

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

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

**“ EFECTO PROTECTOR DE FRIJOL NEGRO 8025 SOBRE EL
DAÑO PANCREÁTICO Y RENAL GENERADO DURANTE EL
DESARROLLO Y COMPLICACIONES DE LA DIABETES ”**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

IBQ. MAGDALENA MENDOZA SÁNCHEZ
Expediente 165315

DIRIGIDA POR:

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, NOVIEMBRE DE 2009



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

EFFECTO PROTECTOR DE FRIJOL NEGRO 8025 SOBRE EL DAÑO PANCREATICO Y RENAL GENERADO DURANTE EL DESARROLLO Y COMPLICACIONES DE LA DIABETES

TESIS

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

Presenta:

IBQ. Magdalena Mendoza Sánchez

Dirigido por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

SINODALES

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Presidente

Dr. Luis Miguel Salgado Rodríguez
Secretario

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Vocal

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel
Suplente

Dr. Horacio Guzmán Maldonado
Suplente

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

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre, 2009
México

RESUMEN

El estrés oxidativo está directamente relacionado con un estado inflamatorio, caracterizado por la presencia de citocinas lo que puede producir una destrucción de las células β pancreáticas, desarrollar diabetes y generar daño renal. El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vivo*, utilizando ratas Wistar, el efecto preventivo de una dieta suplementada (25%) con harina de frijol Negro 8025 sobre el daño pancreático y renal inducido con 50 mg de estreptozotocina (STZ) por Kg P.C. En la harina, se cuantificó los fenoles totales, taninos condensados, antocianinas y capacidad antioxidante por el método de ABTS.

En la primera etapa del experimento, con grupos de animales; 1) Sano, 2) STZ y 3) Frijol-STZ, se evaluó el efecto preventivo sobre el daño pancreático, realizando análisis histológico al páncreas, el cual reveló que el tratamiento protege hasta 40% los islotes pancreáticos.

En la segunda etapa, grupos; 1) Sano, 2) STZ 3) STZ-frijol y 4) Frijol-STZ-Frijol, se evaluó el efecto sobre el daño renal y pancreático. Semanalmente, se cuantificó la glucosa sanguínea. Al final del experimento, se cuantificó el perfil lipídico y concentración de citocinas (TNF α e IL-1 β , respectivamente) en suero, utilizando kits enzimáticos y la técnica ELISA, respectivamente. También se evaluaron parámetros de daño renal, como proteína total y proteína específica microalbúmina en orina. Como resultado, se observó una disminución en concentraciones de glucosa del grupo alimentado con frijol respecto al control diabético. En cuanto a proteína, hubo una disminución del 31% y en microalbúmina 37%, respecto al control diabético. En el perfil lipídico, el mayor efecto se presentó en la concentración de colesterol y triglicéridos, disminuyendo en 29 y 22%, respectivamente. TNF- α en el suero de animales diabéticos comparado con el control fue de 116.3 ± 1.4 pg/ μ L y 90.0 ± 1.9 pg/ μ L, respectivamente, mientras que IL-1 β fue de 79 ± 1.7 pg/ μ L y 54.6 ± 2.7 pg/ μ L, respectivamente.

Por lo anterior, se concluye que el frijol N es capaz de proteger al páncreas de la destrucción causada por estrés oxidativo, y puede utilizarse como coadyuvante en la prevención de complicaciones renales.

Palabras clave: estrés oxidativo, destrucción pancreática, daño renal, diabetes.

SUMMARY

The oxidative stress is directly related to an inflammatory condition, characterized by the presence of cytokines that can result in the destruction of the pancreatic β cells to develop diabetes and generate kidney damage. The objective of this study was assessed the preventive effect of a supplemented diet (25 %) with black bean flour 8025 (N8025) on pancreatic and kidney damage induced on Wistar rats with 50 mg of streptozotocin (STZ) per kg P.C. In the flour were quantified total phenols, condensed tannins, anthocyanins and antioxidant capacity by the ABTS method. In the first stage of the experiment with groups of animals: 1) Healthy 2) STZ and 3) Bean-STZ, was assessed the preventive effect on pancreatic damage, performing a histological analysis of the pancreas, this revealed that the treatment protects up to 40 % of the pancreatic islets. In the second stage with groups of animals: 1) Healthy, 2) STZ, 3) STZ-Bean and 4) Bean-STZ-Bean, the effect on the kidney and pancreatic damage were assessed. Blood glucose level was assessed weekly. At the end of the experiment, the lipid profile and concentration of cytokines (TNF α and IL-1 β , respectively) were quantified in the serum of the rats, using enzymatic kits and the ELISA technique, respectively. Also, kidney damage parameters such as protein and microalbumin in urine were assessed. A decrease in glucose concentrations of the Bean-STZ group was observed with regard to STZ group. Regarding protein and microalbumin were decrease of 31 % and 37 % respectively in the Bean-STZ group compared with STZ group. In the lipid profile, the major effect was present in the concentration of cholesterol and triglycerides, these decreasing 29 % and 22 %, respectively. TNF- α in the serum of Bean-STZ group and STZ group were 116.3 ± 1.4 PG/ μ L and 90.0 ± 1.9 pg/ μ L, respectively, while IL-1 β concentrations were 79 ± 1.7 pg/ μ L and 54.6 ± 2.7 pg/ μ L, for treated and no treated animals respectively.

From the, it can be concluded that the N8025 bean is able to protect the pancreas from destruction caused by oxidative stress, and can be used as a coadjuvant in the prevention of kidney complications.

Key words: Oxidative stress, pancreatic destruction, kidney damage, diabetes.

DEDICATORIAS

***A Dios todo poderoso.** Te agradezco infinitamente la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida que sin duda me ha hecho crecer, por estar conmigo en todo momento y sostenerme en las más grandes pruebas.*

***A Cristofer Alex,** mi pequeño regalito de Dios, pues de ti pedacito de cielo, he aprendido que no importa cuán difícil sea la situación, el deseo de vivir y ser feliz es mas grande. Gracias por estar conmigo y acompañarme a todos lados en esta etapa, Te Amo hijito y te dedico mi trabajo y vida.*

***A Alejandro,** mi Amor incondicional y esposo, pues has sido mi puerto y calma, por tu apoyo en todos los sentidos y por la fuerza que me das, por no dudar ni un momento de que somos capaces de tener éxito. Estaremos juntos en las buenas, en las malas y en las peores. Te Amo Alex,*

***A mi mama y papa,** pues son un ejemplo de fe, lucha, sacrificios, perseverancia y amor, porque han estado en todo momento a mi lado, por su confianza y apoyo incondicional. Están en mi corazón y les estoy eternamente agradecida por lo que ahora y siempre seré.*

***A mis hermanos Noé, Chuy y Pedro,** pues han estado al pie del cañón siempre que los he necesitado. Gracias por su amor y apoyo. Los quiero mucho. Ánimo en su trabajo y estudio, todo se verá recompensado.*

***A mis amigos y compañeros,** Susy, Consuelo, Aldrin, Viry, Miguel, Fanny, por su amistad y apoyo, en especial a Susy y consuelo que siempre han estado conmigo como dos hermanitas. A mis compañeros y amigos de generación y laboratorio, Angélica, Chio, Ivan, Germán, Flor, Karla, Roberto, Iraís. Especialmente a Ariadna, que sin ti nena no podría haber finalizado este experimento, Dios te bendiga.*

AGRADECIMIENTOS

Al H. Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto de vida y profesional.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Programa de Posgrado en alimentos del Centro de la República, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A la Dra. Rosalía Reynoso, por ser la directora de esta tesis y a quien agradezco su apoyo y preocupación a lo largo de mi estancia en este posgrado.

A mis sinodales, Dr. Heber Luis Hernández por todo su apoyo y comprensión, Dr. Luis Miguel Salgado, Dr. Horacio Guzmán, Dra. Guadalupe Loarca, por las aportaciones y apoyo otorgado a este trabajo.

A Carmelita, Laurita y a todo el personal administrativo, por apoyarnos todos los días en nuestros deberes y recordarnos que siempre hay que ser responsables.

