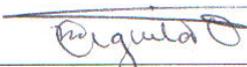
Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Presidente

Dr. Irineo Torres Pacheco
Secretario

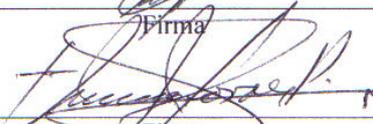
Dr. Salvador Horacio Guzmán Maldonado
Vocal

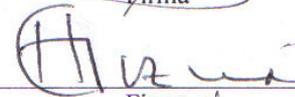
Dra. Minerva Ramos Gómez
Suplente

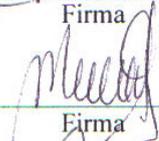
Dra. Ma. Guadalupe F. Loarca Piña
Suplente

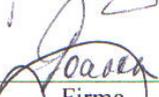

Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz
Director de la Facultad de Química

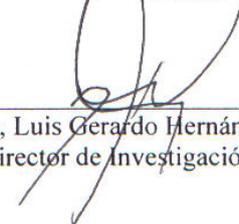

Firma


Firma


Firma


Firma


Firma


Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro universitario
Querétaro, Qro.
Junio 2008
México

RESUMEN

En México el frijol es parte importante de la dieta, y estudios realizados recientemente demuestran que esta leguminosa cocida incorporada en el alimento al 0.4% tiene la capacidad de disminuir el desarrollo de cáncer de colon. Entre los fitoquímicos presentes en frijol están los compuestos fenólicos que disminuyen el desarrollo de cáncer, sin embargo, hasta el momento se tiene poca información referente a la presencia de estos compuestos en extractos acuosos de frijol y su relación con inhibición de la proliferación y sobrevivencia de células transformadas. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue caracterizar parcialmente los compuestos fenólicos de los extractos acuosos de diferentes variedades de frijol cocido (*Phaseolus vulgaris*) y evaluar el efecto anti-promotor sobre células intestinales tratadas con TNF α . Se utilizaron diferentes variedades de frijol: Negro 8025 (N8025), Bayo Madero (BM), Pinto Zapata (PZ) e Higuera (H). El frijol se coció y se liofilizó el cotiledón con el caldo. No fue posible cuantificar los fenoles totales en el extracto acuoso, porque estos componentes se encuentran por abajo del límite de detección. Las antocianinas se encontraron en intervalos de 0.04 - 46.03 mg de cianidina-3-glucósido/g de frijol cocido, el frijol N8025 mostró la mayor concentración de estos compuestos, mientras que en el H no se detectaron, la capacidad antioxidante medida por el método de ABTS, presentó el mismo comportamiento, mayor porcentaje de inhibición el extracto del frijol N8025 (98.14 ± 0.25) y menor el extracto del frijol H (45.25 ± 0.17). El perfil y la cuantificación de compuestos fenólicos se realizó mediante HPLC (103-155 mg/100 g de muestra), predominando de manera importante el ácido ferúlico para todas las variedades. En los estudios realizados *in vitro* para inducir la transformación de líneas celulares con TNF α , se utilizaron células IEC -18. Estas se trataron con el promotor TNF α (0.1, 1.0 y 10 ng/mL) a diferentes tiempos y se observó que a las 48 hrs a 1.0 ng/mL de TNF α , se incremento la proliferación en un 40% y la sobrevivencia hasta en un 300%, en base a estos resultados, estas condiciones fueron seleccionadas para los siguientes experimentos. Con respecto al efecto de los extractos acuosos de frijol, se realizó una curva dosis-respuesta utilizando concentraciones de 0.05, 0.5 y 1.0 mg/mL y se observó con respecto al parámetro de sobrevivencia que la variedad Higuera a una concentración de 1.0 mg/mL presentó un incremento del 100% con respecto al control, estos datos sugieren que dicha leguminosa puede contener compuestos capaces de mantener viables a las células. En base a estos resultados se evaluó el efecto de las diferentes variedades de frijol (0.5 mg/mL) sobre la actividad promotora de TNF α (1.0 ng/mL). Las células tratadas con el extracto de frijol PZ antes del TNF α disminuye la proliferación en un 10%, los extractos incubados durante el tratamiento con TNF α , no mostraron ningún efecto, sin embargo cuando los extractos de PZ, H y BM se incubaron después de la exposición al promotor de tumores existe una disminución de la proliferación (8%) y de la sobrevivencia (20%). Por lo tanto, estos extractos presentan mayor capacidad para ser usados como tratamiento que como preventivo.

Palabras clave: *frijol cocido, extracto acuoso, compuestos fenólicos, antocianinas, HPLC, capacidad antioxidante (ABTS), TNF- α , células IEC-18, proliferación y sobrevivencia.*

SUMMARY

In Mexico, the common bean is an important part of the diet, and recent studies show that this legume incorporated in the food cooked at 0.4% has the ability to reduce the development of colon cancer. Among the phytochemicals present in the common beans are phenolic compounds that slow the development of cancer, but so far there is little information concerning the presence of these compounds in aqueous extracts of bean and its relationship with inhibition of proliferation and survival of transformed cells. Therefore, the purpose of this research was to characterize the phenolic compounds from aqueous extracts of different varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris*) and to assess the effect on anti-promotor intestinal cells treated with TNF- α . In this study, we used different beans varieties: Negro 8025 (N8025), Bayo Madero (BM), Pinto Zapata (PZ) and Higuera (H). The common beans were cooked and lyophilized and beans along with the broth. It was not possible to quantify the total phenols in the aqueous extract, because these components are below the detection limit. Anthocyanins are found in the range of 0.04 – 46.03 mg cianidin-3-glucósido/g cooked beans. Beans N8025 showed the highest concentration of these compounds, while the H were not detected. The antioxidant capacity measured by the method of ABTS, introduced the same behavior, the highest percentage of inhibition extract bean N8025 (98.14 ± 0.25) and lower bean an extract H (45.25 ± 0.17). The profile and quantification of phenolic compounds was performed using HPLC (103 to 155 mg/100 g of sample), and dominated significantly ferulic acid for all varieties. In studies *in vitro* to induce transformation of cell lines with TNF- α , used cells IEC-18. These were treated with TNF- α promoter (0.1, 1.0 and 10 ng / mL) at different times and it was noted that at 48 hrs to 1.0 ng / mL for TNF- α , is the increasing proliferation in a 40% and survival by up to 300%. Based on these results these conditions were selected for the following experiments. With regard to the cytotoxic effect of the aqueous extracts of bean, a dose response curve was using concentrations of 0.05, 0.5 and 1.0 mg / mL and it was noted that for the parameter survival variety H to a concentration of 1.0 mg / mL had an increase of 100% compared to the control. These data suggest that this legume may contain compounds capable of maintaining viable cells. Based on these results, the effect of different varieties of beans (0.5 mg / mL) on the promoter activity of TNF- α (1.0 ng / mL) was assessed. Cells treated with the extract of beans before PZ TNF α , to decrease proliferation by 10%. Extracts incubated during treatment with TNF α , showed no effect; however, when extracts PZ, H and BM are incubated after exposure to tumor promoter there is a decrease in proliferation (8%) and survival (20%). Therefore, these excerpts presented greater capacity to be used as a treatment as preventive.

Key words: *cook-beans, aqueus extract, phenolic compounds, anthocyanins, HPLC, antioxidant activity, TNF- α , IEC-18 cells, proliferation and survival.*

A Dios por permitirme seguir caminando y por la fortaleza que me da cada día para enfrentarme a los obstáculos de la vida

A mis padres por todo el amor y el apoyo brindado a la distancia, los amo.

A mis hermanos por todo el apoyo incondicional brindado durante todo este tiempo.

La vida es lo que te sucede mientras te dedicas a hacer otros planes
John Lennon

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la maestría

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Posgrado de Alimentos por las facilidades brindadas para el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Rosalía Reynoso Camacho por la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por la paciencia y haber compartidos sus conocimientos conmigo.

A cada uno de los miembros del comité por apoyarme y por sus conocimientos aportados para el mejoramiento de este trabajo.

A cada uno de mis compañeros de la maestría generación 2004-2006, por haber hecho de mi estancia una gran aventura.

Y a todas las personas que han compartido un pedacito de sus vidas conmigo, por las experiencias adquiridas que han hecho enriquecerme y crecer como ser humano.

A mi familia por estar en todo momento conmigo.....y a los amigos por hacer que los tiempos difíciles sean más amenos.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Cáncer	3
2.1.1. Definición	3
2.1.2. Etapas de la carcinogénesis	3
2.1.3. Clasificación de las neoplasias	4
2.2. Cáncer de colon	4
2.2.1. Factores de riesgo del cáncer de colon	5
<i>Dieta</i>	5
1. Grasa dietética	5
2. Fibra	5
3. Calcio	5
4. Trazas de metales	6
5. Vitaminas	6
2.2.2. Factores fisiológicos	6
<i>Actividad física</i>	6
<i>pH Fecal</i>	6
2.2.3. Factores genéticos	7
2.3. Genética molecular del cáncer de colon	8
2.4. Factor de necrosis tumoral α (TNF α)	8
2.5. Factor de transcripción nuclear kappa B (NF κ B)	9
2.6. Papel de COX en el desarrollo de cáncer de colon	10
2.6.1. COX 1 y COX 2	10
2.7. El papel protector de la dieta y el cáncer	11
2.7.1. Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	12
2.7.2. Frijol y Cáncer	13
2.8. Compuestos fenólicos	14
2.9. Compuestos fenólicos presentes en frijol	15
2.10. Efectos de los compuestos fenólicos sobre la prevención de cáncer de colon	16
2.11. Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	17

2.12. Estudios <i>in vitro</i> empleando modelos celulares	19
<i>III. JUSTIFICACIÓN</i>	19
<i>IV. HIPÓTESIS</i>	20
<i>V. OBJETIVOS</i>	20
1. OBJETIVO GENERAL	20
2. OBJETIVOS PARTICULARES	20
<i>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</i>	21
6.1.1. Material biológico	21
6.1.2. Materiales químicos	22
6.2. Tratamiento térmico del frijol	23
6.3. Obtención de los extractos acuosos de frijol cocido liofilizado (EA)	23
6.3.1. Cuantificación de compuestos fenólicos (Método de la vainillina)	23
6.3.2. Cuantificación de antocianinas	24
6.3.3. Capacidad antioxidante mediante el método de ABTS	24
6.4. Caracterización de los ácidos fenólicos mediante cromatografía de alta resolución (HPLC)	25
6.5. Cultivo celular	25
6.5.1. Determinación de la concentración promotora de TNF α	26
6.5.2. Efecto citotóxico del extracto acuoso de frijol liofilizado	27
6.5.3. Evaluación del efecto anti-promotor de los extractos acuosos de frijol sobre células intestinales normales	28
6.6. Análisis Estadístico	29
<i>VII. Resultados y Discusión</i>	30
1. Cuantificación de compuestos fenólicos	31
2. Cuantificación de antocianinas	30
3. Capacidad antioxidante de las diferentes variedades de frijol, mediante el método de ABTS	32
4. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en los extractos acuosos de las diferentes variedades de frijol	34
5. Determinación de TNF α sobre diferentes líneas celulares (3T3, CoN112 y IEC-18)	41
5.1. Determinación de la concentración de TNF α sobre células normales IEC-18, cuantificadas mediante el método de conteo celular	44
5.2. Efecto citotóxico del extracto acuoso de frijol cocido liofilizado	47
5.3. Efecto de los extractos acuosos de diferentes variedades de frijol sobre células IEC-18 tratadas con TNF α .	50
<i>VII. CONCLUSIONES</i>	54
<i>VIII. BIBLIOGRAFÍA</i>	56
<i>Anexos</i>	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1.	Diferentes tipos de cáncer en base al tejido en el cual se originan	4
2.	Asociación de COX-2 con cáncer en otros tejidos	10
3	Composición química del frijol común (100 g de porción comestible)	11
4.	Estructura de la serie benzoica de los ácidos fenólicos	15
5.	Estructura de la serie benzoica de los ácidos fenólicos	15
6.	Concentración de compuestos fenólicos de frijol cocido liofilizado	30
7.	Concentración de antocianinas en frijol cocido liofilizado y extracto acuoso liofilizado	32
8.	Capacidad antioxidante de las muestras liofilizadas de frijol cocido y extractos acuosos por el método de ABTS, expresadas como el porcentaje (%) de inhibición.	33
9.	Concentración de compuestos fenólicos presentes en los extractos acuosos de frijol de frijol cocido.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.	Etapas del proceso de carcinogénesis	3
2.	Secuencia típica de los cambios genéticos que marcan el desarrollo de un carcinoma de colon	8
3.	Control de células dañadas por NFκB y TNF α durante la respuesta inflamatoria	9
4.	Cromatograma de estándares de compuestos fenólicos	35
5.	Cromatograma del extracto acuoso de Bayo Madero	35
6.	Cromatograma del extracto acuoso de Higuera	37
7.	Cromatograma del extracto acuoso de N8025	38
8.	Cromatograma del extracto acuoso de Pinto Zapata	39
9a.	Efecto de diferentes concentraciones de TNF α (0.1, 1.0 y 10.0 ng/ml) durante 4, 18, 24 y 48 hrs. Sobre la proliferación de células normales 3T3.	42
9b.	Efecto de diferentes concentraciones de TNF α (0.1, 1.0 y 10.0 ng/ml) durante 4, 18, 24 y 48 hrs. Sobre la proliferación de células normales 112CoN.	42
9c.	Efecto de diferentes concentraciones de TNF α (0.1, 1.0 y 10.0 ng/ml) durante 4, 18, 24 y 48 hrs. Sobre la proliferación de células normales IEC-18.	42
10.	Efecto de diferentes concentraciones de TNF α (0.1, 1.0 y 10.0 ng/ml) sobre la proliferación (%) (a) y sobrevivencia (%) (b) de las células IEC-18.	45
11a.	Efecto citotóxico del extracto acuosos de frijol liofilizado a concentraciones de 0.05, 0.5 y 1.0 mg/ml sobre células IEC-18. (a) proliferación (%) y (b) sobrevivencia (%).	48
11b.	Efecto citotóxico del extracto acuosos de frijol liofilizado a concentraciones de 0.05, 0.5 y 1.0 mg/ml sobre células IEC-18. (a) proliferación (%) y (b) sobrevivencia (%).	48
12a.	Efecto de los extractos acuosos (0.5 mg/mL) de las diferentes variedades de frijol sobre la proliferación (a) y sobrevivencia (b) en células IEC-18 tratadas con TNF α.	51
12b.	Efecto de los extractos acuosos (0.5 mg/mL) de las diferentes variedades de frijol sobre la proliferación (%) (a) y sobrevivencia (%) (b) en células IEC-18 tratadas con TNF α.	51

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha elevado la incidencia de enfermedades crónico degenerativas como la obesidad, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. De los tipos de cáncer, el cáncer de colon presenta una mayor prevalencia en los países que tienen dieta tipo occidental; las cuales son rica en carne, grasa animal, carbohidratos pero que son pobre en fibra. Este tipo de alimentación genera aumento de peso y obesidad en la población.

En México se ha incrementado la incidencia del cáncer de colon, por lo que es importante implementar estrategias de prevención que involucren el consumo de alimentos que tengan capacidad antioxidante y/o quimioprotectora. Tal es el caso de las frutas y verduras, los cereales y las leguminosas, entre otros. Lo anterior, con la finalidad de retardar, bloquear o revertir el proceso de carcinogénesis. Los tratamientos que actualmente se utilizan para disminuir este proceso incluyen a las drogas anti-inflamatorias no esteroideas (NSAIDs, por sus siglas en inglés); sin embargo, el uso de NSAIDs presenta una desventaja: bajo ciertas condiciones pueden causar severos trastornos secundarios, tales como las úlceras gástricas. Por otro lado, se sabe que existen compuestos derivados de alimentos con acción similar a las NSAIDS, entre los cuales se pueden citar a los polifenoles.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) forma parte importante de la dieta en México, además de que representa una fuente de energía, proteína vitaminas y minerales. En los frijoles podemos encontrar cantidades considerables de compuestos fenólicos en función de la variedad. En estudios realizados en el laboratorio, se demostró que la incorporación en la dieta de 0.56% de frijol cocido de las variedades Higuera, Pinto Zapata, Negro y Bayo Madero, disminuye la incidencia de cáncer de colon en ratas inducidas químicamente. En las harinas de frijol Pinto Zapata y Negro 8025 se cuantificaron los compuestos fenólicos encontrando concentraciones de 20.52 ± 3.4 y 38.55 ± 2.14 mg eq. (+)-catequina/g extracto respectivamente. El efecto anticarcinogénico de estos frijoles podría atribuirse en parte a la presencia de estos compuestos.

En el presente trabajo, se realizó una caracterización parcial de los extractos acuosos de las diferentes variedades de frijol común. Primero, se cuantificaron los compuestos fenólicos y posteriormente se identificaron mediante HPLC. Asimismo, se cuantificó el contenido de

las antocianinas. Así también se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos acuosos con el método de ABTS. Posteriormente, se llevó a cabo estudios *in vitro* donde se evaluó el potencial anti-promotor de dichos extractos sobre células intestinales normales tratadas con un promotor de tumores, TNF α (factor de necrosis tumoral). Las células se incubaron con extractos acuosos de frijol: antes, durante y después de la exposición del promotor, se llevó a cabo un conteo celular y los resultados se expresan como porcentaje de proliferación y sobrevivencia.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cáncer

2.1.1. Definición

El cáncer es la proliferación acelerada, desordenada e incontrolada de las células de un tejido, que invaden, desplazan y destruyen localmente y a distancia otros tejidos de órganos sanos (Lodish *et al.*, 2003).

2.1.2. Etapas de la carcinogénesis

La carcinogénesis es un proceso que ocurre en múltiples etapas e incluye numerosos eventos genéticos y epigenéticos. De manera general diversos autores plantean tres etapas: a) iniciación, donde el DNA de una célula cualquiera es dañado por la acción de mutágenos (existen carcinógenos no mutagénicos); b) promoción, en la que ocurre proliferación a partir de la célula dañada y; c) progresión, estadio en el que la célula sufre cambios particulares que caracterizan esta patología (Harris, 1992; Lodish *et al.*, 2003).

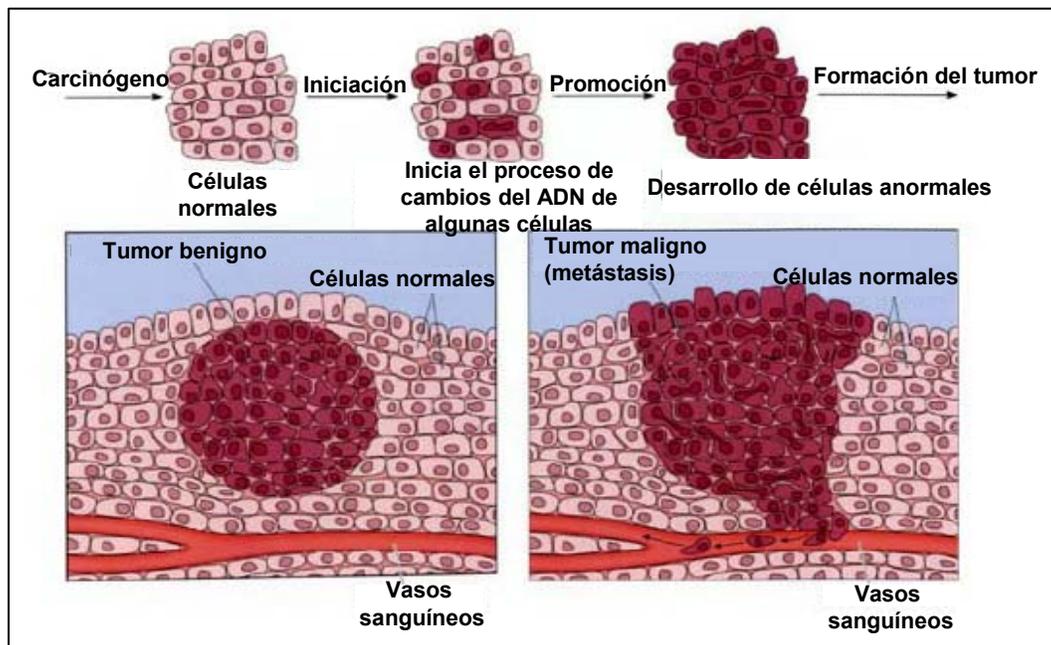


Figura 1. Etapas del proceso de carcinogénesis (Balkwill *et al.*, 2004)

2.1.3. Clasificación de las neoplasias

Las neoplasias de manera general pueden clasificarse como benignas y malignas. Lo que diferencia una neoplasia benigna de una maligna o cáncer, es el hecho de que en la primera, la formación tumoral está delimitada por una pared o cápsula que la separa del tejido circundante, y así permanece casi siempre indefinidamente. Cuando la neoplasia se maligniza o se habla de cáncer, las células tumorales no están formando una estructura bien circunscrita y local, pueden migrar y atravesar la membrana basal del tejido original y trasladarse mediante el torrente sanguíneo a otros órganos sanos. Por su origen histológico, los cánceres se clasifican en carcinomas (los más frecuentes) si derivan de la malignización de epitelios, sarcomas si lo son de células de tejido conectivo o de sostén, y leucemias o linfomas si son malignizaciones de células hematopoyéticas, (Cuadro 1) (Lodish *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Diferentes tipos de cáncer en base al tejido en el cual se originan

Leucemias	Tejido encargado de la producción de células sanguíneas: medula ósea
Carcinomas	Tejido de recubrimiento: piel, epitelio, glándulas
Sarcomas	Tejido conjuntivo: grasa, músculo, sangre
Linfomas	Sistema linfático: ganglios

(Lodish *et al.*, 2003)

2.2. Cáncer de colon

El cáncer de colon (comúnmente llamado cáncer colorrectal: CCR) es una enfermedad maligna que se origina en el intestino grueso. La mayoría de los tumores se desarrollan a partir de un pólipo adenomatoso o crecimiento benigno de las glándulas del intestino grueso, que se origina en la membrana de la mucosa del mismo (Franco *et al.*, 2005).

Aunque la etiología de este tipo de cáncer es multifactorial y compleja (Rao *et al.*, 1993), datos epidemiológicos sugieren que está asociado con la dieta y otros factores (Franco *et al.*, 2005).

2.2.1. Factores de riesgo del cáncer de colon

La dieta es uno de los factores relacionados con el estilo de vida mas importantes y que ha sido ampliamente estudiado en el desarrollo de cáncer de colon (Franco *et al.*, 2005).

1.- Grasa dietética

Estudios epidemiológicos han demostrado que dietas ricas en grasa animal están generalmente asociadas con el riesgo de cáncer de colon en el hombre. La grasa incrementa la producción de ácido biliar y en último termino aumenta la exposición de la mucosa del intestino a los efectos tóxicos de los ácidos biliares (Statland, 1992).

2.- Fibra

Se han propuesto muchos mecanismos de acción de la fibra. Por ejemplo: a través de la dilución y unión de potenciales carcinógenos, acelerando así su paso a través del colon; disminuyendo la activación de sustancias potencialmente tumorogénicas tras alterar la flora intestinal y modificar el pH, o incluso sirviendo como sustrato para la generación de ácidos grasos de cadena corta (especialmente butirato), que protegerían del desarrollo de cáncer, ya que actúan modulando la expresión génica, inhibiendo el crecimiento de líneas celulares tumorales, induciendo fenómenos de apoptosis y promoviendo la diferenciación celular (Harris y Ferguson, 1993; Franco *et al.*, 2005)

3.- Calcio

Se ha propuesto que el calcio disminuye el riesgo de cáncer de colon a través de su unión a los ácidos biliares y ácidos grasos, impidiendo así su contacto con el epitelio; hasta su acción directa, a través de un receptor específico, sobre la mucosa del colon, disminuyendo así su proliferación y favoreciendo su diferenciación (Garland *et al.*, 1999; Lamprecht y Lipkin, 2003)

4.- Traza de metales

Existen datos, procedentes de estudios epidemiológicos y en animales, que muestran que un consumo insuficiente de Selenio (Se), se asocia con un riesgo elevado de cáncer de colon, así como de otros tipos tumorales (Willet, 1986).

5.- Vitaminas antioxidantes

Se ha sugerido que el posible efecto protector de las dietas ricas en frutas y verduras en el desarrollo de cáncer colon, pudiera deberse a su alto contenido de vitamina con propiedades antioxidantes, fundamentalmente: carotenoides (precursor de la vitamina A), retinoides (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), y α -Tocoferol (vitamina E) (Troock *et al.*, 1990; Block *et al.*, 1992). Las moléculas antioxidantes prevendrían el daño oxidativo del DNA, mediante la inhibición de la acción de los radicales libres, además posible implicación de alguna de estas vitaminas (por ejemplo vitamina E) en los fenómenos de la proliferación celular, como parte de los mecanismos de generación de señales intracelulares (Babbs, 1990).

2.2.2. Factores fisiológicos

Actividad física

Diversos estudios indican que el riesgo relativo de padecer cáncer de colon aumenta con la baja actividad física (Slattery *et al.*, 1990). La actividad ocupacional vigorosa (ejercicio) muestra una reducción de cáncer de colon en hombres (Kritchevsky, 1993).

pH fecal

En 1981 Thornton propuso que un pH alto en el colon promueve la formación de co-carcinógenos a partir de los ácidos biliares degradados por bacterias o colesterol. Sin embargo, el proceso es inhibido a pH fecal inferior a 6.5 (Walker y Walker, 1992).

2.2.3. Factores genéticos

Diversos estudios sugieren que factores genéticos, juegan un papel importante en la etiología del cáncer, como por ejemplo: el gen *APC*. Cuando el gen de la poliposis adenomatosa del colon (*APC*, por sus siglas en inglés) es normal, ayuda a suprimir el crecimiento tumoral. En su forma defectiva, predispone a las altas concentraciones de una proteína llamada beta-catenina, que acelera el crecimiento celular produciendo los pólipos (Ghadirian *et al.*, 1993).

El cáncer de colon hereditario no-poliposis (HNPCC, por sus siglas en inglés) forma parte de un 5% de todos los cánceres de colon. Esta alteración tiene lugar en las proteínas que comprueban los errores del DNA. El HNPCC parece ser menos agresivo y las tasas de supervivencia son mayores que las correspondientes al cáncer de colon desarrollado sin factores de riesgo conocidos (Grodin *et al.*, 2003).

2.3. Genética molecular del cáncer de colon

El cáncer es el resultado de una serie de mutaciones genéticas sujetos a selección natural (Cuadro 2), por lo que no es probable que se produzcan dos casos de cáncer genéticamente idénticos, incluso aunque sean de la misma enfermedad en el tejido (Lodish *et al.*, 2003).

Las etapas de la progresión tumoral pueden relacionarse con determinadas mutaciones que son la pérdida y activación de varios genes, como se observa en la Figura 2.

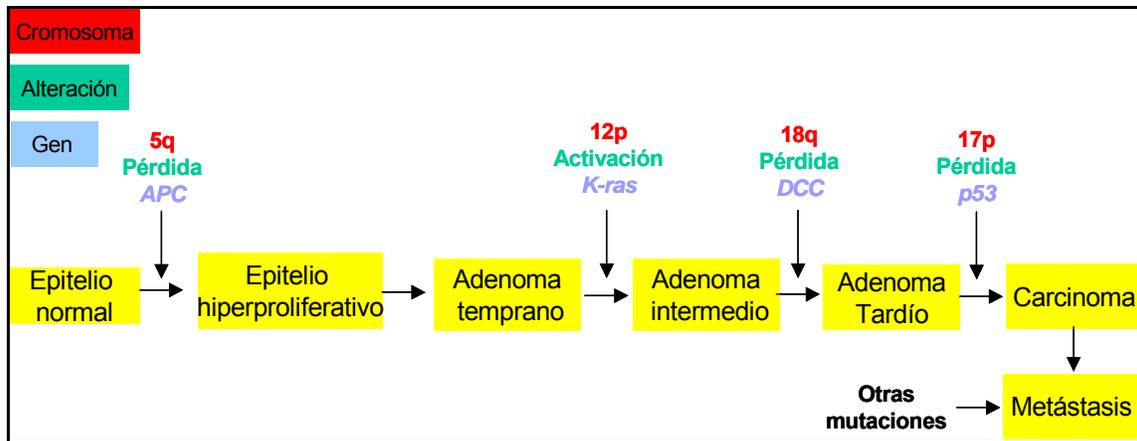


Figura 2. Secuencia típica de los cambios genéticos que marcan el desarrollo de un carcinoma colon (Lodish *et al.*, 2003)

2.4. Factor de necrosis tumoral α (TNF α)

El factor de necrosis tumoral (TNF), es una citoquina proinflamatoria, del cual se han identificado dos formas moleculares denominadas TNF- α o caquexina y el TNF- β o linfotoxina (Tracey, 1994). El TNF pertenece a la superfamilia de mediadores que llevan su nombre y a la cual pertenecen al menos 15 citoquinas. Entre las similitudes que comparten los miembros de esta superfamilia están el ser proteínas monotriméricas (excepto la linfotoxina), están principalmente expresadas en la membrana celular y participar en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis; aunque varios miembros, como el TNF- α , tienen una importante actividad pro-inflamatoria (Dinarello y Moldawer, 1999).

El TNF- α tiene una potente actividad citotóxica, capaz de matar células tumorales y de actuar como un mediador letal en la respuesta inmune aguda o crónica de enfermedades inflamatorias e infecciosas.

2.5. Factor de transcripción nuclear kappa B (NF κ B)

El factor de transcripción nuclear kappa B (NF κ B) es un regulador crítico de la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria, así como, en el control del crecimiento celular. La activación clásica de NF κ B es a través de estímulos generados por

TNF α ; IL-1, ligando CD40 (CD40L) y linfotoxina β (LT β). NF κ B, es una proteína heterodimérica localizada en el citoplasma y asociada con I κ B (inhibidor del factor κ B), cuando la cinasa de I κ B (IKK) se activa, la I κ B fosforilada se ubiquitina y posteriormente se degrada, produciendo la translocación del dímero NF κ B (p65/p50) al núcleo (Baldwin,2001; Poligone y Baldwin, 2001).

En el núcleo, NF κ B activa transcripcionalmente una serie de genes específicos, los cuales codifican proteínas que promueven la inflamación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), factores de angiogénesis tales como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), proteínas de invasividad (MMP-9) y, proteínas antiapoptóticas, tales como: c-myc, Bcl-2, p53, p21, c-FLIP, c-IAP-1, c-IAP-2, XIAP, IEX-IL, COX-2, TRAF-1 y TRAF-2, etc. (Henkel *et al.*, 1993; Traenckner *et al.*, 1995).

Se ha demostrado que la sobreactivación de NF κ B en diferentes tejidos produce un incremento en la proliferación celular e inhibición de apoptosis (Baldwin, 2001). En base a esto se ha propuesto a NF κ B como un elemento clave en el desarrollo de cáncer de colon.

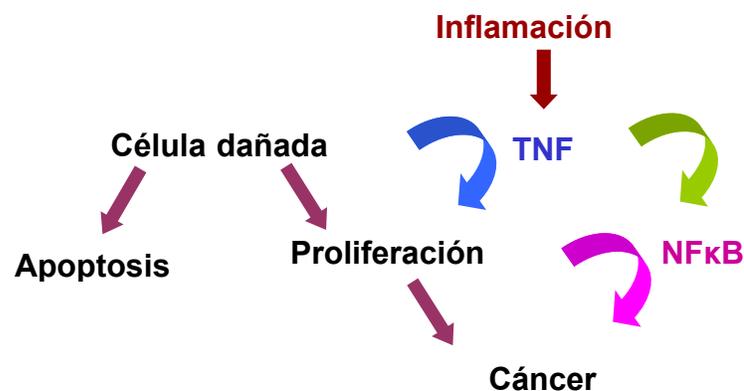


Figura 3. Control de células dañadas por NF κ B y TNF α durante la respuesta inflamatoria, TNF α activa una serie de citoquinas. Una vez activado, TNF α puede inducir excesiva proliferación celular y a su vez cáncer. La activación de TNF méai NI meumenta la proliferación celular a un tumor (Badlwin, 2001)

2.6. Papel de las Ciclooxygenas (COX) en el desarrollo de cáncer de colon

2.6.1. COX-1 y COX-2

Recientemente la mayoría de los trabajos experimentales y clínicos relacionan a COX-2 con cáncer de colon, y muy poco con cáncer de esófago y gástrico. Sin embargo, esta correlación ha sido probada en células neoplásicas derivadas de epitelio celular de órganos como son: próstata, mama y pulmón, por lo que es importante estudiar su participación en el proceso de carcinogénesis (Cuadro 3).

Las ciclooxygenas 1 y 2 son proteínas que juegan un papel importante en la salud gastrointestinal. La sobreexpresión crónica de COX-2 está asociada con enfermedades cancerosas e inflamatorias, por lo que está ausente en la mayoría de las células normales, con algunas excepciones, pero aparece rápidamente cuando existe inflamación, mientras que COX-1 se expresa constitutivamente (Nurmi *et al.*, 2005).

Cuadro 2. Asociación de COX-2 con cáncer en otros tejidos

Adenocarcinoma

Colorrectal	Eberhart et al., 1994
Mama	Parett et al., 1997
Estómago	Ristimaki et al., 1997
Esófago	Wilson et al., 1998
Pulmón	Huang et al., 1998b
Hígado	Shiota et al., 1999
Páncreas	Tucker et al., 1999
Cérvico	Ryu et al., 2000
Endometrial	Tong et al., 2000
Próstata	Gupta et al., 2000
Ovario	Masumoto et al., 2001
Tiroides	Specht et al., 2002.
Colorrectal	Eberhart et al., 1994

Carcinoma en células escamosas

Pulmón	Huang et al., 1998b
Piel	Buckman et al., 1998
Esófago	Zimmermann et al., 1999
Cabeza y Cuello	Chan et al., 1999

Estudios clínicos indican que la inhibición de las ciclooxigenasas podría ser una vía efectiva para prevenir el cáncer.

2.7. El papel protector de la dieta y el cáncer

2.7.1. Frijol (*Phaseolus vulgaris*)

El grano de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) representa uno de los alimentos de gran importancia en México, ya que junto con maíz aporta prácticamente la totalidad de las proteínas vegetales, vitaminas y minerales, ocupando así, un lugar predominante dentro de la dieta del mexicano. El frijol también contiene cantidades significativas de compuestos bioactivos tales como: lectinas, inhibidores de proteasas, fitatos, oligosacáridos y compuestos fenólicos que a su vez juegan un papel importante al consumirse frecuentemente (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998; Pérez-Herrera *et al.*, 2002).

Existen diferentes variedades de frijol que se caracterizan por su tamaño, forma y color de su semilla. En México existen cerca de 200 variedades de frijol que se distribuyen en siete grupos; negros, amarillos, blancos, morados, bayos, pintos y moteados (<http://www.gacicuba.net/frijol.html> (2000)).

Cuadro 3. Composición química del frijol común
(100 g de porción comestible)

Componente	Contenido
Calorías	337 Kcal
Proteínas	22,0 g
Grasas	1,6 g
Humedad	1,2 %
Calcio	86 mg
Fósforo	247 mg
Hierro	7,6 mg
Vitamina	5 mg
Tiamina	0,54 mg
Riboflavina	0,19 mg
Niacina	2,1 mg
Acido ascórbico	1 mg

Fuente: <http://www.gacicuba.net/frijol.html> (2000)

El consumo de frijol se ha relacionado con una disminución en el riesgo de padecer algunas enfermedades como: la diabetes, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Geil y Anderson, 1994; Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998).

2.7.2. Frijol y Cáncer

Estudios epidemiológicos muestran una baja incidencia de cáncer de colon en los países de Latinoamérica, donde el consumo de frijol es alto.

Las propiedades benéficas del frijol se han relacionado con la presencia de ciertos microconstituyentes bioactivos, así como las características fisicoquímicas del almidón resistente, la presencia de inhibidores de proteasas, saponinas, fitatos y compuestos fenólicos (Serrano y Goñi, 2004). La mayoría de estos componentes se han identificado debido a los efectos adversos que producen. Sin embargo, últimamente se cree que a dosis controladas podrían ejercer efectos benéficos en la salud y, en este sentido, muchos autores los clasifican como compuestos bioactivos.

En estudios con diferentes sistemas *in vitro* e *in vivo*, los inhibidores de proteasas (IPs) han demostrado tener la capacidad de suprimir el proceso de carcinogénesis. Uno de los IPs más estudiados es el Bowman-Birk presente en la soya, es un agente anticarcinogénico, sin embargo el mecanismo de acción por el cual actúa no ha sido elucidado. Se sugieren algunas hipótesis: 1) pueden revertir el proceso de iniciación; 2) capacidad de afectar la expresión de algunos oncogenes y 3) capacidad de afectar los niveles de ciertos tipos de actividades proteolíticas de los carcinógenos que se encuentran elevados en los tejidos expuestos (Kennedy, 1994).

Estudios *in vitro* muestran claramente que el ácido fítico (PA, por sus siglas en inglés) también tiene la capacidad de reducir la proliferación celular en diferentes líneas celulares, como es el caso de células de cáncer de mama. Sin embargo aún no está completamente elucidado el mecanismo de su efecto anticarcinogénico. Se ha sugerido que aumenta la actividad de las células “natural killers” (NK) (Challa *et al.*, 1997). Además se le ha considerado como un antioxidante natural (Rimbach y Pallauf, 1998).