A todo el personal que estuvo siempre dispuesto, Benjamín, Mariana, Lupillo, Don Víctor, Sheila y en especial a Ernesto que me brindó su amistad y apoyo en la facultad de medicina.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
ÍNDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1 Diabetes mellitus	4
2.1.1 Diabetes mellitus tipo 1	4
2.1.2 Diabetes mellitus tipo 2	5
2.2 Diagnósticos de diabetes	5
2.2.1 Glucosa plasmática	5
2.2.2 Curva de tolerancia oral de glucosa	6
2.2.3 Insulina o péptido C.....	6
2.2.4 Anticuerpos	6
2.3 Alteraciones metabólicas en la diabetes.....	7
2.4 El estrés oxidativo en el desarrollo de diabetes mellitus.....	8
2.4.1 Citocinas pro-inflamatorias y su relación con la diabetes mellitus.....	10
2.4.2 Los radicales libres y las citocinas pro-inflamatorias en la destrucción de las células β del páncreas.....	11
2.5 Nefropatía diabética.....	13
2.6 Tratamiento preventivo de la diabetes.....	15
2.6.1 Generalidades del Frijol	16
2.6.2 Aporte nutricional y nutracéutico del frijol común	16
2.6.3 Compuestos fenólicos en el frijol.....	17

III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS.....	20
V. OBJETIVOS.....	20
VI. METODOLOGÍA	21
6.1 Material biológico.....	21
6.2 Elaboración de harinas de frijol cocido	21
6.3 Cuantificación de fenoles totales	21
6.4 Cuantificación de taninos condensados en la harina de frijol cocido	21
6.5 Cuantificación de antocianinas en la harina de frijol cocido.....	22
6.6 Capacidad antioxidante de la harina de frijol cocido.....	23
6.7 Estudios <i>in vivo</i>	23
6.8 Inducción de diabetes con estreptozotocina	25
6.9 Cuantificación de glucosa sanguínea	26
6.10 Determinación de citocinas pro-inflamatorias por el método de ELISA.....	26
6.11 Determinación de perfil lipídico.....	26
6.12 Determinación de microalbúmina, creatinina y glucosa en la orina	27
6.13 Evaluación histopatológica del páncreas y riñón	27
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de la harina de frijol N8025 cocido.....	28
7.2 Evaluación in vivo de ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada con frijol cocido N8025	30
7.2.1 Glucosa sanguínea.....	30
7.2.2 Perfil lipídico	33
7.2.3 Peso corporal.....	36
7.2.4 Consumo de agua.....	39
7.2.5 Consumo de alimento	41
7.2.6 Parámetros de función renal	42

7.2.6.1 Glucosa en orina.....	42
7.2.6.2 Concentración de creatinina en orina	45
7.2.6.3 Concentración de microalbúmina.....	46
7.3 Concentración sérica de IL-1 β y TNF- α	48
7.4 Análisis histológico del riñón.....	51
7.5 Análisis histológico de páncreas.....	52
VIII. CONCLUSIONES	55
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Concentraciones de glucosa establecidas para el diagnóstico de la diabetes	5
2	Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en la harina de frijol cocido N 8025	28
3	Contenido del perfil lipídico en suero de ratas sanas y diabéticas alimentadas con frijol antes y después de la inducción de diabetes	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Vías metabólicas inducidas por la hiperglicemia, debido a la elevada producción de radicales libres.	10
2	Moléculas que afectan a la célula β .	12
3	Estrategia general del modelo experimental preventivo en ratas alimentadas antes de la inducción de diabetes.	25
4	Estrategia general del modelo experimental sobre las complicaciones de la diabetes en ratas alimentadas antes y después de la inducción de la enfermedad.	26
5	Concentración de glucosa sanguínea de ratas alimentadas durante cuatro semanas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) y posteriormente inducidas con estreptozotocina	34
6	Concentración de glucosa sanguínea de ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de diabetes.	36

7	Peso corporal de ratas alimentadas durante cuatro semanas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) y posteriormente inducidas con estreptozotocina	40
8	Peso corporal de ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de diabetes	41
9	Agua consumida de ratas alimentadas durante cuatro semanas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) y posteriormente inducidas con estreptozotocina	43
10	Consumo de agua de ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de diabetes	44
11	Alimento consumido por ratas alimentadas durante cuatro semanas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) y posteriormente inducidas con estreptozotocina	45
12	Alimento consumido por ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de diabetes	46
13	Concentración de glucosa en orina de ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la	48

inducción de diabetes

- | | | |
|----|---|----|
| 14 | Concentración de creatinina en orina de ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de diabetes | 49 |
| 15 | Concentración de microalbúmina en orina de ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de diabetes | 51 |
| 16 | Concentración sérica de TNF- α e IL-1 β de ratas alimentadas durante cuatro semanas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) y posteriormente inducidas con estreptozotocina | 53 |
| 17 | Concentración sérica de TNF- α e IL-1 β de ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de diabetes | 54 |
| 18 | Microfotografías de corteza renal pertenecientes a riñón de (a) grupo Preventivo- tratamiento. (b) Grupo Tratamiento. (c) Control diabético. Tinción con hematoxilina-eosina | 55 |
| 19 | Micrografías histológicas del páncreas de ratas tratadas con frijol N8025 antes de la inducción de diabetes. (A) Islote de control diabético. (B) Islote de grupo preventivo. (C) Área de células β . | 56 |

- 20 Micrografías histológicas del páncreas de ratas tratadas con frijol N8025 antes y después de la inducción de diabetes. (A) Islote de control diabético. (B) Islote de grupo preventivo-tratamiento. (C) Islote de grupo tratamiento. (D) Área de células β . 58

I. INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo es un estado, causado por un desequilibrio entre la producción de radicales libres (ROS) y la capacidad del organismo para eliminar el exceso. Las especies reactivas de oxígeno están relacionadas con el desarrollo de un estado inflamatorio, originándose en muchas ocasiones enfermedades crónico degenerativas, como la diabetes mellitus y sus complicaciones (Wellen y Htamisliligil., 2005).

En el desarrollo de la diabetes, la presencia de radicales libres y otras moléculas como citocinas pro-inflamatorias y óxido nítrico, ocasionan la destrucción de las células β -pancreáticas, provocando de esta manera que se vea limitada la producción parcial o total de esta hormona. La función principal de la insulina, es introducir glucosa a células de tejido adiposo y tejido muscular, controlando así los niveles de glucosa en la sangre.

Debido a esta alteración pancreática, se generan concentraciones elevadas de glucosa en sangre (Manrique y Silva, 2006). Esta característica es común en la diabetes, y aumenta aún más durante el estrés oxidativo, permitiendo así, que bajo condiciones no controladas de hiperglicemia, se desarrolle un estado inflamatorio agudo, que conlleva a la destrucción de las células pancreáticas y a la generación de las complicaciones propias de la enfermedad, tales como la nefropatía diabética, la cual es una de las principales causas de mortalidad en los pacientes que padecen la diabetes.

Es por esto que la diabetes mellitus a nivel mundial es una de las principales causas de muerte y en México ocupa el primer lugar de defunciones. La enfermedad se presenta no solo en la edad adulta sino también en niños y jóvenes, entre los cuales los problemas de obesidad, cambios en la dieta y el actual estilo de vida parecen tener un impacto directo sobre el desarrollo de la enfermedad.

Debido a lo anterior, esta enfermedad es considerada como un problema de salud pública, ya que los costos requeridos para su tratamiento, equivalen al 20% del gasto total de las instituciones públicas (Arredondo y col., 2005).

Por lo anterior, se puede decir que mantener en equilibrio a los radicales libres y controlar los niveles de glucosa en sangre resulta efectivo para prevenir el desarrollo de la enfermedad y por otro lado la evolución de sus complicaciones clínicas.

El empleo de diferentes fármacos es usado con este propósito pero además, la dieta juega un papel muy importante. En años recientes, la dieta mediterránea se ha asociado con la baja incidencia de enfermedades crónico degenerativas, tales como el cáncer, la aterosclerosis y la diabetes (Pitsavos y col., 2005). Sus propiedades han sido relacionadas estrechamente con los compuestos antioxidantes que contiene, tales como fibra, compuestos fenólicos, ácidos grasos omega 3, entre otros (Wahle y col., 2004).

Con este fin, se ha venido utilizando al frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), una leguminosa a la cual se le atribuye un efecto positivo como coadyuvante en el tratamiento de la diabetes.

Estudios realizados con diferentes modelos de animales sanos y diabéticos inducidos químicamente, han demostrado el efecto hipoglucemiante y antihiper glucémico de diferentes extractos de frijol (Roman-Ramos y col., 1995; Petlevski y col., 2001; Subramanian y Leelavinothan, 2002). Recientemente se demostró que en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, la incorporación de harinas de frijol cocido a su dieta, disminuyó los niveles de citocinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) en sangre, además de que a su vez, se correlacionó con una disminución de marcadores de daño renal, como albúmina y creatinina en orina (Lomas y col., 2008).