Por otro lado el PA, debido a su alta reactividad con cationes como el zinc, calcio y hierro, forma complejos insolubles que hacen disminuir la bio-disponibilidad de estos minerales en el intestino (Sandberg, 2002). Esta capacidad de quelar minerales, le permite ejercer efectos protectores relacionados con el riesgo de cáncer de colon. El mecanismo de acción mediante el cual actúa, se relaciona con su poder antioxidante, como resultado de la quelación de iones y a su vez reduciendo la proliferación celular e incrementando la respuesta inmune (Reddy, 1999).

Hughes *et al.*, (1997) demostraron que el frijol incorporado a la dieta en un 59% (w/w) inhibe el desarrollo del cáncer de colon en ratas (F344) inducidas con azoximetano (AOM). Este tratamiento también fue capaz de disminuir la incidencia de adenomas y adenocarcinomas en el intestino delgado.

Hangen y Bennink (2002) reportaron que el consumo de frijol negro y blanco (75% w/w) durante cuatro semanas, es capaz de reducir en un 44 a 75% la carcinogénesis de colon de ratas inducidas con AOM.

Por otro lado, Ríos-Ugalde *et al.*, (2007) realizaron un estudio con ratas Sprague Dawley a las que se les indujo cáncer de colon con dimetiltridrazina. Dichos animales fueron pre-tratados con diferentes harinas de frijol cocido (Flor de Mayo Anita (FMA), Flor de Junio Marcela (FJM;), Blanco Tlaxcala (BT) y una nueva variedad; Pinto Zapata (PZ) incorporado a la dieta a una concentración de 0.56 mg/kg de peso corporal. Dicho tratamiento mostró una disminución del 40-70% de cáncer de colon. Sin embargo, hasta el momento no se han identificado el o los componentes responsables de este efecto así como su mecanismo de acción.

2.8. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad englobando más de 8,000 compuestos distintos (Shahidi y Naczki, 1995). Tradicionalmente estos compuestos han sido considerados como antinutrientes,

debido al efecto adverso de unos de sus componentes mayoritarios, los taninos, los cuales disminuyen la digestibilidad de las proteínas, sin embargo, actualmente existe un gran interés por estos compuestos debido a sus propiedades antioxidantes y sus implicaciones benéficas en la salud humana, tales como el tratamiento y prevención de cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

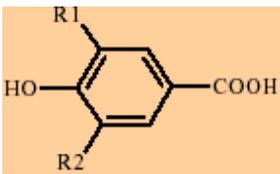
Los compuestos fenólicos están relacionados con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal, tanto frescos como procesados (Clifford, 2000), su contribución a la pigmentación de los alimentos esta claramente reconocida, a través de las antocianidinas, responsables de colores: rojo, azul, violeta, naranja y púrpura de la mayoría de las plantas y sus productos (Shahidi y Naczk, 1995; Belitz y Grosch, 1997).

Según Harbome (1989), los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases dependiendo de su estructura química básica, describiéndose a continuación aquellas con un mayor interés nutricional:

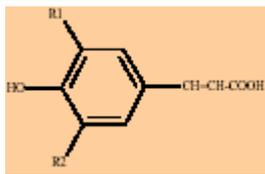
- a) Fenoles, ácidos fenólicos y ácidos fenil acéticos
- b) Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles
- c) Cumarinas e isocumarinas, que se encuentran generalmente en forma de glicósido.
- d) Cromonoles son menos conocidos, y se forman a partir de las antocianidinas con la presencia de pH altos.
- e) Lignanos y neolignanos
- f) Flavonoides
- g) Taninos

Se distinguen dos familias distintas de los ácidos fenólicos, la serie benzoica, si el grupo carboxílico esta directamente enlazado al anillo aromático (Cuadro 4) y la serie cinámica, si el grupo carboxílico esta enlazado a el a partir de un substituyente 2-propanilo (Cuadro 5) (Belitz y Grosch, 1997; Bravo, 1998).

Cuadro 4. Estructura de la serie benzoica de los ácidos fenólicos (Belitz y Grosch, 1997)

RI	R2	COMPUESTO	
H	H	Ácido p-hidroxibenzoico	
OH	H	Ácido protocatecuico	
OH	OH	Ácido gálico	
OHCH ₃	H	Ácido vainílico	
OHCH ₃	OHCH ₃	Ácido siríngico	

Cuadro 5. Estructura de la serie cinámica de los ácidos fenólicos (Belitz y Grosch, 1997)

RI	R2	COMPUESTO	
H	H	Ácido p-coumárico	
OH	H	Ácido cafeico	
OHCH ₃	H	Ácido ferúlico	
OHCH ₃	OHCH ₃	Ácido sinápico	

2.9. Compuestos fenólicos y su actividad antioxidante

La capacidad antioxidante descrita para distintos compuestos fenólicos se puede considerar como la actividad biológica responsable del efecto preventivo que se les atribuye sobre algunas enfermedades: como son enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Hertog *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996)

El comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con su capacidad para quelar metales, inhibir la lipoxigenasa y captar radicales .libres, aunque en ocasiones también pueden promover reacciones de oxidación "*in vitro*". Los compuestos fenólicos actúan como prooxidantes quelando metales, bien de manera que mantienen o incrementan su actividad catalítica o bien reduciendo metales, incrementando así su capacidad para formar radicales libres de los peróxidos (Decker 1997).

Los compuestos fenólicos deben cumplir ciertas condiciones para ser clasificados como antioxidantes: 1. es cuando se encuentre en una concentración baja con respecto al sustrato que va a ser oxidado pueda retrasar, detener o prevenir la autooxidación o la oxidación mediada por un radical libre; 2. que el radical formado tras el secuestro sea estable y no pueda actuar en oxidaciones posteriores. Entre los compuestos fenólicos con una actividad

antioxidante reconocida destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos (principalmente los ácidos hidroxicinámico, hidroxibenzóico, caféico y clorogénico), taninos y cumarinas (Pratt, 1992) los cuales constituyen la fracción polifenólica de una gran diversidad de alimentos.

2.10. Efectos de los compuestos fenólicos sobre la prevención de cáncer de colon

El compuesto polifenólico curcumina (diferuolmetano) presenta una actividad similar a las NSAIDs. La curcumina es un potente agente anti-inflamatorio, cuya actividad anticarcinogénica está relacionada con su capacidad de disminuir la activación del factor transcripcional NFκB. La curcumina bloquea la fosforilación de IκB al inhibir directamente la actividad de su cinasa IKK, lo cual trae como consecuencia una inhibición de la translocación de NFκB al núcleo y una disminución en la expresión de la enzima COX-2. Esto sugiere que este compuesto puede ser empleado en la prevención y/o tratamiento de ciertas neoplasias (Salvioli *et al.*, 2007).

Por otro lado, el compuesto fenólico resveratrol, presente principalmente en la uva, es un potente inhibidor del NFκB. Por lo que debido a esta acción, se le ha recomendado como agente quimiopreventivo para cáncer de mama y de colon, ya que inhibe el desarrollo de lesiones preneoplásicas en ratas tratadas con diferentes carcinógenos (Banerjee *et al.*, 2002).

Un estudio realizado por Gossé *et al.*, 2005, demostraron que extractos de manzana enriquecidos con procianidinas inhiben el crecimiento de células metastáticas (SW620) en un 50% a una concentración de 45 µg/mL. Estos compuestos inhiben el crecimiento alterando el ciclo celular, que lleva a la acumulación de células diploides en la fase G₂/M, indicativo de apoptosis.

2.11. Actividad antioxidante *in vitro*

La capacidad antioxidante se puede determinar mediante diferentes métodos. Una de las estrategias más aplicadas es la medida *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical, la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración (Fernández-Pachón *et al.*, 2006).

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de sus componentes, también depende del ambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre sí pudiendo producir efecto sinérgicos o inhibitorios. Son diversos los compuestos cromógenos que se han utilizado para determinar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos que contienen los alimentos para captar los radicales libres generados (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

Uno de los métodos *in vitro* para medir capacidad antioxidante son: ABTS (2,2'-azinobis-(2-amidinopropano-HCl) y DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazilo). Ambos presentan una gran estabilidad en ciertas condiciones. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química, enzimática o también electroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH hidrofílica. Una de las ventajas del ABTS es de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico (Fernández-Pachón *et al.*, 2006).

Estudios *in vitro* empleando modelos celulares

Los modelos celulares son considerados una herramienta útil en investigación nutricional así como en investigación encaminada a la validación de alimentos funcionales ricos en antioxidantes naturales, ya que proporcionan información valiosa sobre los mecanismos de acción y la eficacia protectora de sustancias bioactivas puras y extractos de alimentos ricos en antioxidantes (O'Brien *et al.*, 2000; Liu y Finley 2005).

En la estrategia general a seguir cuando se evalúa la eficacia de un antioxidante en concreto o un alimento rico en antioxidantes, se pueden distinguir 4 etapas fundamentales:

- I. Caracterización de las dosis citotóxicas de la muestra (compuesto activo o extracto de un alimento rico en antioxidantes).
- II. Suplementación de las células con dosis no citotóxicas de la muestra.
- III. Inducción del estrés oxidativo.
- IV. Determinación de la protección ejercida por la muestra.

Mediante el empleo de estos modelos experimentales de cultivos celulares se han descrito efectos protectores ejercidos por compuestos fenólicos comunes en la dieta y extractos de alimentos ricos en dichas sustancias frente al estrés oxidativo inducido por diferentes agentes oxidantes, en diferentes líneas celulares (O'Brien *et al.*, 2000; Liu y Finley 2005).

Es evidente la idoneidad de los sistemas *in vitro* en modelos celulares para la identificación de compuestos bioactivos de alimentos vegetales y el estudio de sus mecanismos de acción a nivel de células y tejidos. Los modelos celulares presentan una serie de ventajas frente a otros modelos experimentales entre las que se incluyen; un menor costo económico, la posibilidad de crio-conservación de las líneas celulares durante largos periodos de tiempo, la capacidad para desarrollar estudios a nivel molecular o la facilidad de control de las condiciones experimentales (O'Brien *et al.*, 2000; Liu y Finley 2005).

A pesar de las limitantes de los estudios *in vitro*, estos se emplean para conocer mecanismos de acción de: mezclas, componentes y/o agentes quimiopreventivos; en base a la información obtenida en estudios con cultivos celulares en conjunto con datos obtenidos mediante pruebas químicas y estudios de intervención en humanos, hacen posible una caracterización adecuada de la seguridad y eficacia de un alimento funcional, así como de los mecanismos de acción de sus compuestos bioactivos. Todos estos requisitos son necesarios para la validación de las declaraciones nutricionales y sus potenciales efectos beneficiosos (Liu y Finley 2005).

III. JUSTIFICACIÓN

En México ha incrementado la incidencia de padecer cáncer de colon, debido a los cambios alimenticios que se han dado en los últimos años. El consumo de comida chatarra y una dieta pobre en frutas, verduras y fibra es un factor determinante para el desarrollo de este tipo de cáncer.

Actualmente para tratar esta enfermedad es a base de medicamentos (sulindaco, aspirina entre otros) los cuales el uso excesivo de estos puede causar efectos secundarios como son úlceras gástricas. Es por ello que se requiere buscar nuevas alternativas relacionadas con la dieta, para prevenir esta enfermedad.

Se ha reportado que el consumo de frijol reduce significativamente cáncer de colon en ratas, debido a los diferentes compuestos presentes en el frijol, sin embargo son pocos los estudios relacionados con los compuestos fenólicos presentes en el frijol cocido (manera casera) y su efecto sobre esta enfermedad.

Por todo lo anterior se planteó la siguiente hipótesis y objetivos.

IV. HIPÓTESIS

El extracto acuoso de las diferentes variedades de frijol posee efecto anti-promotor sobre células intestinales normales tratadas con un promotor de tumores TNF α .

V. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los compuestos fenólicos de los extractos acuosos de diferentes variedades de frijol cocido (*Phaseolus vulgaris*) y evaluar el efecto anti-promotor sobre células intestinales tratadas con TNF α .

2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar parcialmente los compuestos fenólicos de los extractos acuosos de frijol cocido (Negro 8025, Pinto Zapata, Higuera y Bayo Madero).
2. Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de frijol cocido (Negro 8025, Pinto Zapata, Higuera y Bayo Madero), mediante el método ABTS.
3. Determinar la concentración inocua de cada extracto de acuoso de frijol sobre la proliferación y sobrevivencia de las células IEC-18.
4. Evaluar el efecto anti-promotor de los extractos acuosos de frijol cocido sobre las células intestinales tratadas con TNF α .

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. MATERIALES

6.1.1. Material biológico

Las líneas celulares utilizadas:

112CoN (Células normales de fibroblasto de colon humano)

IEC-18 (Células epiteliales de ileum de rata) donadas por la Dra. Martha Robles, UNAM.

3T3 F442A (Células de fibroblastos murinos normales) donadas por la Dra. Teresa García Gasca, Facultad de Ciencias Naturales-Nutrición.

Las variedades de frijol estudiadas fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Celaya, Gto. (Cosecha-julio 2005).



Pinto Zapata (PZ)



Bayo Madero (BM)



Higuera (H)



Negro 8025 (N8025)

6.1.2. Materiales químicos

Los reactivos utilizados para determinar el contenido de compuestos fenólicos: (+)-catequina-vainillina fueron de la marca Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI).

Para la cuantificación de antocianinas los reactivos utilizados, tales como: Etanol y el ácido clorhídrico, fueron de la marca Baker (J.T.Baker, Edo. de México).

Los reactivos utilizados para determinar la capacidad antioxidante fueron: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (Trolox) 97%, 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) y persulfato de potasio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI).

Los reactivos utilizados para determinar los compuestos fenólicos en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fueron de la marca Baker (J.T.Baker, Edo. de México).

El medio de cultivo de las células Dulbecco's Modified Tagle Medium (D-MEM) y las sales de sodio (EDTA) fueron de la marca Invitrogen-Gibco (Invitrogen Corp. Grand Island. N.Y.).

Los reactivos utilizados como suplementos del medio de cultivo para las células fueron: suero de ternera (ST), penicilina, estreptomina, anfotericina, insulina, L-Glutamina-200 mM, suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y tripsina, todos de la marca Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI).

El reactivo utilizado para la proliferación celular, el factor de necrosis tumoral α (TNF α) fue de la marca Invitrogen (Invitrogen Corp. Grand Island. N.Y.).

Los reactivos utilizados para evaluar proliferación mediante el método colorímetro fueron: 3-(4,5-dimetiltiazolil-2) -2,5-difenil tetrazolium de bromuro (MTT) y dimetilsulfoxido (DMSO) fueron de las marcas Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) y (J.T.Baker, Edo. de México) respectivamente.

6.2. Métodos

6.2.1. Tratamiento térmico del frijol

Se pesó el frijol (50 g) y se lavó. Se coció en una olla con aislamiento térmico a una relación de 1:3 (p/v) en agua, durante 2 horas a $90^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Una vez cocido el frijol se molió junto con el caldo y se liofilizó, almacenándose a 4°C hasta su uso.

6.2.2. Obtención de los extractos acuosos de frijol cocido liofilizado (EA)

La obtención del extracto acuoso de cada variedad de frijol cocido consistió en pesar 10 g de frijol cocido liofilizado y adicionar 50 mL de agua destilada, se mantuvo en agitación durante 12 horas protegido de la luz y en refrigeración. Posteriormente, se centrifugó y se tomó el sobrenadante, éste se liofilizó, almacenándose a 4°C hasta su uso. A este liofilizado se le llamó extracto acuoso (EA).

6.2.3. Cuantificación de compuestos fenólicos (Método de la vainillina)

La cuantificación de taninos condensados se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Cardador *et al.*, 2002b. Brevemente se pesaron 1.0 g del frijol cocido liofilizado (FCL) y de los extractos acuosos (EA) de cada variedad, se adicionaron 10 mL de metanol dejándose en agitación durante 24 horas. Posteriormente se centrifugaron las muestras, se tomaron alícuotas de 0.5 mL de cada muestra agregándole 1 mL de una solución recién preparada de HCl al 8% y vainillina, relación 1:1. El blanco se preparó con 2 mL de solución HCl al 4%. Las muestras se colocaron en baño maría durante 20 minutos a 30°C , posteriormente se leyeron a una absorbancia de 500 nm en un espectrofotómetro SmartSpecTM Plus Bio-Rad. La concentración de compuestos fenólicos fueron calculados en base a una curva de calibración de (+)-catequina, realizada previamente (Anexo 1). Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de (+)-catequina por gramo de muestra liofilizada.

6.2.4. Cuantificación de antocianinas

La cuantificación de antocianinas en FCL y EA se realizó mediante el método utilizado por Abdel-Aal y Hucl (1999). Brevemente, se pesaron 1.25 g FCL y 0.625 g del EA, y se adicionaron 10 mL de etanol acidificado (HCl 1N, 85:15, v/v), la muestra se agitó durante 30 min y se ajustó el pH a 1. Posteriormente se centrifugó y se aforó a 25 mL con etanol acidificado, se realizó un barrido entre 400 y 600 nm, tomando los valores máximos de absorbancia a 535 nm, sustituyendo estos valores en la siguiente fórmula.

$$C = (A/\epsilon) * (Vol/1000)*PM*(1/peso\ de\ la\ muestra)*10^3$$

C= concentración total de antocianinas mg/g expresados como cianidin-3-glucósido.

A= absorbancia máxima

ϵ = coeficiente de absortividad molar 25,965 cm⁻¹ M⁻¹

Vol= volumen total del extracto de antocianinas (mL)

PM= peso molecular de la cianidina-3-glucósido (449 g mol⁻¹)

6.2.5. Capacidad antioxidante mediante el método de ABTS

La determinación de la capacidad antioxidante de un compuesto expresada en % de inhibición, se basa en la capacidad de un antioxidante para atrapar radicales libres. Se utilizó el método descrito por Van den Berg *et al.*, (1999). Brevemente se puso a reaccionar una solución acuosa de ABTS 7 mM con persulfato de potasio 150 mM, se dejó cubierto de la luz a temperatura ambiente durante 16 horas. Para el ensayo, se ajustó la solución de ABTS con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.7 a una longitud de onda de 734 nm. Se realizó una curva de Trolox, para utilizarla como estándar y con ésta determinar los equivalentes de Trolox.

6.2.6. Caracterización de compuestos fenólicos mediante cromatografía de alta resolución (HPLC)

La identificación de los compuestos fenólicos se realizó mediante el método descrito por Ramamurthy *et al.*, 1992.

A continuación se describe brevemente: a) extracción de la muestra: primeramente se pesó 1.0 g del EA de cada variedad, después se le adicionaron 5 ml de metanol al 30%, se dejaron en agitación constante durante 10 min. Posteriormente, se realizó una filtración al vacío utilizando una membrana de 0.2 micras, obteniendo el extracto listo para efectuar la corrida.

La separación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo en un equipo HPLC Agilent Series 1100, usando una columna de fase reversa (inversa) Zorbax Octadecilsilano (ODS)-C18 (15 cm*4.6 mm) con tamaño de partícula de 5 µm. Las muestras antes de inyectarse se filtraron a través de una membrana de 0.45 µm (Millipore, Bedford, MA), inyectando un volumen de 20 µL. Se usaron como disolvente de elución: A = ácido acético/agua (2:98 v/v) y B = ácido acético/acetonitrilo/agua (2:30:68 v/v). El protocolo de elución consistió en un gradiente de 10 a 100% de B en A en 30 min. La velocidad de flujo fue 1.5 mL/min. Todos los disolventes fueron de grado HPLC (previamente degasificados), y antes de usarse se filtraron a través de una membrana de 0.2 µm (Millipore, Bedford, MA). La detección fue en un detector de UV (arreglos de diodos) a 280 nm.

6.3. Cultivo celular

Las células de fibroblastos murinos normales, **3T3 F442A**, se cultivaron en medio D-MEM suplementado con 5% de ST, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 5 µg/mL de anfotericina.

Las células de fibroblastos de colon humano **112CoN**, se cultivaron en medio D-MEM suplementado con 10% de SFB, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 5

$\mu\text{g/mL}$ de anfotericina. Para las células intestinales epiteliales de ileum **IEC-18**, se cultivaron igual que las 112CoN, el único suplemento adicional fue la insulina 0.1 mL por cada 100 mL de medio.

Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en atmósfera humidificada al 90% aire y 10% CO₂ en una incubadora FELISA con cámara de gasificación manual.

Subcultivo celular o transferencia

Cuando las células llegan a condiciones de confluencia (células adherentes) se procedió a sub-cultivar para asegurar el crecimiento exponencial de las células. El sub-cultivo celular permite controlar la densidad del inóculo inicial que asegure que se trabaje en condiciones óptimas de crecimiento.

Mantenimiento celular

Se elimina el medio basal y las células se le adiciona de 2-3 mL de una solución que consiste en 0.25 (w/v) tripsina y 0.15% EDTA (0.53 mM), se deja incubar durante 15-30 min, posteriormente se realizó el pasaje adicionándole medio nuevo y se incubaron a 37 °C. Este mantenimiento se realizó dos veces por semana.

6.3.1. Determinación de la concentración promotora de TNF α

Las tres líneas celulares se sembraron en 500 μL de medio D-MEM suplementado, en una placa de 24 pozos a una densidad de 2×10^4 células/pozo. Después de 24 h de incubación, el medio se cambio por D-MEM sin ST, suplementado con 0.5 % de ASB con diferentes concentraciones de TNF α (0.1, 1.0 y 10 ng/mL) se dejaron por un período de incubación que van de 4, 18, 24 y 48 h. Después de cada período de incubación, se determino la proliferación celular mediante el método colorimétrico con MTT que consistió en la eliminación del medio, se hizo un lavado con solución salina de fosfatos (PBS 1X), se adicionaron a cada pozo 0.5 mL de MTT (0.5 mg/mL) y se dejaron incubar durante 3 h a 37°C protegido de la luz, posteriormente eliminó el MTT y se hizo nuevamente un lavado con PBS (1X), se adicionó 1 mL de DMSO (para la disolución de los cristales formados) y

se leyó a una absorbancia de 540 nm. Se tomaron dos pozos que fueron considerados como el número de células al inicio del experimento o control inicial (Co).

Se utilizó otro método que consistió en cosechar las células con tripsina 0.15% y se contaron con un hemocitómetro (Fresheney, 1994).

6.5.2. Efecto del extracto acuoso de frijol liofilizado

Las células IEC-18 se sembraron a una densidad de 2×10^4 células/pozo en una placa de 24 pozos, se dejaron incubar. Después de 48 h de incubación, el medio se cambió por D-MEM sin ST, suplementado con 0.5 % de ASB con cada uno de los EA a diferentes concentraciones (0.05, 0.5 y 1.0 mg/mL) y se incubaron durante 24 h, las células se cosecharon con tripsina 0.15 % y se contaron en un hemocitómetro, se contaron dos pozos que fueron considerados como el número de células al inicio del experimento o control inicial (Co). Cada prueba se hizo por duplicado. El porcentaje de proliferación y sobrevivencia se calculó de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

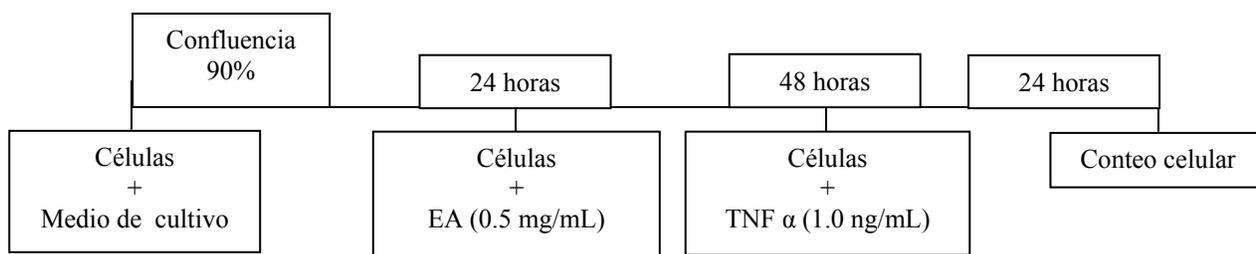
$$sobrevivencia = \frac{\# \text{ de células tratadas o control } 1\% \text{ ASB}}{\# \text{ de células iniciales (Co)}} \times 100\%$$

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

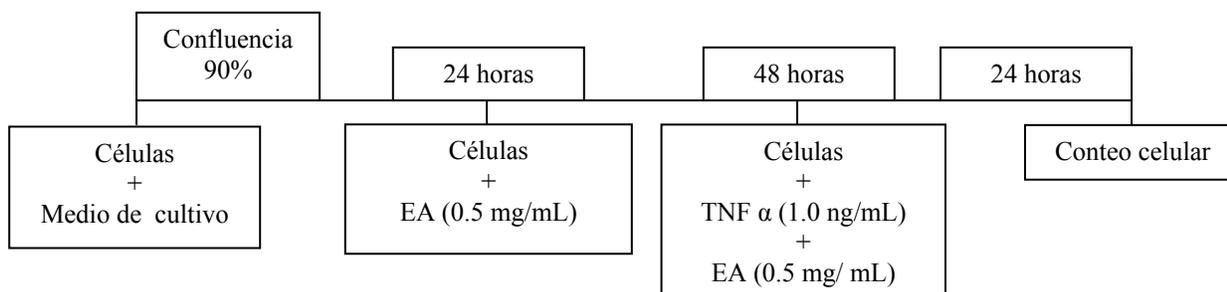
6.5.3. Evaluación del efecto anti-promotor de los extractos acuoso de frijol sobre células intestinales normales IEC-18.

Para llevar a cabo este experimento se diseñó de la siguiente manera ya se que se evaluaron tres tiempos de exposición, de la siguiente manera:

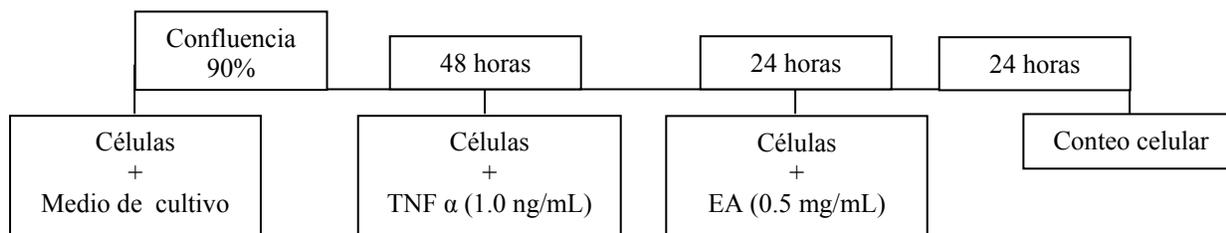
a) *Antes*



b) *Durante*



c) *Después*



6.6. Análisis Estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm error estándar.

La evaluación estadística de los datos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey para obtener las diferencias estadísticas entre tratamientos.

En todos los casos se empleó un nivel de significancia de $p < 0.05$ con un nivel de confianza del 95%. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa JMP Versión 4.0.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. Cuantificación de compuestos fenólicos

Los granos contienen cantidades significativas de fitoquímicos bioactivos que proporcionan efectos benéficos a la salud, reduciendo el riesgo de padecer enfermedades crónicas degenerativas (Liu, 2004).

La primera parte de este trabajo consistió en caracterizar parcialmente las variedades de frijol (N8025, PZ, BM e H), a continuación se muestran los resultados:

La cantidad de taninos condensados (expresados como equivalentes de (+)-catequina) presentes en las harinas de frijol cocido de las diferentes variedades estudiadas, tuvo una amplia variación entre sí, el contenido fluctuó de 3.69 ± 0.037 mg/g para N8025, 0.62 ± 0.002 para BM y 1.27 ± 0.025 mg/g para PZ, en el frijol H no fue posible cuantificar el contenido de estos compuestos, por presentarse por debajo del límite de detección. El contenido de compuesto fenólicos para el frijol cocido liofilizado (FCL) y extracto acuoso (EA), se presenta en el cuadro 6.

Cuadro 6. Concentración de compuestos fenólicos de FCL y el EA¹

Variedad de frijol	FCL ¹	EA ²
BM	0.62 ± 0.002^a	ND
PZ	1.27 ± 0.025^b	ND
N8025	3.69 ± 0.037^c	ND
H	ND	ND

¹ Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes \pm ES.

² mg/g = mg equivalentes de (+)-catequina/g de frijol cocido liofilizado

³ mg/g = mg equivalentes de (+)-catequina/g de extracto acuoso

ND= Por debajo del límite de detección

BM = Bayo Madero, PZ = Pinto Zapata, N8025 = Negro 8025 e H = Higuera

* Diferentes letras (a, b, c) representan diferencias estadísticas por pruebas de Tukey $p < 0.05$

La concentración de compuestos fenólicos en los extractos acuosos liofilizados de todas las variedades de frijol, también se encontraron por debajo de los límites de detección.

Existen pocos estudios relacionados con la cuantificación de compuestos fenólicos en el frijol cocido liofilizado y extractos acuosos. Por lo que los datos mostrados en el presente estudio solo es posible compararlo con los resultados obtenidos por Aparicio-Fernández *et al*, (1996) en cual ellos determinaron por separado el contenido taninos condensados en semilla cocida (cosecha 2003) y caldo liofilizado: 0.21 ± 0.01 y 4.47 ± 0.18 mg/g respectivamente. Dando un resultado de 5 mg/g de taninos condensados, el resultado obtenido en el presente estudio se encuentra muy cerca de este rango, siendo este menor a lo reportado.

Es importante resaltar que para la determinación de compuestos fenólicos para cada una de las variedades del presente estudio fueron liofilizadas junto con el caldo, lo cual podría ser una razón por la que se vea afectado dicho contenido. Ya que pudiera presentarse aglomeración de dichos componentes y a su vez resultando más difícil la cuantificación.

Con respecto a los extractos acuosos

2. Cuantificación de antocianinas

La concentración de antocianinas totales, expresadas como equivalentes de cianidina-3-glucósido, presentes en las variedades de frijol, se muestran en el Cuadro 10. La cuantificación de antocianinas presentes en el frijol cocido liofilizado se presentó en el siguiente orden de mayor a menor concentración: N8025 (33.44 ± 1.4) > PZ (0.59 ± 0.0) > BM (0.43 ± 0.09) > H (0.07 ± 0.1) mg de cianidina-3-glucósido/g de FCL. Para los extractos acuosos se presentan en el mismo orden: N8025 (46.03 ± 1.4) > PZ (0.15 ± 0.0) > BM (0.04 ± 0.09) > H (ND) mg de cianidina-3-glucósido/g. Este resultado se atribuye a la pigmentación de cada variedad de frijol. El contenido de antocianinas de FCL y de los EA se muestra en el cuadro 7.

Cuadro 7. Concentración de antocianinas en FCL y los EA.¹

Variedad de frijol	FCL ²	EA ³
BM	0.43 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.0 ^a
PZ	0.59 ± 0.04 ^a	0.15 ± 0.0 ^b
N8025	33.44 ± 1.4 ^b	46.03 ± 0.01 ^c
H	0.07 ± 0.0 ^c	ND

¹ Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes con tres repeticiones ± ES.

² mg de cianidina-3-glucósido/1.25g de frijol cocido liofilizado

³ mg de cianidina-3-glucósido/0.625 g de extracto acuoso

ND = Por debajo del límite de detección

BM = Bayo Madero, PZ = Pinto Zapata, N8025 = Negro 8025 e H = Higuera

* Diferentes letras (a, b, c) representan diferencias estadísticas por pruebas de Tukey p<0.05)

Aparicio-Fernández *et al.*, (2006) reportaron una concentración de 3.0 mg/g cianidina-3-glucósido para el frijol cocido (semilla + caldo) de la variedad Negro Jamapa (cosecha 2003). Con respecto al presente estudio, el frijol N8025 fue el que presentó el más alto contenido de estos compuestos comparado con este autor. Hasta el momento no existen otros estudios similares a este para hacer dicha comparación.

3. Capacidad antioxidante de las diferentes variedades de frijol, mediante el método de ABTS

La capacidad antioxidante evaluada con el método ABTS (expresada como el porcentaje (%) de inhibición (capacidad antirradical). La capacidad del frijol cocido liofilizado se muestra en el siguiente orden: N8025 (93.70 ± 0.03) > PZ (73.77 ± 0.61) > BM (66.99 ± 0.20) > H (30.18 ± 0.42). Para los EA fue de acuerdo a lo siguiente: N8025 (98.14 ± 0.25) > PZ (82.33 ± 0.10) > BM (67.17 ± 0.08) > H (45.25 ± 0.17) el cual muestra la misma tendencia en cuanto a cantidad, con respecto a el extracto acuoso. En ambos resultados se observa que la variedad N8025 es la que presenta mayor capacidad antioxidante, y dicha capacidad puede relacionarse directamente con el contenido de compuestos fenólicos y antocianinas presentes en esta variedad pigmentada. La capacidad antioxidante de FCL y de los EA se muestra en el cuadro 8.

Cuadro 8. Capacidad antioxidante de las muestras de frijol cocido liofilizado y extractos acuosos por el método de ABTS¹, expresadas como el porcentaje (%) de inhibición.

Variedad de frijol	% de inhibición FCL ²	% inhibición EA ³
BM	66.99 ± 0.20 ^b	67.16 ± 0.08 ^b
PZ	73.77 ± 0.61 ^b	82.33 ± 0.10 ^a
N8025	93.70 ± 0.03 ^a	98.14 ± 0.25 ^a
H	30.18 ± 0.42 ^c	45.25 ± 0.17 ^c

¹ Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes ± ES.

² % inhibición de frijol cocido liofilizado

³ % inhibición del extracto acuoso

BM = Bayo Madero, PZ = Pinto Zapata, N8025 = Negro 8025 e H = Higuera

* Diferentes letras (a, b, c) representan diferencias estadísticas por pruebas de Tukey p<0.05)

4. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en los extractos acuosos de las diferentes variedades de frijol

Una de las técnicas más precisas para cuantificar e identificar compuestos es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), por lo que para este estudio fue una herramienta sumamente importante, ya que se pudo identificar una gran variedad de compuestos fenólicos presentes en los extractos acuosos de frijol liofilizado.

Los compuestos fenólicos más abundantes para cada variedad expresadas en mg/100 g de muestra: ácido gálico con mayor concentración en el EA de N8025 (9.68) y BM (6.85); ácido protocatecuico en BM (18.97); ácido 4-hidroxibenzoico en H (16.16) y BM (13.43); catequina en N8025 (14.67); ácido vainillico en PZ (13.36); ácido clorogénico en N8025 (4.89); ácido 4-hidroxi-3-benzoico en N8025 (1.95); ácido cafeico en PZ (41.31) y N8025 (19.06); ácido sirínico en N8025 (1.13); epicatequina se encuentra presente en todas las variedades, en cantidades que van de 3.94 (N8025) a 2.50 (BM); vainillina en BM (11.90) e H (11.56); cumárico en H (12.47) y PZ (11.93); el ácido ferúlico de igual forma se presenta en todas las variedades en un rango de 37.95 (PZ) a 23.01 (N8025); benzoico en PZ (15.60) y finalmente el ácido salicílico en H (12.95).

La figura 4 muestra el cromatograma correspondiente a los estándares utilizados. Las figuras 5, 6, 7 y 8 muestran los cromatogramas de los extractos acuosos de frijol BM, H, N8025 y PZ, respectivamente.