Estos estudios han establecido que, una vez iniciada la diabetes, una dieta a base de frijol tiene la capacidad para controlar la concentración de citocinas y el daño renal en un modelo de diabetes. Sin embargo, no se tiene información acerca del

efecto del frijol como preventivo para el desarrollo de la diabetes. Por otro lado, existen estudios que demuestran que diversos compuestos anti-oxidantes, han sido utilizados para prevenir la destrucción de las células β del páncreas y el estrés oxidativo que precede al desarrollo de la diabetes (Slonim y col., 1993; Handen y col., 2009)), lo que se puede tomar como base para establecer que el frijol en este sentido podría ejercer una función similar debido a su contenido de compuestos anti-oxidantes y de otras moléculas que pudieran tener efecto protector.

II. ANTECEDENTES

2.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglicemia, la cual es el resultado de defectos en la secreción o acción de la insulina, esto trae como consecuencia una disminución de la incorporación de glucosa a células dependientes de ella y un aumento en la producción de la misma (gluconeogénesis) (Atlas de la diabetes, 2002; Eknoyan, 2007).

Esta enfermedad comprende un grupo de trastornos metabólicos, tales como, el metabolismo de glucosa, lípidos y proteínas que en conjunto comparten el fenotipo de la hiperglicemia (Malacara y col., 1997).

Existen varios tipos de diabetes mellitus que podrían resultar como consecuencia de una compleja interacción genética, factores ambientales y modificaciones en el estilo de vida y alimentación. Dentro de estos tipos de diabetes se encuentran principalmente, la diabetes mellitus tipo 1 y la diabetes mellitus tipo 2.

2.1.1 Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1, también conocida como diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) ó diabetes juvenil, es el resultado de la destrucción auto-inmunitaria de las células β del páncreas, que suele provocar déficit de insulina (Malacara y col., 1997).

Los pacientes que la padecen dependen de la administración de insulina para incorporación intracelular de glucosa y evitar así el desarrollo de cetoacidosis. Este tipo de diabetes es común en la juventud pero puede aparecer a cualquier edad. Se caracteriza por insulinopenia y al tiempo del diagnóstico frecuentemente se encuentran anticuerpos anti-insulina.

2.1.2 Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2, también conocida como diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID), está caracterizada por desórdenes en la acción o secreción de insulina y un aumento de la producción de glucosa (Malacara y col., 1997). En este tipo de diabetes los tejidos que dependen de insulina (muscular esquelético y adiposo) tienen una respuesta reducida a la acción de la insulina, efecto conocido como resistencia a la insulina.

Este tipo de diabetes se da entre la población mexicana debido a una alta susceptibilidad genética a desarrollarla, la cual adicionalmente se ve afectada por factores ambientales y físicos como la obesidad que son sin duda de los más impactantes en su desarrollo.

2.2 Diagnóstico de diabetes

2.2.1 Glucosa plasmática

La presencia de glucosa a una concentración superior a 126 mg/dL en plasma sanguíneo en ayunas es compatible con el diagnóstico de diabetes mellitus si se ha presentado al menos en dos ocasiones sin otra causa que lo justifique. Los valores inferiores a 110 mg/dL (6.1 mmol/L) descartan el diagnóstico (Cuadro 1). Conviene destacar que el nivel sanguíneo de glucosa es inferior en sangre venosa que en sangre arterial y capilar (sangre obtenida por punción de la yema del dedo), de modo que el nivel de glucosa viene determinado por el punto de extracción de la sangre (Lundstrom y Rossini, 2004).

Cuadro 1. Concentraciones de glucosa establecidas para el diagnóstico de la diabetes.

	Glucosa en ayuno	Glucosa después de 2h
Diabetes mellitus	≥ 7.0 mmol/L (126 mg/dL)	≥11.1 mmol / L (200 mg/dL)
Problemas de tolerancia a la glucosa	≥ 7.0 mmol/L (126 mg/dL)	≥7.8 o ≤11.1 mmol/L (140-200 mg/dL)
Problemas de glucosa en ayuno	≥6.1 ≤7.0 mmol/L (110 -126 mg/dL)	≤7.8 mmol / L (140 mg/dL)

2.2.2 Curva de tolerancia oral de glucosa

Es la principal prueba diagnóstica al someter al organismo a una cantidad estándar de glucosa que se debe administrar en un tiempo de dos horas. Se efectúa con 75 g de glucosa oral o con 1.75 g/kg de peso hasta 75 g. Se acompaña con 400 ml de agua y se ingiere en 5-10 minutos. Según los grupos de expertos, se debe extraer una muestra basal y otra a las 2 horas. Normalmente la curva, si hay buena absorción, no deberá superar los 200 mg/dL, y deberá normalizarse a los 120 minutos, con valores inferiores a 140 mg/dL. Se considera estado de intolerancia a glucosa, situación que es reversible con el tratamiento adecuado, si en el punto de los 120 minutos, la concentración plasmática de glucosa está entre 140 y 200 mg/dL. Por encima de este límite, el resultado es compatible con un estado de diabetes mellitus (Friedman, 2004).

2.2.3 Insulina o péptido C

Tanto en la condición basal como después de la sobrecarga se pueden conocer los cambios de la insulina plasmática. Puede emplearse el péptido C (fragmento inactivo liberado por el páncreas en proporción 1:1 a la hormona) para valorar la producción pancreática residual de insulina, si el paciente se inyecta insulina. En la diabetes mellitus tipo 1, la producción de la hormona es prácticamente nula, mientras que en la diabetes mellitus tipo 2 tiende a ser elevada para contrarrestar la resistencia de los tejidos a su acción (Friedman, 2004).

2.2.4 Anticuerpos

La diabetes mellitus tipo 1 se debe a la destrucción de origen autoinmune de las células β del páncreas y lleva a la deficiencia absoluta de insulina. En un elevado porcentaje de los pacientes, se detectan anticuerpos anticélulas β (ICAs), anticuerpos antiinsulina (IAA) y anticuerpos antidescarboxilasa de ácido glutámico (GAD). Estos anticuerpos se pueden detectar en ocasiones antes de la aparición

de la enfermedad, lo que les da un gran valor predictivo (Lundstrom y Rossini, 2003).

2.3 Alteraciones metabólicas en la diabetes

Los cambios en el metabolismo de los lípidos en la diabetes mellitus tipo 2 son llamados dislipidemia diabética la cual puede aumentar el riesgo de la aterosclerosis.

Las principales anormalidades lipídicas observadas en pacientes con diabetes mellitus tipo II son las siguientes:

- Niveles elevados de triglicéridos.
- Niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad HDL.
- Niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad LDL.

Los triglicéridos son producidos por la esterificación del glicerol y ácidos grasos libres, y son almacenados principalmente en el tejido adiposo donde son utilizados como fuente de energía. Los niveles de triglicéridos en plasma en los pacientes diabéticos están elevados principalmente por el incremento en la producción de lípidos complejos como VLDL (lipoproteína de muy baja densidad) en el hígado. La sobreproducción de VLDL esta estimulada por el incremento de ácidos grasos libres disponibles provenientes de la dieta (exceso de nutrientes).

Por otro lado, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) eliminan los excesos de colesterol proveniente de los tejidos y lo transporta al hígado para ser eliminado o reciclado. Elevados niveles de HDL protegen contra enfermedades cardiovasculares. La resistencia a la insulina incrementa la eliminación de HDL, debido a que las concentraciones de glucosa se encuentran elevadas, esto trae como consecuencia un incremento en los niveles de triglicéridos lo que inhibe la producción y acción de HDL y de este modo disminuyen los niveles de HDL en plasma reduciéndose su actividad cardioprotectora (Bosch y col., 2002).

En los pacientes diabéticos las LDL se encuentran incrementadas. Las LDL, son moléculas circulantes ricas en colesterol, derivadas del procesamiento lipolítico de las VLDL por acción de diversas lipasas extracelulares, principalmente la lipasa lipoproteica. La constante lipólisis genera una gran cantidad de partículas de LDL pequeñas y densas, junto con una menor cantidad de HDL. Los triglicéridos son producidos por la esterificación del glicerol y ácidos grasos libres, y son almacenados principalmente en el tejido adiposo donde son utilizados como fuente de energía. Los niveles de triglicéridos en plasma en los pacientes diabéticos están elevados principalmente por el incremento en la producción de lípidos complejos como VLDL (lipoproteína de muy baja densidad) en el hígado. La sobreproducción de VLDL esta estimulada por el incremento de ácidos grasos libres disponibles provenientes de la dieta (exceso de nutrientes) (Malmsrom y col., 1999).

2.4 El estrés oxidativo en el desarrollo de diabetes mellitus

El desorden metabólico, ocasionado por el consumo no moderado de nutrientes, así como, diversos factores ambientales y físicos, incrementa en los individuos el estrés oxidativo (Venereo, 2002).

El estrés oxidativo, está generado por la producción de radicales libres (especies reactivas de oxígeno ROS) en respuesta a los niveles elevados de glucosa que se incrementan por el desorden metabólico, y juega un papel muy importante en el desarrollo de la diabetes y la patogénesis de la enfermedad (Evans y col., 2002).