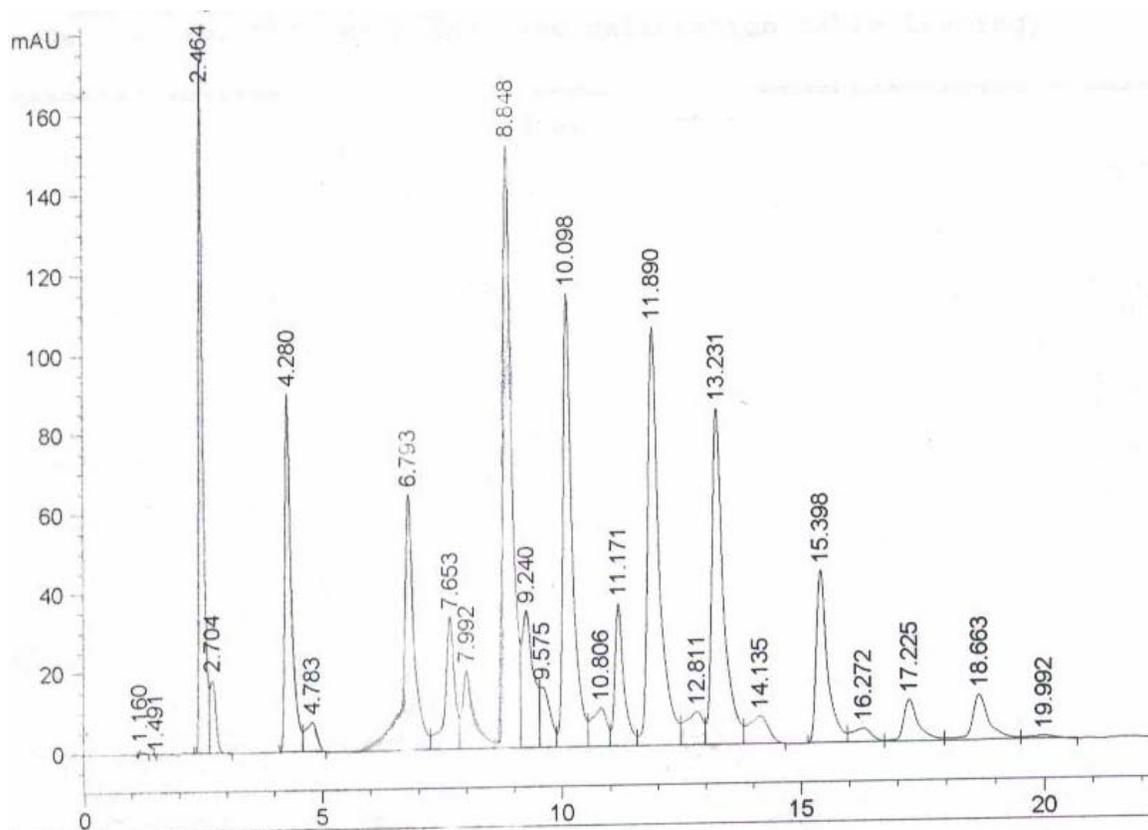


Figura 4. Cromatograma de estándares de compuestos fenólicos

Tiempo de retención	Compuestos fenólicos	Tiempo de retención	Compuestos fenólicos
2.464	ácido gálico	11.890	ácido siríngico
4.280	ácido protocatecuico	13.231	epicatequina
6.793	ácido 4-hidroxibenzoico	14.135	vainillina
7.653	ácido vanílico	15.398	ácido cumárico
7.992	catequina	16.272	ácido ferúlico
8.848	ácido clorogénico	17.225	ácido benzoico
10.098	ácido 4-hidroxi-3 metoxibenzoico	18.663	ácido salicílico
11.171	ácido cafeico		

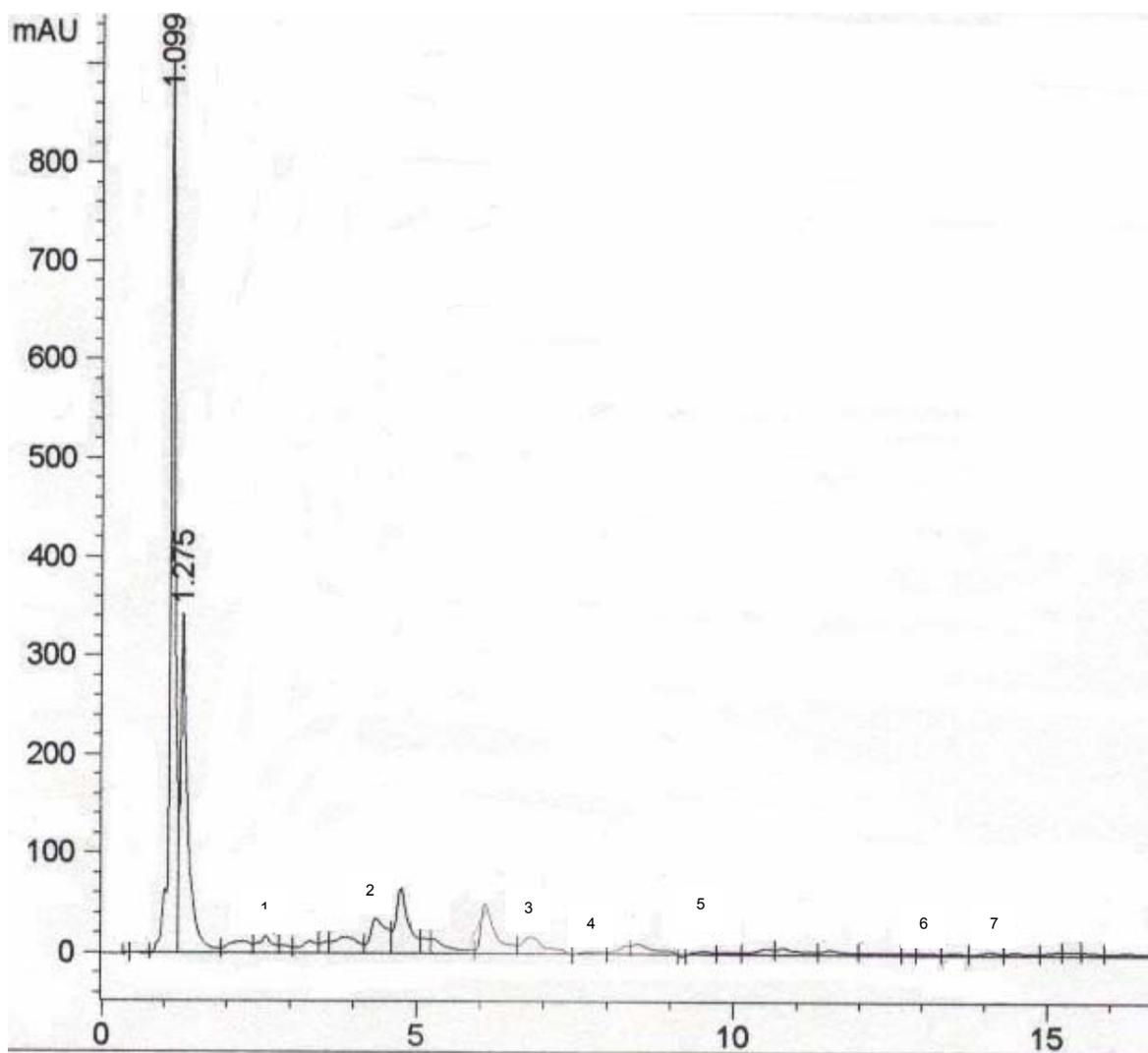


Figura 5. Cromatograma del extracto acuoso de Bayo Madero.

No.	Tiempo de retención	Compuestos fenólicos
1	2.613	ácido gálico
2	4.356	ácido protocatecuico
3	6.778	ácido 4-hidroxibenzoico
4	7.893	catequina
5	9.871	ácido 4-hidroxi-3 metoxibenzoico
6	13.462	epicatequina
7	14.081	vainillina

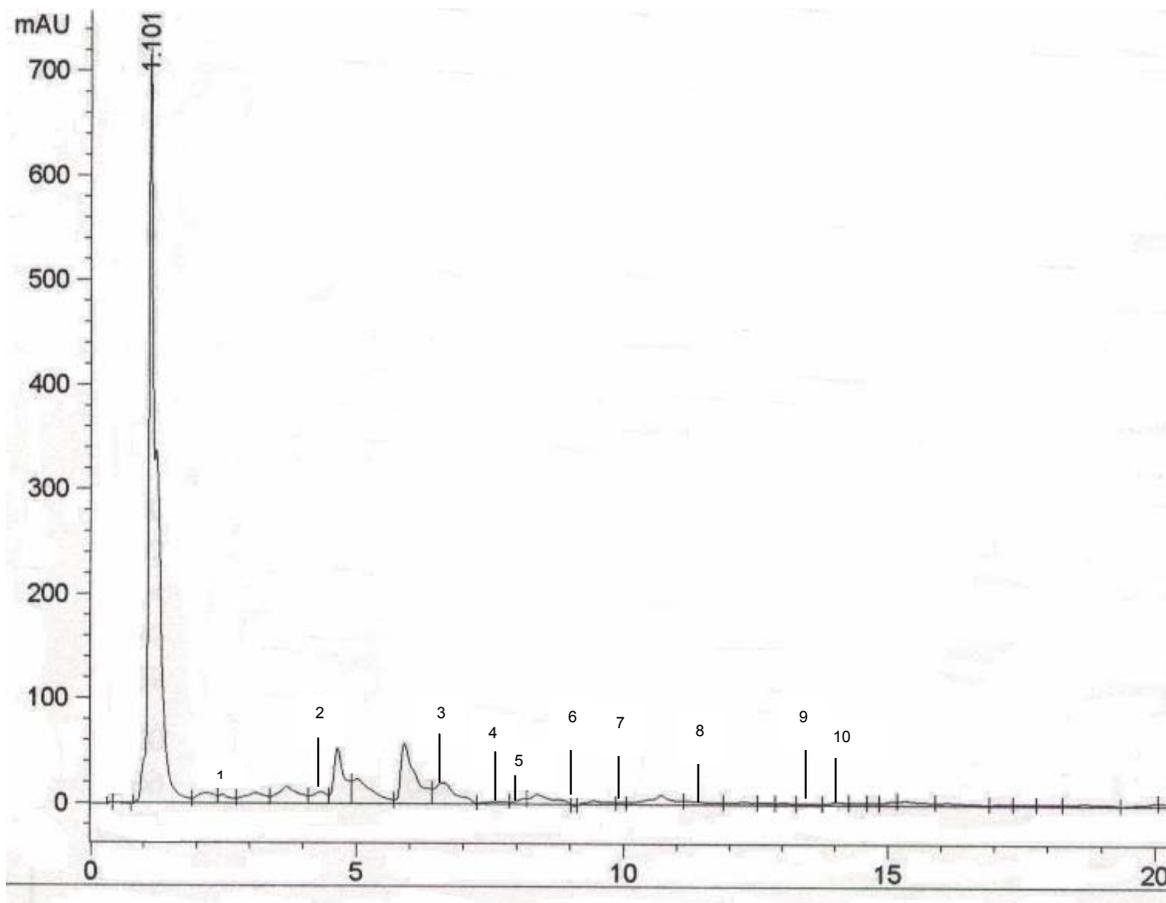


Figura 6. Cromatograma del extracto acuoso de Higuera

No.	Tiempo de retención	Compuestos fenólicos
1	2.497	ácido gálico
2	4.332	ácido protocatecuico
3	6.606	ácido 4-hidroxibenzoico
4	7.707	ácido vainílico
5	8.128	catequina
6	9.065	ácido clorogénico
7	9.982	ácido 4-hidroxi-3 metoxibenzoico
8	11.198	ácido cafeico
9	13.5285	epicatequina
10	14.027	vainillina

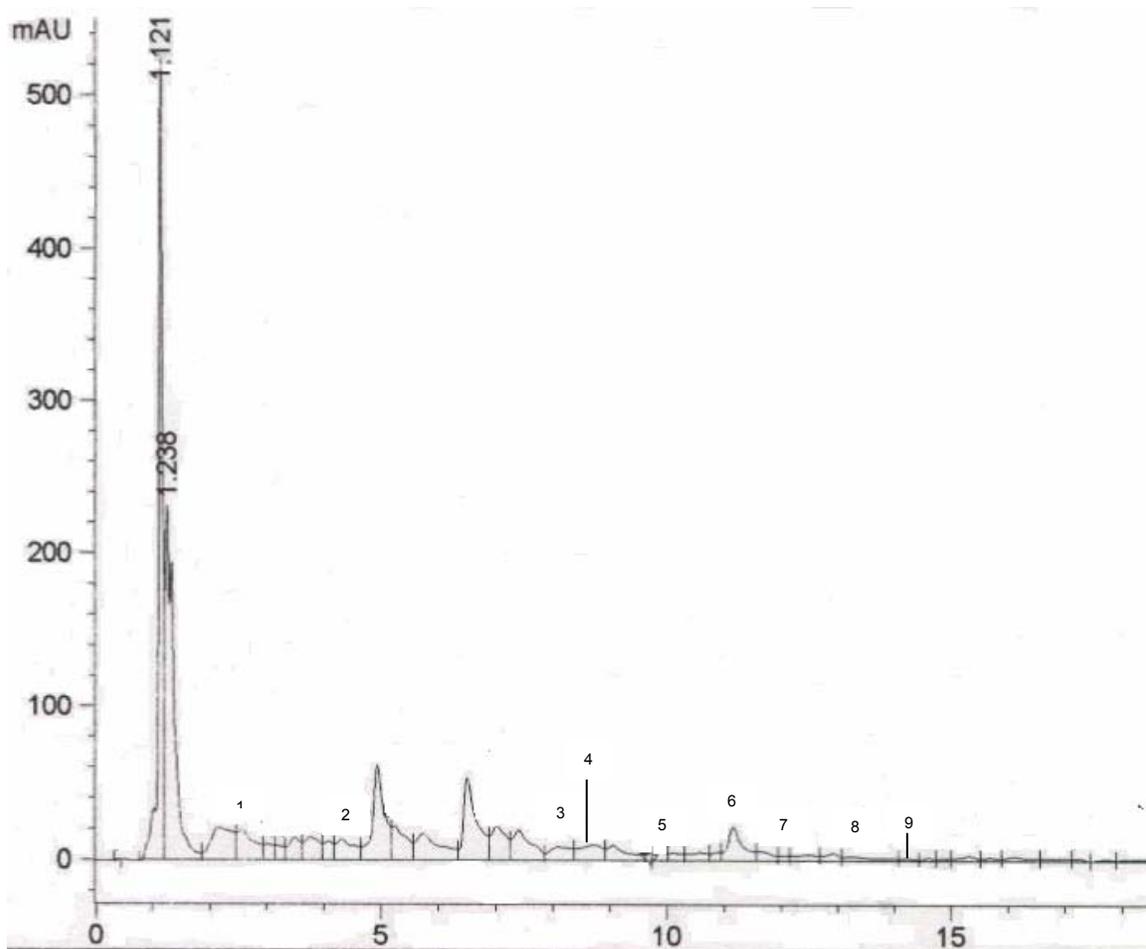


Figura 7. Cromatograma del extracto acuoso de N8025

No.	Tiempo de retención	Compuestos fenólicos
1	2.572	ácido gálico
2	4.312	ácido protocatecuico
3	8.077	catequina
4	8.688	ácido clorogénico
5	10.103	ácido 4-hidroxi-3 metoxibenzoico
6	11.152	ácido cafeico
7	13.215	Epicatequina
9	14.185	Vainillina

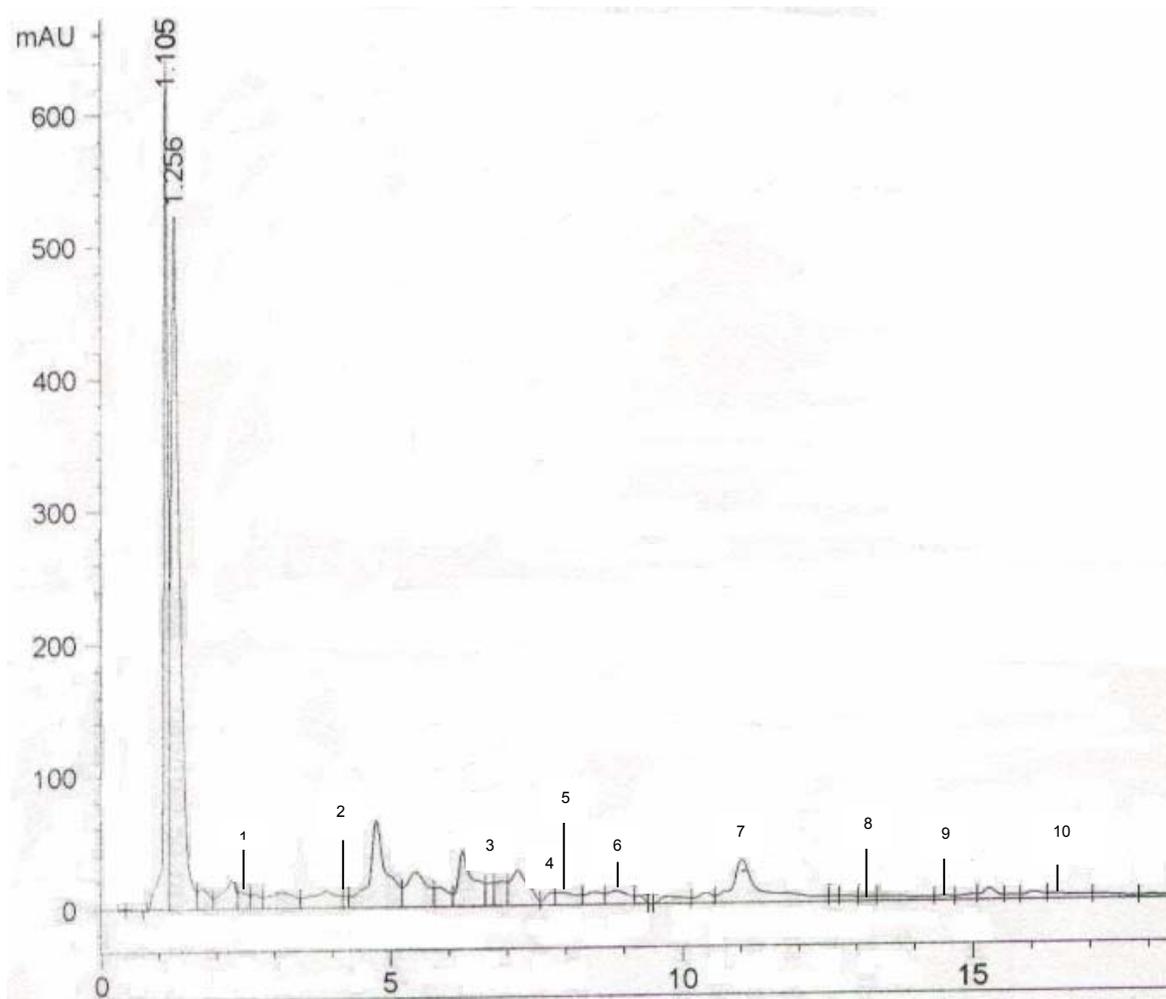


Figura 8. Cromatograma del extracto acuoso de Pinto Zapata

No.	Tiempo de retención	Compuestos fenólicos
1	2.412	ácido gálico
2	4.236	ácido protocatecuico
3	6.707	ácido 4-hidroxibenzoico
4	7.744	ácido vainillico
5	7.893	catequina
6	8.831	ácido clorogénico
7	11.014	ácido cafeico
8	13.143	Epicatequina
9	14.498	Vainillina

En el cuadro 9 se resume el total de los compuestos fenólicos identificados y su valor extrapolado a mg/100 g de muestra.

Cuadro 9. Concentración de compuestos fenólicos presentes en los extractos acuosos de frijol cocido

Acidos	Pinto Zapata*	Negro 8025*	Higuera*	Bayo Madero*
Gálico	3.86	9.68	3.91	6.85
Protocatecuico	1.84	9.14	6.20	18.97
4-hidroxibenzoico	4.59	0.00	16.16	13.43
Vanílico	13.36	0.00	4.08	0.00
Clorogénico	4.10	4.89	2.20	0.00
4-hidroxi-3-benzoico	0.00	1.95	1.16	1.52
Cafeico	41.31	19.06	10.39	0.00
Siríngico	0.00	1.13	0.00	0.00
Cumárico	11.93	7.12	12.47	6.96
Ferúlico	37.95	23.01	34.45	26.67
Benzoico	15.60	3.66	6.23	4.30
Salicílico	4.17	3.45	12.95	8.90
Flavonoides				
Catequina	5.72	14.67	6.79	6.34
Epicatequina	2.68	3.94	2.58	2.50
Vainillina	8.58	5.40	11.56	11.90
TOTAL	155	107	131	108

^a Los resultados representan el promedio de dos determinaciones.

* Los resultados están expresados en mg/100g de muestra.

Díaz-Batalla *et al.*, (2006) identificaron compuestos fenólicos totales en diferentes variedades de frijol cocido, utilizando el método de HPLC, entre ellas el frijol N8025 cocido: ácido *p*-hidroxibenzoico (7.5 µg/g) ácido vainílico (9.8 µg/g) ácido cumárico (4.7 µg/g) ácido ferúlico (27.9 µg/g).

Cabe mencionar que ellos llevaron a cabo la cocción en la autoclave por 20 min 1:3 (w/v). Esto representa una diferencia con esta investigación. En referencia al cuadro 12, los compuestos fenólicos presentes en los extractos de frijol cocido liofilizado los podemos dividir en dos familias principales: ácidos fenólicos y flavonoides. Ambos grupos se les ha atribuido efectos benéficos a la salud. Además que se encuentran ampliamente distribuidos en frutas y verduras, así como algunas leguminosas.

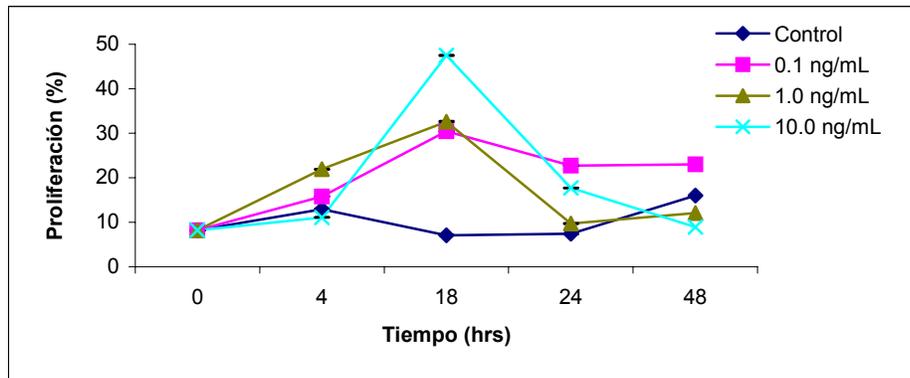
5. Determinación de la concentración de TNF α sobre la proliferación de diferentes líneas celulares (3T3, CoN112 y IEC-18)

Para realizar la parte *in vitro* fue necesario llevar a cabo un escrutinio con diferentes líneas celulares normales, para así obtener la mejor respuesta ante la presencia del promotor de tumores como lo es el factor de necrosis tumoral α (TNF α). Las células que se utilizaron en el presente estudio fueron: fibroblastos de ratón (3T3), células de colon humano (112CoN) y células intestinales de ileum de rata (IEC-18), las cuales fueron tratadas con TNF α a diferentes concentraciones (0.1, 1.0 y 10.0 ng/mL), y posteriormente se cuantificó el porcentaje de proliferación celular en diferentes tiempos (horas) mediante el método de MTT, obteniéndose para las células 3T3 un incremento en la proliferación (28%) a las 18 h con respecto al control, a una concentración de 1.0 ng/mL y a una concentración de 10.0 ng/mL se observa alrededor de un 38%; sin embargo, a mayores tiempos de incubación la proliferación es similar al control, lo cual posiblemente pueda deberse a una toxicidad de TNF α (Figura 9a).

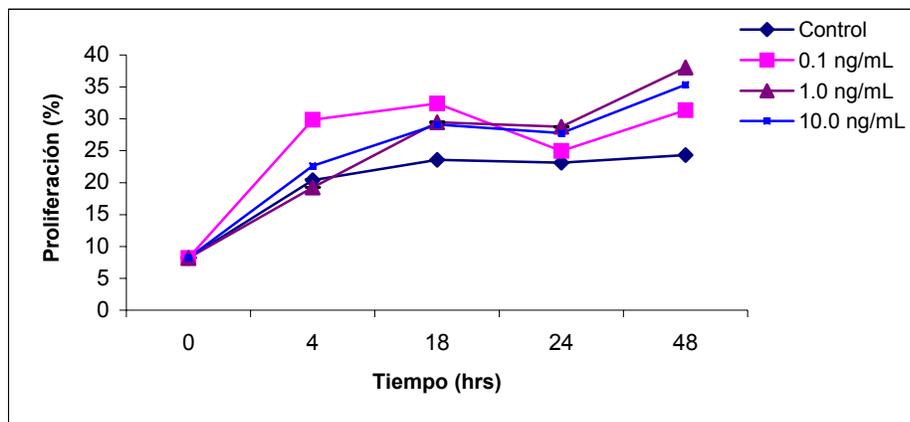
Para las células 112CoN la proliferación a las 18 h con respecto al control fue del 45% a una concentración de 0.1 ng/mL de TNF α , seguido de 1.0 ng/mL (30%) y este parámetro se mantiene conforme se incrementa el tiempo de incubación. Al aumentar la concentración del promotor a 10.0 ng/mL las células muestran un aumento la proliferación con respecto al tiempo. Sin embargo el uso de esta línea celular, fue mucho mas susceptible a la contaminación.

Las células IEC-18 a las 18 h presentaron un incremento de 40%, 30% 20% para 0.1, 1.0 y 10.0 ng/mL respectivamente (Figura 9c) y se observa una tendencia a aumentar dicha proliferación, aun cuando el comportamiento es muy similar al de las 112CoN, la proliferación de estas últimas es menor que las IEC-18. Las concentraciones de 0.1 y 1.0 ng/mL presentaron un aumento en la proliferación celular en las 3 líneas, sin embargo, las células IEC-18, fueron las que mostraron el mayor porcentaje de proliferación con respecto al tiempo de incubación, por lo tanto, esta línea fue seleccionada para los posteriores experimentos.

(a)



(b)



(c)

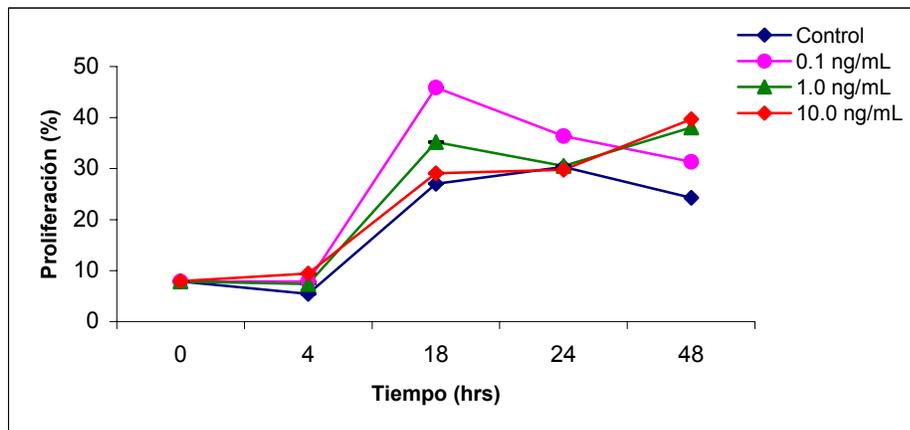


Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de TNF α (0.1, 1.0 y 10.0 ng/mL) sobre la proliferación de células normales 3T3 (a), 112CoN (b) e IEC-18 (c) incubadas durante 4, 18, 24 y 48 h.

Las gráficas representan resultados de dos experimentos independientes con 3 réplicas, no se observan las desviaciones estándar debido a que son demasiado pequeñas.
Transferencia de las células: 3T (3T3) y 5T (112CoN y IEC-18)
La proliferación fue evaluada mediante la técnica de MTT

Es importante mencionar que el número de transferencias en las que se encontraba cada línea celular y su respuesta frente al promotor de tumores, es un parámetro importante a tomar en cuenta, ya que esto puede afectar la respuesta, ya que entre mayor número de transferencias se altera el ciclo celular; por ejemplo: las 3T3 se encontraban en la tercera transferencia (3T); para las 112CoN y las IEC-18 en la 5T, y el comportamiento observado para estas últimas es muy similar entre sí.

Un estudio realizado por Rice *et al.*, (1992) en células de queratinocitos de humanos inmortalizados espontáneamente (SIK por sus siglas en inglés) en el cual observaron que durante las primeras transferencias tuvieron una eficiente formación de colonias alrededor de un 3 %, posteriormente después de la décima transferencia observaron alteraciones de las colonias formadas. Reportaron alteraciones en el ciclo celular, los cromosomas se ven afectados conforme se va incrementando el número de transferencias.

Estos autores determinaron un rango de transferencias (2 – 8) el cual puede ser reproducible sus resultados, además esto también dependerá de las características de la línea celular.

Por otro lado el TNF α juega un papel importante en la patogénesis de enfermedades inflamatorias intestinales. Altos niveles de este promotor se ha encontrado en biopsias de pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales, además existe evidencia que también indican que TNF α puede inducir la muerte celular a través de dos diferentes vías: necrosis o apoptosis; principalmente en las células del tracto gastrointestinal (Berin y Buell, 1995, Baldwin 2001). Sin embargo, en el presente estudio, este promotor proporciona a la célula normal una transformación parcial que afecta el ciclo celular, incrementado la proliferación en presencia de este promotor.

5.1. Determinación de la concentración de TNF α sobre células normales IEC-18, cuantificadas mediante el método de conteo celular.

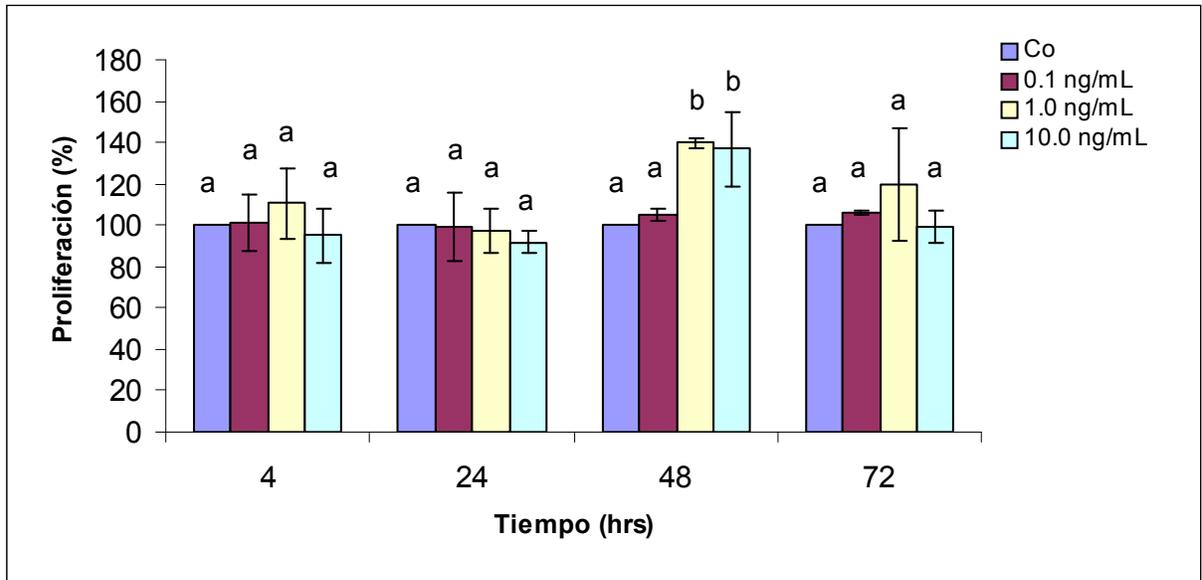
En base al escrutinio realizado a diferentes líneas celulares se decidió trabajar con las células IEC-18 (8T) la línea que en presencia del promotor proporcionó una mejor respuesta. Para corroborar los resultados evaluados con el método anterior, se llevo a cabo el mismo experimento pero ahora evaluando el porcentaje de proliferación y de sobrevivencia mediante conteo celular. Las células IEC-18 presentaron un incremento en el porcentaje de proliferación, y de igual forma se presenta una respuesta a las 48 h de incubación con una concentración de 1.0 y de 10 ng/mL, lo que representa una diferencia significativa con respecto al control, para el resto de las concentraciones y tiempo no se observaron cambios importantes (Figura 10).

Aún cuando se observó un incremento de la proliferación en presencia de una concentración de 10 ng/mL a las 48 h, está disminuye de manera importante a las 72 h con respecto a la concentración de 1.0 ng/mL. Por esta razón se decidió trabajar con 1.0 ng/mL, ya que se mantiene a las células mas estables y sin cambios tan drásticos.

En este estudio podemos sugerir que la diferencia entre los tiempos de máxima proliferación entre el estudio con MTT y conteo celular puede atribuirse a las condiciones de las células ya que en el primer experimento las células solamente habían presentado 5 transferencias y en el segundo experimento 8 transferencias, esto modifica la capacidad metabólica de la línea celular y por lo tanto la respuesta a ciertos agentes como los es el TNF α .

El porcentaje de sobrevivencia para las células IEC-18, nos muestra datos interesantes, ya que conforme pasa el tiempo (horas) incrementa la sobrevivencia hasta en un 300% para la concentración de 0.1 y 1.0 ng/mL. Estos datos sugieren que las células tratadas con TNF α son más resistentes a la muerte celular. Esto nos sugiere que en lugar de afectar el ciclo celular incrementando proliferación, solo afecta la sobrevivencia y a lo que las hace mas resistente en presencia de dicho promotor conforme pasa el tiempo.

(a)



(b)

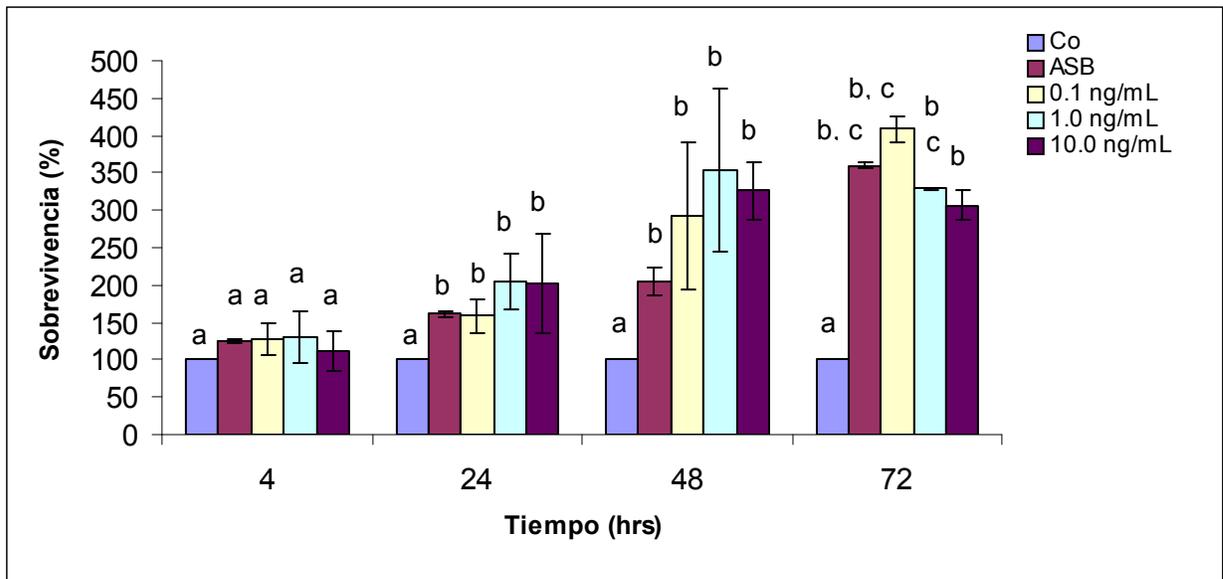


Figura 10. Efecto de diferentes concentraciones de TNF α (0.1, 1.0 y 10 ng/mL) sobre la proliferación (%) (a) y supervivencia (%) (b) de las células IEC-18.

La proliferación y supervivencia fue evaluada mediante la técnica de conteo celular.
Las gráficas representan resultados de dos experimentos independientes
Las letras diferentes representan diferencias significativas mediante la prueba de Tukey.
Transferencia 8
Co=control
ASB=Albúmina de suero bovino.

Por otro lado se ha demostrado que células de colon humano HCT – 116 (células transformadas para expresar TGF β) tratadas con estéres de forbol (PMA), el cual activa al factor de transcripción NF κ B, muestran efectos diferentes con respecto a la proliferación celular a diferentes tiempos de incubación. En tiempos cortos, PMA provoca la degradación de I κ B y la consiguiente translocación de NF κ B al núcleo produciendo un incremento de la proliferación celular. El tratamiento a largo plazo bloquea la activación de NF κ B, induce arresto del ciclo celular e inhibe proliferación (Peter *et al.*, 1991). Este efecto se ha demostrado solamente en líneas celulares provenientes del epitelio intestinal, la cual se distingue de las células gastrointestinales (Park *et al.*, 2007).

Por lo tanto este mismo efecto podría estar relacionado con la respuesta observada en las células IEC-18 tratadas con TNF α , donde a las 48 h se incrementa la proliferación y a las 72 h disminuye este parámetro. Además considerando el número de transferencias (8T) transcurridas durante el estudio.

El porcentaje de sobrevivencia para las células IEC-18, nos muestran datos interesantes, ya que conforme pasa el tiempo, incrementa la sobrevivencia hasta en un 300 % para las concentraciones de 0.1 y 1.0 ng/mL respectivamente. Estos datos nos sugieren que las celulas tratadas con TNF α son mas resistentes a la muerte celular, se ha demostrado que TNF α selectivamente induce apoptosis a través del ligando TRAIL, en varios tipo de células provenientes de tumores, pero rara vez lo hace en células normales, cuando estas se ponen bajo tratamiento con este promotor, TRAIL se expresa en tejidos sanos provenientes de hígado, cerebro, riñón, corazón y colon (Wei *et al.*, 2005).

5.2 Efecto citotóxico de los extractos acuosos de frijol cocido liofilizado

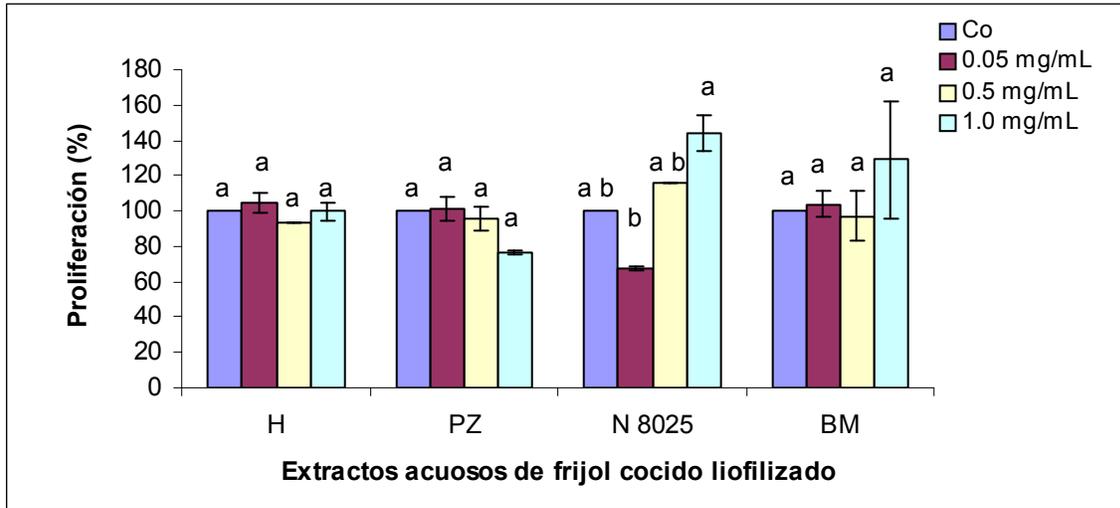
Una vez determinada la concentración de TNF α para inducir la proliferación y la línea celular a utilizar (IEC-18), se evaluaron diferentes concentraciones de los extractos acuosos sobre las células, esto con la finalidad de determinar el efecto citotóxico de cada una de las variedades expuestas a diferentes concentraciones (0.05 a 1.0 mg/ml). En la figura 11a se observa que la variedad Higuera y Bayo Madero no presentan ningún efecto negativo para ninguna de las concentraciones evaluadas. Pinto Zapata presentó un comportamiento similar, sin embargo, a una concentración de 1.0 ng/ml se observa una reducción del 20% de la proliferación celular, pero no es estadísticamente significativo, esto podría deberse a la presencia de algunos componentes del frijol que pudieran disminuir el ciclo celular. Para N8025 el comportamiento difiere un poco, ya que se observa que a menor concentración (0.05 ng/ml) tiene un efecto negativo, disminuyendo la proliferación y conforme aumentan las concentraciones, la sobrevivencia incrementa en un 20 a 40% respectivamente.