Los radicales libres, como el superóxido (O_2^-) o hidroxilo (OH) están aumentados de forma consistente en la diabetes. Este aumento puede deberse a varios mecanismos como se lista a continuación (Brownlee, 2001).

- La producción de prostanoides está aumentada en la diabetes y produce superóxido de forma secundaria.

- La NADH está aumentada en la diabetes por el mecanismo de la pseudohipoxia, y esta es el sustrato para el enzima NADH oxidasa endotelial que produce superóxido.
- La glucosa sufre un proceso de auto-oxidación, que libera superóxido.
- La sintasa de óxido nítrico, cuando le falta alguno de sus sustratos o cofactores normales como L-arginina o tetrahidrobiopterina, puede funcionar de forma anormal produciendo superóxido en lugar de NO.

El incremento de los radicales libres, inhibe a la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa que participa en vía de glucólisis, lo que conlleva a que diversos metabolitos participantes de la glucólisis desfoguen su ruta hacia otras vías tales como (Brownlee, 2001; Evans y col., 2002; Schultz y col., 2005; Aronson, 2008):

1. Incremento en el flujo de metabolitos a través de la vía de los polioles (azúcares polihidroxilados).
2. Incremento en el flujo de metabolitos a través de la vía de la hexosamina (fructosa-6-fosfato).
3. Activación de la proteína cinasa C (PKC). La activación de PKC se ha relacionado con cambios funcionales de las células endoteliales vasculares mediante la activación de factores de transcripción, lo cual produce la expresión de genes, principalmente de algunas citocinas pro-inflamatorias.
4. Incremento intracelular de proteínas glicosiladas y de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) a través de la glicosilación no enzimática (Figura 1). Los AGEs, son liberados a la sangre y se unen a macrófagos, donde incrementan la producción de ROS, los cuales activan al factor nuclear de transcripción NF- κ B, el cual promueve la expresión de citocinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento.

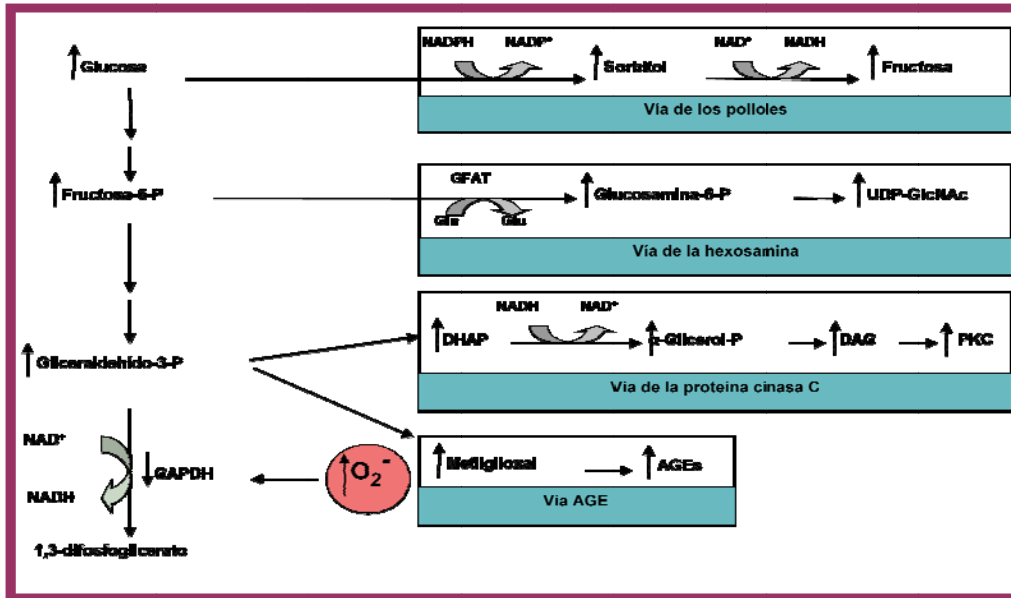


Figura 1. Vías metabólicas inducidas por la hiperglicemia, debido a la elevada producción de radicales libres (Brownlee, 2001).

Los metabolitos participantes y producidos por estas diversas vías, inducen la formación de diversas citocinas participantes en el proceso de inflamación que es característico en el desarrollo de la diabetes y la progresión de sus complicaciones.

2.4.1 Citocinas pro-inflamatorias y su relación con la diabetes mellitus

Las citocinas pro-inflamatorias, son polipéptidos de bajo peso molecular (15-30 kDa), que participan en el proceso de inflamación provocado por diversos estímulos de naturaleza, química, física o biológica. Son producidas, fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polinucleares, células endoteliales, células epiteliales y células del tejido conjuntivo (renales, hepáticas, adipocitos, sanguíneas). De acuerdo con sus funciones se clasifican como se menciona a continuación (García., 1997).

- autócrinas, si la citocina actúa sobre la célula que la secreta.
- parácrinas, si la acción se restringe al entorno inmediato del lugar de secreción.
- endócrinas, si la citocina llega a regiones distantes del organismo (mediante sangre o plasma) para actuar sobre diferentes tejidos.

Existe evidencia de que la expresión de la mayoría los genes que codifican para las citocinas pro-inflamatorias como son $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$ y moléculas de adhesión ICAM y VCAM, que participan en el desarrollo y complicaciones de la diabetes, se encuentran reguladas por el factor nuclear de transcripción ($NF\kappa B$) (Sánchez y Kaski, 2001). $NF\kappa B$ puede ser activado por estímulos exógenos y endógenos, incluyendo concentraciones elevadas de glucosa en sangre, radicales libres, un incremento de ácidos grasos libres, y las mismas u otras citocinas pro-inflamatorias (Evans y col., 2002).

2.4.2 Los radicales libres y las citocinas pro-inflamatorias en la destrucción de las células β del páncreas

El desarrollo de la diabetes tipo 1 por sí sola, así como, el desarrollo de la misma en estadios avanzados de la diabetes tipo 2, es el resultado de destrucción de las células β del páncreas. Las células β -pancreáticas se ven atacadas crónicamente por un infiltrado inflamatorio de tipo inmune con una gran cantidad de productos entre los cuales se encuentran las citocinas pro-inflamatorias y derivados de la oxidación (ROS) (Figura 2), estos compuestos dañan a las células, activando mecanismos de defensa para contrarrestar el ataque inmunológico inespecífico. Sin embargo y debido a lo crónico de la inflamación, las células β terminan expresando moléculas que al ser activadas inducen apoptosis de manera específica y terminan por destruirse (Manrique y Silva, 2006).

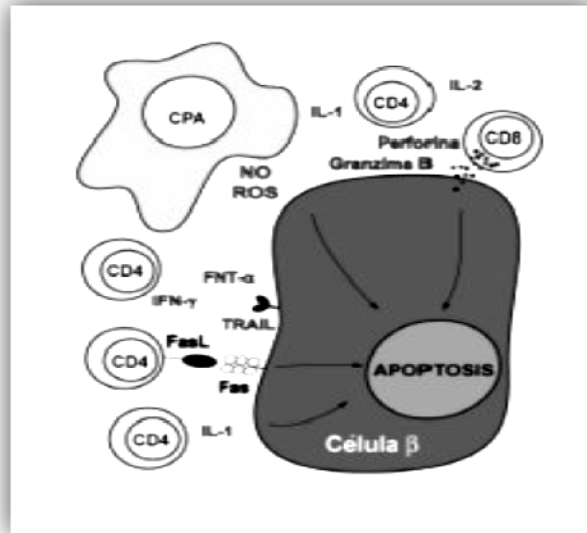


Figura 2. Moléculas que afectan a la célula β (Manrique y Silva, 2006).

Interferón gamma (IFN- α), factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α), interleucina 1 (IL-1), óxido nítrico (NO), las especies reactivas de oxígeno (ROS), perforina, granzima B, el ligando inductor de apoptosis relacionado con FNT (TRAIL), moléculas pro apoptóticas Fas y Fas ligando (FasL), linfocitos T CD4 positivos, linfocitos T CD8 positivos y células presentadoras de antígeno CPA.

El efecto pleiotrópico de las citocinas hace difícil delimitar el papel que cada una de ellas desempeña en la patogénesis de la diabetes. Las citocinas pro-inflamatorias más destacadas y que tienen efecto directo sobre las células β , son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la interleucina-1 beta (IL-1 β) y el interferón gamma (IFN- γ) (Manrique y Silva, 2006).