En la figura 11b se muestra el porcentaje de sobrevivencia, para la variedad Higuera a la concentración de 0.05 y 0.5 mg/ml se mantienen estables, pero a 1.0 ng/ml se observa un incremento de un 100% comparado con el control (ASB); a pesar de que la variedad de Pinto Zapata presenta un incremento en un 70% de sobrevivencia, el error estándar es muy grande, por lo tanto, no presentó diferencia significativa. N8025 solo provocó una disminución de la sobrevivencia en un 30% a la concentración de 0.05 mg/mL con respecto al control, y este efecto fue estadísticamente significativo. Bayo Madero no mostró ningún efecto a en este parámetro a las diferentes concentraciones evaluadas.

Es importante señalar que el comportamiento que se presenta en la sobrevivencia se le puede atribuir a que existen compuestos que le son útiles a las células para su desarrollo y mantenimiento, es probable también que dichos compuestos hagan más resistentes a las células disminuyendo la muerte celular.

En base a estos resultados se decidió utilizar 0.5 mg/mL del extracto de frijol para los siguientes estudios.

(a)



(b)

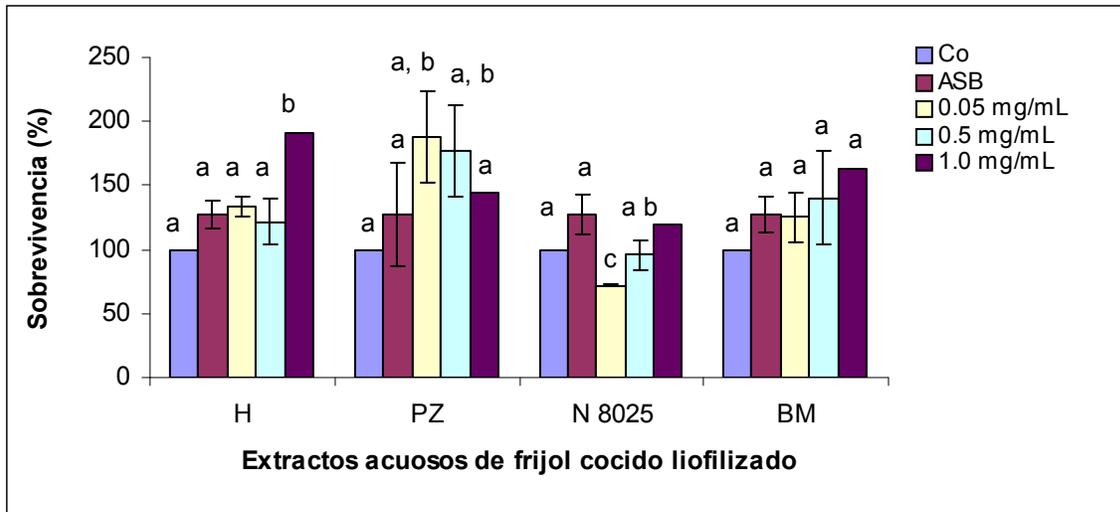


Figura 11. Efecto de los extractos acuosos de frijol liofilizado a concentraciones de 0.05, 0.5 y 1.0 mg/ml sobre células IEC-18. **(a)** proliferación (%) y **(b)** sobrevivencia (%).

La proliferación y sobrevivencia fue evaluada mediante la técnica de conteo celular.
Las gráficas representan resultados de dos experimentos independientes
Las letras diferentes representan diferencias significativas mediante la prueba de Tukey.
Co = Control; H = Higuera, PZ = Pinto Zapata, N8025 = Negro 8025 y BM = Bayo Madero.

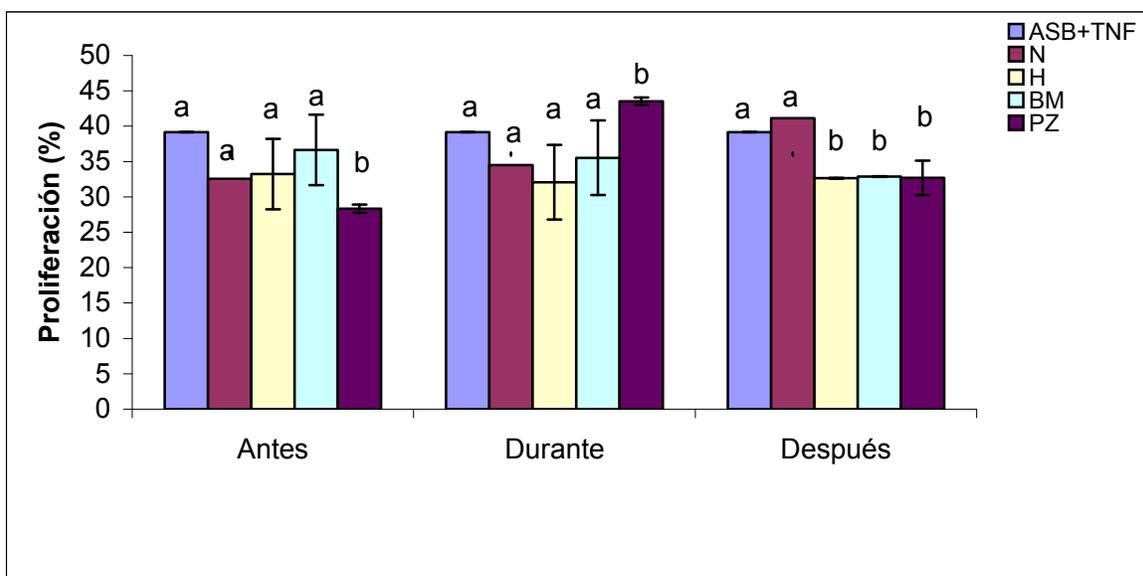
Se ha relacionado la nutrición con el buen funcionamiento de las células del epitelio intestinal, por ejemplo, el aminoácido glutamina que es un precursor de nucleótidos, glucosa, y otros aminoácidos que son importantes para el metabolismo de los colonocitos. La glutamina, además, es capaz de prevenir apoptosis de manera espontánea y también cuando este mecanismo es inducido por citocinas (Evans *et al.*, 2003). Es importante resaltar que la presencia de compuestos fenólicos en el extracto acuoso, podrían ir adheridos a estructuras de algunas proteínas o pequeños péptidos que favorecen el medio de cultivo de las células IEC-18, disminuyendo el mecanismo de apoptosis

5.3 Efecto de los extractos acuosos de diferentes variedades de frijol sobre células IEC-18 tratadas con TNF α .

En esta parte del estudio se evaluó la capacidad de los extractos del frijol para prevenir la transformación de las células normales tratadas con TNF α (12T), para lo cual se diseñaron experimentos con diferentes tiempos de incubación con el extracto de frijol: *antes* (células + EA; células + TNF α); *durante* (células + EA; células + TNF α + EA) y finalmente *después* (células + TNF α ; células + EA). En la figura 12a se observa que las células pre-tratadas (antes) con el EA de frijol Pinto Zapata reduce la proliferación celular en un 10% con respecto al control siendo este estadísticamente significativo, el mismo comportamiento (30%) fue observado para sobrevivencia, el N8025 sólo disminuye en un 8% la proliferación y un 20% la sobrevivencia, pero ambos parámetros no son significativos. El efecto del Pinto Zapata podría atribuirse a su mayor concentración de compuestos fenólicos entre los cuales destacan por encontrarse en mayor concentración el ácido cafeíco, seguido del ácido ferúlico comparado con Negro 8025.

En las figuras 12 a y b, se observan los resultados de estos tratamientos en los diferentes tiempos.

(a)



(b)

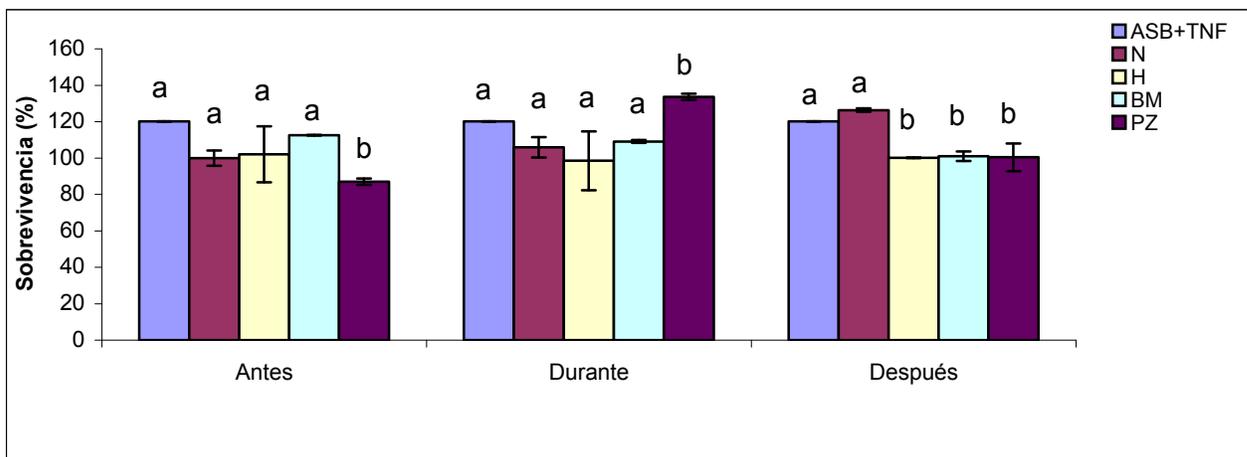


Figura 12. Efecto de los extractos acuosos (0.5 mg/mL) de las diferentes variedades de frijol sobre la proliferación (a) y sobrevivencia (b) de las células IEC-18 tratadas con $TNF \alpha$.

La proliferación y sobrevivencia fue evaluada mediante la técnica de conteo celular. Las gráficas representan resultados de dos experimentos independientes. Las letras diferentes representan diferencias significativas mediante la prueba de Tukey. Transferencia 12. Co = Control; BM = Bayo Madero, H = Higuera, PZ = Pinto Zapata, N8025 = Negro 8025.

Cuando las células fueron incubadas en el tiempo *antes* se observa un efecto protector por parte del extracto acuoso de PZ ya que se observa una disminución en la proliferación de un 10 %, siendo este diferente significativamente con respecto al control. Para el resto de los extractos si se observa una ligera disminución, siendo esta no significativa. En el caso de la sobrevivencia en este tiempo (antes) el extracto de PZ, presenta una disminución de un 30% con respecto al control, siendo este significativamente estadístico.

Para el tiempo *durante* en la proliferación, el extracto de PZ presenta un incremento del 7.0% estadísticamente significativo con respecto al control y para el caso de la sobrevivencia aumenta en un 10 %. Esto nos sugiere que al someter las células al extracto junto con TNF α potencia la proliferación. Para el resto de los extractos no se observan diferencias significativas.

Y finalmente cuando las células fueron expuestas a los extractos al tiempo *después* de la incubación con el promotor, se observó una reducción en la proliferación de alrededor de un 8.0% y de sobrevivencia de un 20% para los extractos H, BM y PZ, estas variedades tiene en común al ácido ferúlico en una concentración muy similar entre si, que van de 34.45, 26.67 y 37.95 mg /100 g respectivamente. A diferencia del N8025 contiene el ácido siríngico a diferencia del resto. Pudiera ser un facto por el cual no presenta ningún efecto protector.

El ácido ferúlico ha sido reportado por inhibir tumores en estómago de ratones inducidos con benzo[a]pireno, así también muestra la capacidad de reducir el número de fosas crípticas aberrantes (ACF por sus siglas en inglés) y la incidencia de adenocarcinomas en el colon en ratones (Han *et al.*, 2001).

Por otro lado se han reportado que los extractos de manzana son ricos en catequina y ácido clorogénico, estos tienen la capacidad de disminuir el daño en células epiteliales gástricas inducidas con indometacina al incrementar la actividad antioxidante intracelular (Graziani *et al.*, 2005). Dichos compuestos también presentes en los extractos de frijol, este

mecanismo podría estar relacionado con el efecto preventivo mostrado por el frijol Pinto Zapata en este estudio.

Los compuestos fenólicos también tiene la capacidad de funcionar como tratamiento, lo cual se demostró con las células incubadas con frijol después del tratamiento con TNF α . Un extracto de arroz (100 $\mu\text{g/ml}$) que contiene ácido protocatecuico, coumárico, cafeico y vanílico reduce la capacidad de formar colonias en células transformadas de colon (Hudson *et al.*, 2000).

Además, el ácido cafeico induce el arresto del ciclo celular y apoptosis en células de cáncer de colon humano (HCT116 y SW480), regulando la vía de señalización de la beta-catenina (Xiang *et al.*, 2006).

Se han realizado una serie de estudios en los cuales se ha demostrado que los compuestos fenólicos pueden interferir en diferentes etapas que conducen al desarrollo de tumores malignos, entre los principales son: proteger el DNA del daño oxidativo, inactivando a los carcinógenos, inhibiendo la expresión de los genes mutágenos y la actividad de enzimas encargadas de la actividad de procarcinógenos y activando los sistemas enzimáticos responsables de la detoxificación de xenobióticos (Bravo, 1998).

VIII: CONCLUSIONES

- La variedad Negro 8025 presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos (expresados como equivalentes de (+)-catequina), mientras que para la variedad Higuera fue la que mostró la menor concentración de dichos compuestos.
- Con respecto a las antocianinas, esta se encuentra fuertemente relacionada con la capacidad antioxidante ($r = 0.7391$) que presenta cada extracto acuoso de frijol. El extracto de N8025, presenta mayor capacidad antioxidante comparado con las otras variedades.
- Los principales ácidos fenólicos identificados en los extractos acuosos de los frijoles en estudio fueron: ácido ferúlico en todas las variedades, cafeico para Pinto Zapata y Negro 8025 y ácido protocatecuico para Bayo Madero. Con respecto a los flavonoides el de mayor concentración fue catequina para Negro 8025 y vainillina para Higuera y Bayo Madero.
- Las células que presentaron una mayor proliferación inducida por TNF α , fueron las IEC-18 y las 112CoN, sin embargo, esta última línea celular mostró una mayor susceptibilidad a la contaminación.
- El extracto acuoso del frijol Higuera a la concentración más alta probada mostró un mayor incremento en la sobrevivencia de las células IEC-18, N8025 disminuye la sobrevivencia a la más baja concentración probada. Este efecto no está relacionado con la concentración de ácidos fenólicos ni flavonoides.
- El extracto del frijol PZ, previene la transformación de las células IEC18, Higuera Bayo madero y Pinto Zapata tienen la capacidad de revertir el daño ocasionado por TNF α , y este efecto podría estar relacionado a la presencia de los principales ácidos fenólicos: ácido cafeico y ácido ferúlico.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aparicio-Fernández, X., Yousef GG.; Loarca-Piña G.; De Mejia E., and Lila A. M. 2005. Characterization of Polyphenolics in the Seed Coat of Black Jamapa Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food. Chem.* 53: 4615-4622.
- Abdel-Aal, E. S., Hucl, P. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleuroon and purple pericarp wheats. *Cereal Chem.* 76:350-354.
- Baldwin S. Albert. 2001. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *J. clin invest.* 10:pgs.
- Balkwill F., Charles, AK., Mantovani A., 2005. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* Vol.7:211-217.
- Banerjee S, Bueso-Ramos C, Aggarwal BB. 2002. Supresión of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor- κ B, ciclooxigenase 2, and matrix metalloprotease-9. *Cancer Res.* 62:4945-54.
- Babbs CF, 1990. Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radic Biol Med.* 8: 191-200.
- Belitz HD., y Grosch W. 1997. Química de los alimentos. 2da. ed. Acribia. España..
- Berin, MC, Buell MG. 1995. Phorbol myristate acetate ex vivo model of enhanced colonic epithelial permeability. Reactive oxygen metabolite and protease independence. *Dig Dis Sci.* 40(10):2268-79.
- Block G, Patterson B, Subar A. 1992. Fruits, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer.* 18: 1-29.
- Bravo, L. 1998. Polyphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev.* 56: 317-333.
- Cardador-Martínez, Castaño-Tostado, E., and Loarca-Piña G. 2002a. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Food Additives and Contaminants.* 19.1: 62-69.
- Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña G., and Omah, B., Dave. 2002b. Antioxidant Activity in Common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *J. Agric. Food Chem.*50: 6975-6980.
- Challa A., Rao Ramkishan D., Reddy Bandaru S. 1997. Interactive supresión of aberrant crypt foci induced by azoxymethane in rat colon by phytic acid and green tea. *Carcinogenesis* Vol. 18(10) pp.2023-2026.

- Clifford, MN. 2000. Sensory and dietary properties of phenols. En Proceedings of the 16th International Conference of Grape Polyphenol. Vol. 16, part II, pp. 18-23.
- Diaz-Batalla, L., Widholm, M. J., Fahey, Jr., G. Castaño-Tostado E., Paredes-López, O. 2006. Chemical components with Health Implications in Wild and Cultivated Mexican Common Bean Seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54, 2045-2052.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A.R., Paredes-Lopez, O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains. Characteristics, biosíntesis, processing and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40: 173-283.
- Decker EA. 1997. Phenolics: Prooxidants or antioxidants? *Nutritional Reviews*: 55(1),396-398
- DiDonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S., and Karin, M. 1996. Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1295–304.
- Dinarello CA, Moldawer LL. 1999. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians. Amgen, Thousand Oaks, CA, E.U.
- Elias, L.G., D.G. De Fernández, and R. Bressani. 1979. Posibles effects of seed coat polyphenolics on the nutritional quality of bean proteins. *J. Food Sci.* 44:524-527.
- Evans M.E., Jones D.P., and Ziegler T.R. 2003. Glutamine prevents cytokine-induced apoptosis in human colonic epithelial cells. *J.Nutr.* 133:3065-3071.
- Franco A., Sikalidis AK. And Herruzo Solis JA. 2005. Colorectal cancer: influence of diet and lifestyle factors. *Rev. Esp. Enferm Dig* (Madrid). Vol. 97(6): 432-448.
- Fernández-Pachón Ma. S., Villano D., Troncoso A., García-Parrilla C., 2006. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante del vino y valoración de sus efectos *in vivo*. Vol:56(2).
- Fresheney, R. 1994. Culture of animal cells. Alan R. Liss, Inc. NY, USA.
- Garland, C F., Garland, F C., Gorham, E. D. 1999. Calcium and vitamin D. Their potential roles in colon and breast cancer prevention. *Ann N. Y. Acad Sci.* 889: 107-19.
- Geil, P.B.,; Anderson, J.W. 1994. Nutrition and health implications of dry beans: a review. *J. Am. Coll. Nutr.* 13, 549-558.
- Ghadirian P, Cadotte M, Lacroix A, Baillageorn J, Perret C. 1993. Colon cancer in seven siblings. *Eur J Cancer.* 29:1553-1556.