Cada una de estas citocinas, dependiendo de su concentración, alterará el metabolismo normal de las células β afectando la síntesis y secreción de insulina. La presencia del IFN- γ en las células β , induce una reducción tanto del contenido celular de insulina como de su secreción en respuesta a la glucosa. De forma similar la presencia de IL-1 β estimula la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en las células β , la cual a su vez induce el aumento de óxido nítrico (NO), inhibiendo la secreción de insulina en respuesta a la glucosa, las citocinas pueden tener efectos sinérgicos, como ya se mencionó anteriormente, la presencia de unas induce la expresión de otras. Es importante destacar que el estudio de las células β del páncreas es indispensable para

comprender la fisiopatología de la diabetes y así generara conocimientos para el desarrollo de terapias para prevenir o tratar la enfermedad. Estudios histopatológicos documentan que un daño en la función de las células β , puede ser detectado en diversas formas y también puede observarse en individuos pre-diabéticos, estos estudios demuestran que el volumen de las células β , se encuentra disminuido en estos individuos (Bonora, 2008).

Por otro lado, ha sido necesario un modelo experimental para estudiar el daño ocasionado contra el páncreas en presencia de un estrés altamente oxidante, tal como se da en el organismo humano, para ello se han utilizado diversos agentes oxidantes tal como el aloxano y la estreptozotocina.

El mecanismo de acción de la estreptozotocina ha sido ampliamente estudiado, la estreptozotocina entra en las células β a través de un transportador de glucosa (GLUT2) y causa alquilación, principalmente metilación en bases nitrogenadas del ADN. Este daño induce la activación de la poli-ADP-ribosilación, un proceso que es más importante para la diabetogénesis debida a la estreptozotocina que el daño en el ADN por sí mismo. La Poli-ADP-ribosilación conduce a la depleción celular NAD⁺ y ATP. La desfosforilación del ATP después del tratamiento de estreptozotocina provee un substrato para la xantina oxidasa resultando en la formación de radicales superoxidantes. Consecuentemente, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo son también generados. Además, la estreptozotocina libera cantidades tóxicas de óxido nítrico que inhibe la actividad aconitasa y participa en el daño al ADN. Como resultado de la acción de la estreptozotocina, las células β se someten a destrucción por necrosis (Szkudelski., 2001).

2.5 Nefropatía diabética

La progresión de las complicaciones propias de la diabetes, macro y micro vasculares tales como; aterosclerosis, retinopatía, neuropatía periférica y nefropatía diabética, son el resultado del proceso de inflamación y estrés oxidativo generados por la hiperglicemia.

La nefropatía diabética es una de las complicaciones crónicas más graves y que es frecuentemente observada en los pacientes con diabetes tipo 2. Es la complicación principal en más del 40% de los pacientes diabéticos que son incluidos anualmente en programas de tratamiento renal sustitutivo. Es importante mencionar que la sobrevivencia de los pacientes diabéticos con insuficiencia renal en diálisis es solo del 20%, es por eso que la nefropatía diabética es la causa más común de insuficiencia renal crónica y, además, es una de la principales causas de mortalidad por diabetes (Atlas de la diabetes, 2002; Eknayan, 2007). De ahí la importancia de poder prevenir o controlar en etapas tempranas el daño renal (Navarro, 2003).

En las pruebas de diagnóstico utilizadas para la nefropatía diabética, una de las características detectable es una filtración de cantidades elevadas de albúmina en el riñón, lo que puede ser cuantificado en orina por medio de pruebas sensibles para microalbúmina (15-30 $\mu\text{g}/\text{min}$ o 30-300 $\text{mg}/\text{día}$).

Se ha sugerido que una vez desarrollada la enfermedad, la elevación de radicales libres en el organismo influyen sobre la nefropatía. El desarrollo y la prueba de esta hipótesis ha ido a la par con la demostración que citocinas como el TNF- α , IL-1 β e IL-6 tienen un papel relevante en el desarrollo de la nefropatía. En primer lugar, la IL-1 β estimula la síntesis de proteínas y colágeno por parte de las células mesangiales del riñón, lo cual participa en un engrosamiento de las membranas basales y expansión mesangial. En segundo lugar, esta misma citocina, estimula la producción de prostaglandinas por las células mesangiales lo que alterara la microcirculación glomerular, finalmente la IL-1 β induce una actividad procoagulante a nivel endotelial incrementando la permeabilidad del endotelio. Lo

anterior se resume en una filtración de moléculas, tales como, la albúmina y la creatinina en la orina.

La interleucina 6 (IL-6) está también asociada con efectos a nivel renal; aumento en la permeabilidad endotelial, estimulación de la proliferación de las células mesangiales y aumento de la expresión de fibronectina por estas células (Hirano, 1990). Otros estudios han mostrado que diversas proteínas como la albúmina, modificadas por procesos de glicosilación enzimática, así como, otras citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), estimulan la producción de IL-6 por las células endoteliales. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) ha mostrado ser un predictor de la excreción urinaria de albúmina (EUA) en pacientes diabético.

2.6 Tratamiento preventivo de la diabetes

Existe información variada acerca de tratamientos para el control de la diabetes, pero muy poca de esta investigación se enfoca a tratamientos que prevengan el desarrollo de la enfermedad. Aun así, todo apunta a que la dieta y el estilo de vida juegan un papel muy importante en la prevención del desarrollo de la diabetes.

Como ya se ha mencionado en este trabajo, el desarrollo de la diabetes está ligado con la disfunción de las células β -pancreáticas y con la resistencia a la insulina. Bonora (2008) informa que los posibles mecanismos para la protección de las células β podrían ser; reducir la glucotoxicidad, lipotoxicidad, resistencia a la insulina, inflamación y estrés oxidativo y/o apoptosis. Por lo tanto, todos los agentes anti-diabéticos que puedan prevenir todos o algunos de estos mecanismos, son útiles en la prevención del desarrollo de la diabetes.

Por otro lado, desde tiempos muy antiguos se han utilizado algunos alimentos para el control de la diabetes. Estudios epidemiológicos han demostrado que poblaciones que consumen dietas mediterráneas, tienen una menor incidencia de enfermedades crónico degenerativas, lo que se le ha atribuido a su contenido de

compuestos antioxidantes como son los compuestos fenólicos y aceites omega-3 (Pitsavos y col., 2005). Sin embargo, en la dieta mexicana, también existen alimentos que muestran actividades biológicas antioxidantes importantes relacionadas con estas enfermedades, tal es el caso, del frijol.

2.6.1 Generalidades del Frijol

El frijol común, con nombre científico *Phaseolus vulgaris* L, es una especie que tiene origen en el continente Americano, siendo evidente tanto por diversos hallazgos arqueológicos como por evidencias botánicas e históricas. De las leguminosas, esta especie es la de mayor importancia agronómica y económica, y se cultiva ampliamente en todo el mundo, particularmente en países en desarrollo de Latinoamérica y Asia, donde sus proteínas proporcionan el 83% en la dieta promedio (Rodríguez y Fernández, 2003).

2.6.2 Aporte nutricional y nutracéutico del frijol común

El frijol no solo es importante por su gran cantidad de proteínas sino también de aminoácidos esenciales, lípidos, fibra, vitaminas, minerales y componentes tan importantes como son los compuestos fenólicos (Rodríguez y Fernandez, 2003).

El frijol aporta a la dieta ácidos grasos esenciales como el linoléico y linolénico. Es importante mencionar que el efecto hipocolesterolémico en ratas ha sido atribuido en parte a los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados. Estos ácidos grasos pueden servir también como sustitutos de medicamentos antiinflamatorios para el tratamiento de artritis reumatoide, y también pueden tener propiedades inmunoestimuladoras (Wahle y col., 2004).

Los carbohidratos constituyen del 52 al 76 % del peso seco de la semilla de frijol común, contribuyendo el almidón (en gran parte indigerible) con el 35 al 60 % de dicho peso seco. La fibra dietaria, constituida por polisacáridos indigeribles como

las sustancias pecticas, arabino galactanos y xiloglucanos, ha recibido mucha atención en años recientes por científicos y consumidores, puesto que dentro de sus beneficios se pueden mencionar la disminución de colesterol sanguíneo, la reducción del riesgo cardiovascular y beneficios especiales para los diabéticos (Paredes y col., 2006; Ludwing y col., 1999;).

Los compuestos fenólicos presentes en el frijol, pueden reducir la digestibilidad proteíca y la biodisponibilidad de los minerales, y los galactooligosacáridos pueden producir flatulencia. Sin embargo, se ha sugerido que estos compuestos pueden tener efectos protectores en las enfermedades crónico-degenerativas al actuar como antioxidantes (Díaz-Batalla y col., 2006).

Lo anterior demuestra que el frijol tiene un papel muy importante en la dieta, tanto por su contenido energético como por su capacidad de disminuir las concentraciones de glucosa y colesterol sanguíneo, así como, efectos antioxidantes principalmente atribuibles a los compuestos fenólicos (Roman-Ramos y col., 1995; Petlevski y col., 2001; Subramanian y Leelavinothan, 2002).