- Gossé F, Guyot S, Roussi S, Lobstein Annelise, Fischer B, Siler N, Francis R. 2005. Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* Vol. 26:7. pp. 1291-1295.
- Graziani G, D'Argenio G, Tuccillo C, Loguercio C, Ritieni A, Morisco F, Del Vecchio Blanco C, Fogliano V, Romano M. 2005. Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and rat gastric mucosa in vivo. *Gut*. 54(2):193-200.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spiro L, Robertson M. 2003. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. 66; 589-600.
- Guzmán-Maldonado, SH., Paredes-López, O. 1998. Functional products of plant indigenous to Latin America: amaranth, quinoa, common beans and botanicals. *In: Functional Foods – Biochemicals & processing aspects*. Mazza G., (ed). Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster p:292-328.
- Guzmán-Maldonado, SH., Castellanos, J.; González de Mejía E. 1996. Relationship between theoretical and experimentally detected tannin content of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food. Chemistry*. 55:333-335
- <http://www.gacicuba.net/frijol.html> (2000)
- Hangen, L., Bennink, MR. 2002. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane induced colon cancer in rats. *Nutr Cancer*. 44(1):60-5.
- Harbone JB. 1989. General procedures and measurement of total phenolics. In: Harbone, J. B., *Methods in Plant Biochemistry* Vol. 1. New York: Academic Press, pp.1–28.
- Harris, CC. 1992. Tumors suppressor genes, multistage carcinogenesis and molecular epidemiology. *IARC Scientific Publication*. 116: 67-85.
- Harris PJ, Ferguson LR. 1993. Dietary fibre: its composition and role in protection against colorectal cancer. *Mutat Res*. 290: 91-110.
- Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Kronke, M., Ben-Neriah, Y., and Baeuerle, P. A. 1993. Rapid proteolysis of I κ B α is necessary for activation of transcription factor NF κ B. *Nature (Lond.)*, 365: 182–185.
- Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F. 1995. Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries. *Study Arch Intern Med.*; 155: 381-386

- Hudson E.a, Dinh PA, Kokubun T. Simmonds MS, Gescher A. 2000. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9(11):1163-70.
- Hughes, S., Joe, C G., and Wilson-Sanders, S. 1997. Dry beans inhibit azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *J. Nutr.* 127:2328-2333.
- Iniestra González, JJ., Ibarra Perez, FJ., Gallegos Infante JA., Rocha Guzmán, NE., y González Laredo RF., 2005. Factores Antinutricionales y actividad antioxidante en variedades mejoradas de frijol comun (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia* 39: 603-610.
- Kennedy AR. 1994. Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors. *Cancer Res.* 1;54(7 Suppl):1999s-2005s
- Kritchovsky, D. 1993. Colorectal cancer: the role of dietary fat and caloric restriction. *Mutat Res.* 290:63-70.
- Lamprecht SA, Lipkin M. 2003. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: Molecular mechanisms. *Nat. Rev. Cancer.* 3(8): 601-14.
- Liu, R.H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *J. Nutr.* 134, 3479S-3485S.
- Liu RH., Finley J. 2005. Potential cell culture models for antioxidant research. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4311-4314.
- Lodish, H., Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2003. *Biología Celular y molecular*. Cap. 24 p:1054-1069. Editorial Panamericana.
- Martínez-Valverde, I. Periago, M. J. Ros, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch. Latinoamer. Nutr.* (50):1:5-18.
- Martín-Cabrejas, M-A,; Esteban, R.M.,; Perez, P.; Maina, G,; Waldron, K. W. 1997. Changes in physicochemical properties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) during long-term storage. *J. Agric. Food. Chem.* 45:3223-3227.
- Nurmi, J T, Puolakkainen PA, Rautonen NE. 2005. *Bifidobacterium Lactis* sp. 420 up-regulates cyclooxygenase Cox-1 and down-regulates Cox-2 gene expression in a Caco-2 cell culture model. *Nutr. Cancer.* 51(1): 83-92.
- O'Brien NM., Woods JA., Aherne SA, O'Callaghan YC. 2000. Citotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell -culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochem. Soc. Trans.* 28:22-26.
- Pratt DE. 1992. Natural antioxidant from plantmaterial. In: Huang, M.T., Ho, C.T. and Li, C.Y. Eds., ACS Symposium Series 507. Phenolic compounds in food and their effects

- on health II. Antioxidants and cancer prevention. *American Chemical Society*, Washington, DC. 54-68
- Park KA, Byun HS, Won M, Yang KJ, Shin S, Piao L, Kim JM, Yoon WH, Junn E, Park J, Seok JH, Hur GM. 2007. Sustained activation of protein kinase C downregulates nuclear factor-kappaB signaling by dissociation of IKK-gamma and Hsp90 complex in human colonic epithelial cells. *Carcinogenesis*. 28(1):71-80.
- Pérez Herrera P., Esquivel Esquivel G., Rosales Serna R., Acosta Gallegos JA. 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México vol.52, no.2, p.172-180.
- Poligne B. and Baldwin SA. 2001. Positive and Negative Regulation of NFκB by COX2. *J. of Biol. Chem.* Vol. 276(42):38658-38664.
- Rao, C.V., Desai, D., Simi, B., Kulkarni, N., Amin, S & Reddy, B.S. 1993. Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res.*, 53:4182-4188.
- Ramamurthy, M.S., Maiti, B., Thomas, P. Y Nair, M. 1992. High performance liquid chromatography determination of phenolic acids in potato tubers (*solanum tuberosum*) during wound healing. *J. Agric. Food. Chem.* 1992. 40:569-572.
- Reddy B. 1999. Possible mechanisms by which pro-and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *J. Nutr.* 129:1478S-1482S.
- Rice H. Robert , Steinmann E. Kathleen, deGrafferied L. Ann, Qin Qin, Taylor Nancy and Schlegel Robert. 1993. Elevation of cell cycle control proteins during spontaneous immortalization of human keratinocytes. *Molecular biology of the cell*. Vol 4:185 – 194.
- Rimbach G., and Pallauf J. 1998. Phytic acid inhibits free radical formation in vitro but does not affect liver oxidant or antioxidant status in growing rats. *J. Nutr.* 128:1950-1955.
- Ríos- Ugalde MC., Reynoso Camacho R., Torres Pacheco I., Acosta Gallegos Jorge A., Salinas Palomino A.C., Ramos Gómez M., Gonzalez Jasso E., Guzmán Maldonado S H. 2007. Efecto del consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. *Revista Fitotecnia Mexicana*. En prensa.
- Sandberg A: 2002. Bioavailability of minerals in legumes. *Brit J Nutr.* 88 (suppl 3): S281-S285.
- Salinas-Moreno Y., Rojas-Herrera L., Sosa Montes E., y Pérez Herrera P. 2005. Composición de antocianinas en variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en México. *Agrociencia*. 39:385-394.

- Salvioli S., Sikora E., Cooper E.L., Franceschi C., 2007. La curcumina en los procesos de muerte celular: un reto para las terapias complementarias en el tratamiento de las patologías asociadas a la edad. *Digitalis eCAM* 4(2):181-190.
- Serrano J., Goñi I. 2004. Papel del fríjol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. *Arch. Latinoamer. Nutr.* v.54 n.1 Caracas mar.
- Shahidi F. y Naczki M. 1995. Foods phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Application. Tecnomonic, Publishing Co., Inc., eds. Lancaster, Pennsylvania, USA.
- Slattery M.L, West D.W, Robison L.M, Frech T.K, Ford M.H, Schuman KL, Sorenson AW. 1990. Tobacco, alcohol, coffee and caffeine as risk factors for colon cancer in a low risk population. *Epidemiology.* 1:141-145.
- Statland B E. 1992. Nutrition and Cancer. *Clin Chem.*38:1587-1594.
- Takeoka, G., Dao, L.T., Full, G. H., Wong, R. Y., Harden, R.A., Edwards, R. H., Berrios, J.D. 1997. Characterization of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3395-3400.
- Tracey KJ. 1994. Tumor necrosis factor-alpha. En: Thomson A. *The cytokine handbook*, ed 2, San Diego C.A: Academic Press;pp. 289-300.
- Traenckner, E. B., Pahl, H. L., Henkel, T., Schmidt, K. N., Wilk, S., and Baeuerle, P. A. 1995. Phosphorylation of human I κ B- α on serines 32 and 36 controls I κ B α proteolysis and NF κ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.*14:2876–2883.
- Trock B, Lanza E, Greenwald P. 1990. Dietary fibers, vegetables, and colon cancer: Critical review and metaanalyses of the epidemiologic evidence. *J. Natl Cancer Inst.* 82: 650-61.
- Van den Berg, R., Haenen, G.R.M.M. Van der Berg, H., Bast, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 1999. 66:511-517.
- Walker A R P, Walker B F. 1992. Faecal pH and colon cancer. *Gut.* 33: 572.
- Wei Wei, Liu Yanxin and Dexian Zheng. 2005. Current understanding in the immunological functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cellular & Molecular Immunology.* 2(4):265-269.
- Willet W C. 1986. Selenium, vitamin E, fiber, and the incidence of human cancer: an epidemiologic perspective. *Adv. Exp. Med Biol.* 206: 27-34.

Wang H, Cao G y Prior RL. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem*; 44: 701-705

Xiang D, Wang D. He Y. Xie J., Zhong Z, Li Z, Xie J. 2006. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer Drugs*. 17.(7):753-62.

IX. ANEXOS

Anexo 1.

Determinación de compuestos fenolicos (+) catequina-vainillina

Reactivos

- Ac. Clorhídrico al 8% en metanol (1L Tomar 216 mL del ácido y aforar a 1000 mL con metanol). Almacenar en refrigeración.
- Ac. Clorhídrico al 4% en metanol (1/2 L tomar 54 mL del ácido y aforar a 500mL con metanol). Almacenar en refrigeración.
- Vainillina al 1% en metanol (1L Pesar 10g de vainillina y aforar a 1000 mL con metanol). Almacenar en refrigeración.
- (+) catequina
- Solución (1:1) de HCl 8% : vainillina 1% (Tomar 20 mL de cada reactivo y mezclar = 40mL). Se prepara al momento de emplearse. No reutilizar.

Curva de calibración

Concentraciones curva de calibración: 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 mg/mL

(Realizar por duplicado la curva, sacar media de absorbancia y determinar la ecuación de la recta y la R^2)

- Pesar 20 mg de (+) catequina y aforar a 25mL con metanol
- De la solución anterior tomar 7.5 mL y aforar a 10 mL con metanol
- De la solución anterior tomar 6.6 mL y aforar a 10 mL con metanol
- De la solución anterior tomar 5.0 mL y aforar a 10 mL con metanol
- De la solución anterior tomar 5.0 mL y aforar a 10 mL con metanol

- Los experimentos se realizan por triplicado.
- Colocar 0.5 mL de cada concentración en tubos por triplicado
- Adicionar 2.5 mL de la solución 1:1 de HCl 8%: vainillina. Debe adicionarse 0.5 mL a cada uno de los tubos (15) y repetir la operación hasta completar los 2.5mL.
- Al blanco se le adicionan 0.5ml de metanol más 2.5ml de HCl al 4%
- Las muestras se deben de cubrir de la luz.
- Se colocan en baño maría a 30°C por 20 min.
- Leer a una absorbancia a 500 nm en el espectro. Luz visible
- Leer preferentemente de la concentración menor a la mayor.
- Determinar la ecuación de la recta y la R^2 que deberá ser cercana a 1, (0.99 preferentemente).

Determinación de compuestos fenólicos en la muestras (frijol)

Extracción de fenoles.

Reactivos

- Metanol
- Ac. Clorhídrico al 8%
- Vainillina al 1%
- Solución (1:1) de HCl 8% : vainillina 1% (Tomar 20 mL de cada reactivo y mezclar = 40mL). Se prepara al momento de emplearse. No reutilizar.

-

El experimento se realiza por triplicado para cada muestra:

- Colocar 1.0g de frijol en un matraz de 50 mL y adicionar 10 mL de metanol
- Cubrir la muestra y agitar durante 24 horas
- Centrifugar a 5000 rpm por 10 min.

- Tomar 0.5 mL del sobrenadante (muestra) y colocarlo en tubo de ensayo
- Se adicionan 2.0 mL de la solución 1:1 de HCl 8%: vainillina 1%. Debe adicionarse 0.5 mL a cada uno de los tubos (9) y repetir la operación hasta completar los 2.0 mL.
- Se prepara un blanco al cual se le adicionan 0.5 mL del sobrenadante (muestra) y añadir 2.0mL de HCl 4%
- Leer en el espectro a 500 nm.
- Comparar con la curva de calibración.

Anexo 2.

Capacidad antioxidante por el método de ABTS

Reactivos

ABTS 7mM

Persulfato de Potasio 140 mM

Procedimiento

1. Antes del realizar el ensayo, se requiere poner a reaccionar el ABTS 5 mL con Persulfato de Potasio, cubrir de la luz esta mezcla y mantenerlo a temperatura ambiente por 16 h.
2. Ajustar el ABTS con etanol, hasta obtener una absorbancia de 0.7 a una longitud de onda de 734 nm.
3. preparar diferentes concentraciones de Trolox (0, 50, 100, 300, 500, 800 y 1000 micromolar) leer a los 5 min de reaccion a 734 nm (se repite para las muestras)

Blanco 1	1 mL ETOH	100 µL de METOH
Blanco 2	1 mL ETOH	100 µL de agua
Control	1 mL METOH	100 µL de ABTS
Muestras (Trolox)	1 mL ABTS	100 µL de Trolox (conc.)
Muestra (Muestra9	1 mL ABTS	100 µL de muestra (FCL y EA).

Calculos:

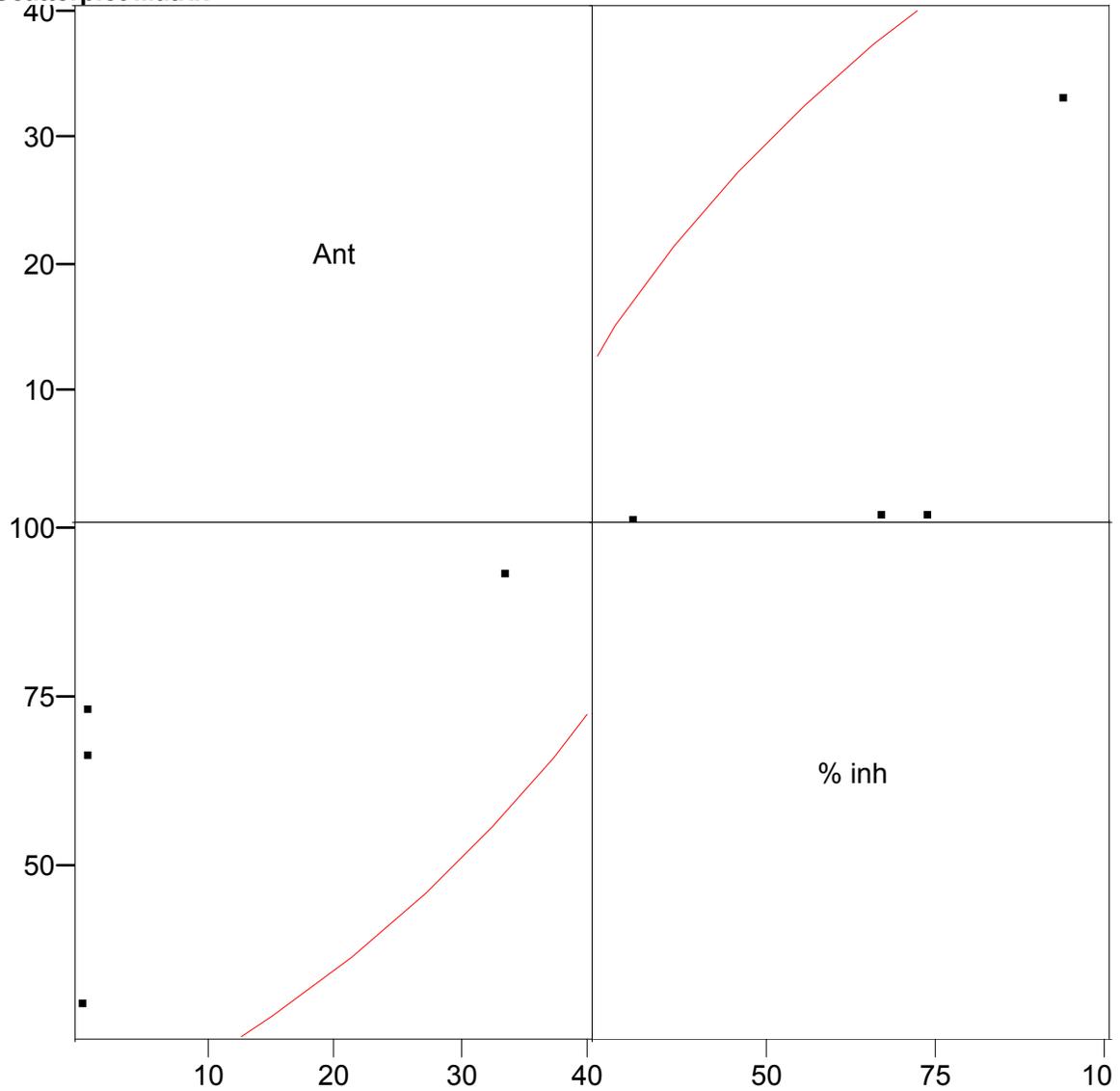
$$\% \text{ inhibición} = [(A \text{ control} - A \text{ muestra}) / A \text{ control}] * 100$$

Correlación frijol cocido liofilizado en cuanto a contenido de antocianinas y actividad antioxidante (ABTS)

Multivariate Correlations

	Ant	% inh
Ant	1.0000	0.7013
% inh	0.7013	1.0000

Scatterplot Matrix



Correlación de los extractos acuosos en cuanto a contenido de antocianinas y actividad antioxidante (ABTS)

Multivariate Correlations

	Ant	% inh
Ant	1.0000	0.7391
% inh	0.7391	1.0000

Scatterplot Matrix