2.6.3 Compuestos fenólicos en el frijol

Los compuestos fenólicos juegan un papel muy importante en lo que se refiere a salud, debido a que presentan algunas actividades biológicas como capacidad antioxidante y anticarcinogénica (Weiguang y col., 2005). Entre los compuestos fenólicos del frijol se ha determinado la presencia de flavonoides (quercetina, camerol, antocianinas), ácidos fenólicos (ácido p-hidroxibenzoíco, ácido vanilínico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico), isoflavonas (genisteína, daizeina) y cumestrol (Díaz-Batalla y col., 2006; Espinoza-Alonzo y col., 2006).

En general, los compuestos fenólicos contenidos en el frijol podrían estar relacionados con la disminución del estrés oxidativo y de la inflamación. Los polifenoles presentan un amplio espectro de actividades biológicas y se han propuesto como una herramienta terapéutica para desórdenes crónicos debido a

su actividad antiinflamatoria. A este respecto, se ha sugerido que los polifenoles inhiben a NF-KB, lo que genera una disminución de la producción de enzimas pro-inflamatorias y de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) (Soriano Bello, 2006).

Actualmente, no se tiene información acerca del efecto del frijol como preventivo para el desarrollo de la diabetes, sin embargo, existen diversos estudios que demuestran que elementos antioxidantes son efectivos en la prevención del desarrollo de la enfermedad (Lei Jin y col., 2007; Heidari Z y col., 2008).

III. JUSTIFICACIÓN

El estrés oxidativo está caracterizado en el organismo por la producción incrementada de especies reactivas de oxígeno (radicales libres), esta producción puede deberse a diversos factores genéticos, químicos, físicos y ambientales. La exposición prolongada al estrés oxidativo provoca en el organismo una serie de padecimientos, que con el tiempo permiten el desarrollo de enfermedades, como la diabetes.

Las cantidades elevadas de radicales libres en el organismo, generan la destrucción de las células β pancreáticas, o también resistencia a la insulina, lo que provoca que los niveles de glucosa sanguínea se incrementan y posteriormente, se desarrolle la diabetes.

La hiperglicemia no controlada, aumentan aún más el estrés oxidativo, dando lugar a la generación de las complicaciones propias de la enfermedad, tal como la nefropatía diabética. Este padecimiento clínico, es la principal causa de muerte a nivel mundial de los pacientes que padecen diabetes, por lo que se considera un problema de salud pública al generar costos elevados para su tratamiento.

En la actualidad existen diversos estudios que han establecido que, una vez iniciada la diabetes, una dieta a base de frijol tiene la capacidad para controlar el daño renal en un modelo de diabetes. Sin embargo, no se tiene información acerca del efecto del frijol como preventivo para el desarrollo de esta patología. Por otro lado, existen estudios que demuestran que diversos compuestos antioxidantes, han sido utilizados para prevenir la destrucción de las células β del páncreas y el estrés oxidativo anterior al desarrollo de la diabetes, lo que se puede tomar como base para establecer que el frijol en este sentido podría ejercer una función similar debido a su contenido de compuestos antioxidantes.

IV. HIPÓTESIS

El frijol debido a sus propiedades antioxidantes, disminuye el estrés oxidativo generado por la estreptozotocina, produciendo una menor destrucción de las células β del páncreas, menor desarrollo de la enfermedad y por lo tanto una disminución del daño renal.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto protector del frijol Negro 8025 sobre el daño pancreático y renal, generado durante el desarrollo y complicaciones de la diabetes, en un modelo de ratas inducidas con estreptozotocina.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de una dieta a base de frijol sobre la prevención de la diabetes en un modelo de ratas Wistar determinado a través de la cuantificación de glucosa sanguínea y de un análisis histológico del páncreas.
2. Determinar el efecto de frijol como coadyuvante en el control de la nefropatía diabética y el daño pancreático generado durante el progreso de la diabetes.
3. Determinar la relación entre las citocinas pro-inflamatorias y el daño producido por la diabetes en páncreas y en riñón.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Material biológico y químico.

- Ratas machos Wistar de 130 g.
- Variedad de frijol Negro 8025 (N8025) obtenida de INIFAP cosecha 2008.
- Para la inducción de la diabetes mellitus se utilizó el fármaco estreptozotocina (STZ) de la marca Sigma®.
- Tiras reactivas para la determinación de glucosa en sangre, marca ACCUTREND®.
- Tiras reactivas para el examen general de orina, Multistix 10SG, marca Bayer®.
- Tiras reactivas para la determinación de microalbúmina en orina, Clinitek®, marca Bayer®.
- Kits para la determinación de triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL en suero, marca Randox Laboratories.

6.2 Elaboración de harinas de frijol cocido

El frijol se pesó y se lavó previamente. Se coció en una olla en una relación de 1:1.6 (p/v) en agua a una temperatura de 90 °C ± 2 °C. Una vez cocido, se colocó en charolas para secarse en un horno a 60 °C y se dejó reposar por 24 horas para llevarlo a un molino pulvex para la obtención de la harina.

6.3 Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó usando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999). Este método se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se pesó 1 g harina de frijol, se disolvió en 10 mL de metanol y se agitó durante 24 h posteriormente se centrifugó y se recuperó el sobrenadante

(extracto). Del extracto obtenido, se tomaron 20 μL y su respectivo blanco (agua). Ambas muestras se mezclaron con 250 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1 N) y se adicionaron 1.25 ml de Na_2CO_3 (20%), se dejó reposar en la obscuridad por 2 h. Finalmente, se leyó la absorbancia a 760 nm. El valor obtenido de la muestra fue expresado como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de harina.

6.4 Cuantificación de taninos condensados en la harina de frijol cocido

La cuantificación se realizó de acuerdo al ensayo de la vanillina, de Deshpande y Cheryan (1985, 1987) adaptado para el uso en microplaca. Para esta determinación, se pesó 1 g de harina de frijol y se adicionaron 10 ml de metanol, se mantuvo en agitación durante 24 h a 24 °C, y la muestra fue centrifugada, del sobrenadante se tomaron 10 μL y se les adicionaron 200 μL de reactivo vanillina al 0.5 % (vanillina 1 % y HCl 8% en proporción 1:1). La concentración de compuestos fenólicos se calculó en base a una curva de (+) catequina, y la concentración fue expresada como mg equivalentes de (+) catequina por g de muestra.

6.5 Cuantificación de antocianinas en la harina de frijol cocido

La cuantificación de antocianinas se realizó de acuerdo al método desarrollado de Abdel-Aal y Hucl (1999). En un tubo cónico se pesaron 0.5 g de harina de frijol, a la cual se le adicionó 4 mL de etanol acidificado (etanol HCl 1N, 85:15, v/v) agitando durante 30 min y ajustando el pH a 1. Esta solución se centrifugó a 4500 g por 45 min y el sobrenadante obtenido fue aforado a 10 mL con el etanol acidificado. A la solución resultante se le realizó una medida de absorbancia a 535 nm. La concentración de antocianinas totales en la muestra (mg/g) se calculó como cianidina 3-glucósido, según la siguiente fórmula:

$$C = (A/\epsilon) \times (V/1000) \times PM \times (1/\text{peso de la muestra}) \times 10^3$$

Donde:

C es concentración de antocianinas totales (mg/g)

A es la absorbancia máxima

€ es la absorbancia molar de cianidina 3-glucósido (25, 965/cm²M)

V es el volumen del total del extracto de antocininas (mL)

PM es el peso molecular de cianidina 3-glucósido (449 g/mol)

6.6 Capacidad antioxidante de la harina de frijol cocido

Para evaluar la capacidad antioxidante por el método de ABTS, se generó primero al radical ABTS por medio de una reacción de oxidación, en una solución de persulfato de potasio (12 h antes de ser usado). En la determinación se utilizaron 10 µL de muestra (extracto metanólico) y se agregaron 990 µL de ABTS (ajustado a una absorbancia de 0.7) y transcurridos 6 min se leyó la absorbancia de la mezcla a 734 nm. Las medidas fueron comparadas de acuerdo a los resultados que se obtuvieron de la curva de calibración que se realizó previamente usando Trolox como estándar, estos resultados fueron expresados como capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC en µmol Trolox/g de muestra).

6.7 Estudios *in vivo*

Las ratas se sometieron a una semana de adaptación en el bioterio, bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y acceso libre a comida y agua.

Para formar los grupos experimentales se utilizaron un total de 48 ratas Wistar macho con un peso inicial de 130 g. Se formaron siete grupos experimentales al azar con ocho ratas cada uno, de los cuales tres se incluyeron a la primera parte experimental, en la que se evaluó el efecto del frijol N8025 sobre el desarrollo de

la diabetes. Los otros cuatro grupos se incluyeron en la segunda parte experimental, en la que se evaluó el efecto del frijol N8025 sobre las complicaciones de la diabetes.

Respecto a la primer parte experimental (preventiva), se tuvieron tres grupos los cuales fueron nombrados de la siguiente manera, sanas, diabéticas y preventivo. La duración del experimento fue de cuatro semanas dentro de las cuales los grupos sano y diabético fueron alimentados con una dieta basal, mientras que el grupo preventivo se alimentó con 25% (Consumo *per cápita* de frijol mayor en México) de harina de frijol adicionado a la dieta basal de las ratas. Durante el experimento se midió semanalmente el peso corporal de las ratas, glucosa sanguínea, así como, alimento y agua consumidos de todos los grupos. Al final de las cuatro semanas las ratas del grupo diabético y preventivo fueron inducidas con una inyección de estreptozotocina (STZ), mientras que las del grupo sano fueron inyectadas con solución salina (SS). Tres días después las ratas fueron sacrificadas, para la obtención de páncreas y suero sanguíneo para análisis histológico y determinación de citocinas pro-inflamatorias respectivamente (Figura 3).

Al final del experimento las ratas se sacrificaron para la obtención de muestras de suero sanguíneo en el cual se determinaron citocinas y perfil de lípidos, orina para determinar diversos parámetros bioquímicos, y finalmente páncreas y riñón para realizar análisis histológicos (figura 4).

Figura 4. Estrategia general del modelo experimental sobre las complicaciones de la diabetes en ratas alimentadas antes y después de la inducción de la enfermedad.

Sanas.- Control sano. Diabéticas.- Control diabético. Preventivo-tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes antes y un mes después de la inducción. Tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes después de la inducción.

6.8 Inducción de diabetes con estreptozotocina

La inducción de la diabetes se realizó dejando a las ratas en estado de ayuno de 12 h y posteriormente fueron inyectadas vía intraperitoneal con una dosis única de estreptozotocina (STZ) de 50 mg/kg de peso corporal, disuelta en una solución amortiguadora de citrato de 0.1 M, pH 4.5.

6.9 Cuantificación de glucosa sanguínea

El nivel de glucosa (mg/dL) se cuantificó en sangre obtenida de la vena caudal de las ratas (localizada en el extremo de la cola del animal), con un mínimo de 8 horas de ayuno. Para ello se empleó un glucómetro de la marca ROCHE, cuya sensibilidad es de 60-600 mg/dL de glucosa y tiras reactivas de la marca Accutrend. En esta técnica el glucómetro mide la corriente generada al convertir la glucosa de la muestra de sangre (colocada sobre la tira) en gluconolactona por la enzima glucosa deshidrogenasa.

6.10 Determinación de citocinas pro-inflamatorias por el método de ELISA

Las muestras de sangre fueron centrifugadas y el sobrenadante se almacenó a -72°C.

En la determinación de los niveles séricos de TNF α e IL1 β se utilizó el kit comercial Cytoscreen TM, Biosource International. El método consiste en una determinación cuantitativa por ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) en técnica de sándwich en fase sólida, en donde van unidos los respectivos anticuerpos dirigidos contra secuencias específicas de TNF α e IL1 β . El anticuerpo permite la unión e inmovilización de los respectivos antígenos (TNF α e IL1 β). Posteriormente, se une un anticuerpo biotinilado a un segundo sitio del antígeno. Luego de retirado el exceso de anticuerpo biotinilado, se adiciona el complejo streptavidina-peroxidasa, el cual se une a la biotina. Posterior a esta unión, se lava el exceso y se adiciona el sustrato tetrametilbenzidina, para producir un

compuesto coloreado, el cual es leído a 450 nm. Este cambio colorimétrico fue determinado por medio de un lector de ELISA.

6.11 Determinación de perfil lipídico

En las muestras de suero recolectadas, se determinó la concentración del perfil lipídico: triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL y VLDL mediante kits enzimáticos de la marca Sera-Pack Plus de Bayer.

6.12 Determinación de microalbúmina, creatinina y glucosa en la orina

Para la determinación de microalbúmina y proteína en la orina, los animales fueron separados en jaulas individuales, con acceso libre a agua.

Después de 12 h de ayuno la orina fue recolectada en charolas, para la detección de micro albúmina, creatinina y glucosa. En esta determinación se utilizaron tiras reactivas Microalbumin cuya lectura se realizaron en un analizador Clinitek. Los valores de referencia para diagnosticar microalbuminuria son de 15-30 µg/min ó 30-300 mg/día. Para la determinación de proteínas se emplearan tiras reactivas Multistix 10SG, las cuales fueron sumergidas en la orina. La lectura de este parámetro también se realizara en un analizador Clinitek.

6.13 Evaluación histopatológica del páncreas y riñón

Se extrajeron el páncreas y riñón, y se lavaron con solución fisiológica estéril y posteriormente se fijaron en una solución de formaldehído al 4% durante 12 horas para posteriormente sumergirlos en parafina, finalmente se llevo a cabo una micro disección en micrótopo con cortes de 7 µm y se tiñeron con hematoxilina-eosina (HIE).

6.14 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados como la media \pm el error estándar (EE). La evaluación estadística de los datos se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza de 95 %, además se realizó el análisis de comparación de medias aplicando la prueba de Dunnet. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico JMP 5.0.1.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de la harina de frijol N8025 cocido

Se ha demostrado que el consumo de frijol, está relacionado con la regulación del estrés oxidativo y las concentraciones de glucosa sanguínea. Estas propiedades se atribuyen a constituyentes bioactivos del frijol tales como fibra, almidón resistente y compuestos fenólicos (Serrano y Goñi, 2004). Estos últimos elementos en el frijol, han generado un marcado interés debido a que su propiedad antioxidante representa un beneficio a la salud (Cardador-Martínez y col., 2002a, 2002b) y el tratamiento de las complicaciones de la diabetes (Lomas, 2008).

La cuantificación de diferentes compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante que presenta el extracto metanólico de la harina del frijol N8025 cocido, utilizada en este trabajo se presenta en el cuadro 2.

Cuadro 2. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en el extracto metanólico de la harina de frijol cocido N8025

Parámetro	Harina de frijol cocido (extracto metanólico)
Compuestos fenólicos totales ¹	0.98 ± 0.70
Taninos condensados ²	15.16 ± 0.50
Antocianinas ³	168.54 ± 8.90
Capacidad antioxidante ⁴	134.40 ± 15.28

Los valores representan la media ± EE.

¹ Compuestos fenólicos totales expresados en mg equivalentes de ácido gálico/g de harina

² Taninos condensados expresados en mg equivalentes de (+)catequina/g de harina.

³ Antocianinas expresadas en mg equivalentes de cianidina 3-glucosido/Kg de harina.

⁴ Capacidad antioxidante expresada en µM equivalentes de Trolox/g de harina.

En la literatura existen pocos reportes de la cuantificación de fenoles totales en harina de frijol cocido. Los resultados obtenidos en esta evaluación para fenoles totales, corresponden a las concentraciones reportadas por Lomas (2008) para la variedad de frijol N8025 (0.92 ± 0.06 mg ácido gálico/g de harina), sin embargo, son diferentes a lo reportado por Espinosa-Alonso y col. (2006) quienes realizaron un estudio a diversas variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) reportando concentraciones hasta de 2.11 mg ácido gálico/g de harina. Es importante remarcar que las concentraciones obtenidas por estos últimos autores son reportadas para harinas de frijol crudo, lo que podría explicar la menor concentración que se obtuvo en este estudio para la harina de frijol N8025 el cual fue sometido a un proceso de cocción. Actualmente se sabe que el proceso de cocción repercute en la disminución de compuestos fenólicos, al degradarlos o acomplejarlos con otros componentes en el tratamiento térmico (Aparicio-Fernández y col., 2005).

Los valores de taninos condensados mostrados en el cuadro anterior corresponden a las concentraciones reportadas por Lomas (2008) y Feregrino y col. (2008) quienes para la variedad N8025 obtuvieron 14.55 y 15.15 mg equivalentes de (+)catequina/g de harina, respectivamente.

Las antocianinas son uno de los compuestos bioactivos presentes en el frijol que representan un papel antioxidante importante. Se ha reportado que esta capacidad está dirigida contra radicales peroxilo (Takeoka et al., 1997; Wang et al., 1997). La importancia de los antioxidantes como neutralizantes de radicales libres ha permitido considerarlos en este estudio como una de las posibles causas por la cual el frijol pudiese ser utilizado como coadyuvante en la prevención del estrés oxidativo, tanto en el desarrollo de la diabetes como en la generación de sus complicaciones.

Los valores obtenidos para antocianinas en esta evaluación, son cercanos a los reportados por Serna y col. (2007) y Lomas (2008) quienes obtuvieron

concentraciones de antocianinas de 160.53 y 150.03 mg equivalentes de cianidina 3-glucósido/kg de harina, respectivamente.

La capacidad antioxidante encontrada en este estudio es de $134.4 \pm 15.28 \mu\text{M}$ es baja comparada con la actividad antioxidante reportada con otros autores, lo cual puede deberse a diversos factores tales como el tipo de variedad, la coloración de la misma, las condiciones de cultivo y el mismo proceso de cocción. Sin embargo el resultado aquí mostrado no fue muy diferente al obtenido por Lomas (2008) para la variedad N 8025 (150.03 ± 6.85) que aunque es la misma pertenece a una cosecha diferente. La capacidad antioxidante podría estar dada por la naturaleza de los compuestos fenólicos presentes en el alimento (Agostini y col., 2004). Ríos y col. (2007) evaluaron el contenido de ácidos fenólicos presentes en un extracto metanólico de frijol Pinto Zapata y Negro 8025, encontrando una mayor concentración de estos compuesto en el frijol negro, entre dichos ácidos se encuentran el gálico, protocatecuico, catequina, vanílico, siríngico, cumárico, salicílico, entre otros. Se ha observado en estudios *in vitro* que dichos ácidos tienen alta capacidad antioxidante expresado como equivalentes de trolox (TEAC), para el ácido vanílico de 1.8, ferúlico de 3.2, cumárico de 2.3, entre otros. La capacidad antioxidante *in vitro* es utilizada como una prueba preliminar para evaluar aquellos compuestos que tengan la propiedad de donar electrones y/o protones a radicales libres inhibiendo los procesos oxidativos. En base a los resultados anteriores fue posible demostrar que la harina de frijol cocido N 8025 puede ser fuente de compuestos antioxidantes y dichos resultados sugieren que esta actividad podría inactivar los radicales generados en un organismo en un estado altamente oxidante.

7.2 Evaluación *in vivo* de ratas diabéticas alimentadas con una dieta suplementada con frijol cocido N8025

7.2.1 Glucosa sanguínea

La estreptozotocina es un fármaco ampliamente utilizado para inducir diabetes tipo 1 y 2, en modelos animales experimentales. Su acción citotóxica esta mediada por un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno y los agentes antioxidantes propios del organismo. Las células β son las principales afectadas por la acción de este fármaco, llevándolas finalmente a muerte celular por necrosis y de esta manera se disminuye o nulifica la producción de insulina (Szkudelski, 2001), la ausencia de esta hormona provoca una disminución de la incorporación de glucosa en tejidos adiposo y muscular, provocando un incremento de glucosa en sangre (Wilson y Leiter., 1990).

El frijol como una fuente importante de agentes antioxidantes, (Ulloa y Hasan, 2001.; Subramian, 2002) ha sido utilizado para la protección del páncreas de ratas inducidas con estreptozotocina, ésto reflejado en la disminución de los niveles de glucosa en ratas diabéticas (Lei y col., 2007), sin embargo, no se ha evaluado el efecto de éste en el desarrollo de la enfermedad, lo cual se realizó en este estudio.

En la primera parte experimental (preventiva), se evaluó el efecto del consumo de frijol cocido N8025, sobre los niveles de glucosa en ratas que fueron alimentadas previamente durante un mes con una dieta adicionada en un 25 % con frijol cocido N8025, y finalmente administradas con una dosis única de 50 mg de estreptozotocina (STZ)/kg PC, con el objeto de evaluar el efecto preventivo sobre el desarrollo de la diabetes. En la figura 5 se puede observar que después de la inducción, las concentraciones de glucosa se ven incrementadas tanto en el grupo diabético como en el grupo preventivo, siendo mayor en el grupo preventivo, resultado que no se esperaba, de acuerdo a lo citado anteriormente. Este incremento puede deberse a diversas causas. Está reportado que ciertos compuestos antioxidantes del frijol, actúan como pro-oxidantes si exceden un

máximo en el organismo, tal es el caso, de los flavonoides, dentro de los cuales encontramos a las antocianinas (Pérez, 2003), y debido a que el frijol utilizado en este trabajo, tiene un alto contenido de estos compuestos (168.54 ± 8.90 mg equivalentes de cianidina 3-glucosido/Kg de harina) y que además la concentración de frijol empleada para este experimento (25%) corresponde al consumo *per cápita* mayor de frijol en el país, podría explicar de algún modo el comportamiento del grupo preventivo en cuanto a concentraciones de glucosa se refiere.

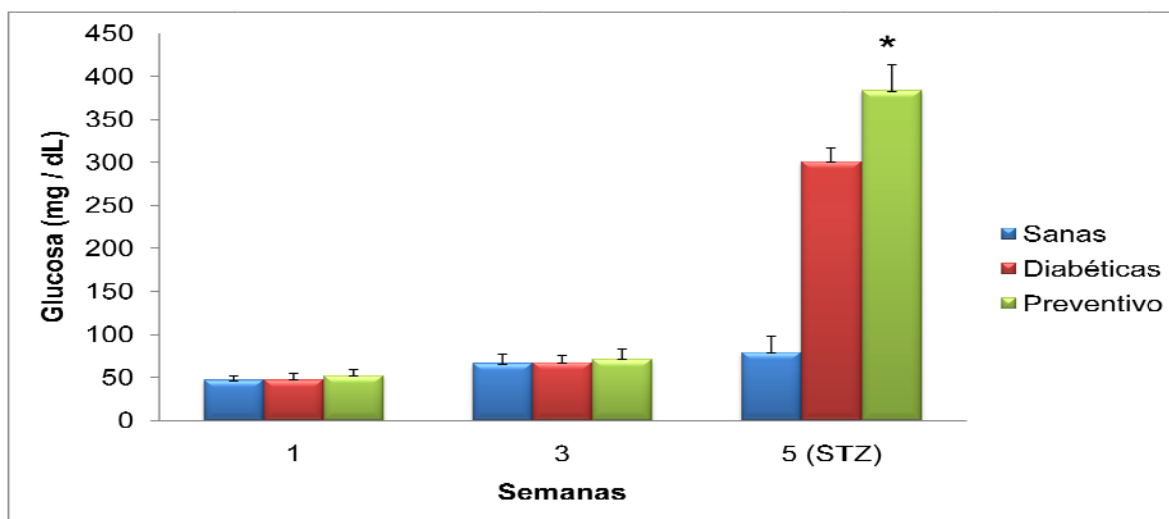


Figura 5. Concentración de glucosa sanguínea de ratas alimentadas durante cuatro semanas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) y posteriormente inducidas con estreptozotocina.

Los valores representan la media \pm EE. * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizados con la prueba de Dunnet. Sanas.- Control sano. Diabéticas.- Control diabético. Preventivo.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes antes la inducción.

Se realizó un segundo experimento para determinar el efecto del consumo del frijol N8025 sobre la progresión de la diabetes. Para ello, las ratas fueron inducidas con una concentración de 50 mg de STZ/kg PC y tres días después al corroborar que la enfermedad ya estaba presente en los animales (grupo tratamiento), se comenzó una alimentación con un 25% de frijol, incorporado a la dieta normal de

las ratas por un periodo de un mes. Es importante mencionar que en este experimento se tiene un grupo que fue alimentado con la misma dieta (25% de frijol N8025 adicionado) un mes antes de la inducción y continuo con esta alimentación un mes después de la misma (grupo preventivo-tratamiento). Nuevamente se determinó la concentración de glucosa sanguínea semanalmente, lo cual se muestra en la figura 6, donde se puede observar que en la quinta semana, se presentó un comportamiento similar al primer experimento en el grupo preventivo-tratamiento, donde es mayor la concentración de glucosa en el grupo tratado comparado con el grupo de ratas diabéticas, sin embargo, esta concentración de glucosa a partir de la siguiente semana disminuye, mostrando un comportamiento similar al grupo diabético.

Por otro lado, se puede observar que para la semana ocho hubo una disminución hasta de un 23 % en la concentración de glucosa del grupo tratamiento, por lo que se puede sugerir que una alimentación con frijol, una vez desarrollada la enfermedad disminuye la hiperglicemia. Este efecto puede deberse a diversos factores. Por un lado se sabe que el frijol presenta un bajo índice glicémico (35 del 100%), lo cual quiere decir que la velocidad a la cual se digieren los carbohidratos (almidón digerible) de este es lo suficientemente lenta como para mantener controlada su concentración sanguínea (Ludwig 2003). Por otro lado, se tiene información acerca de que el almidón resistente promueve un efecto hipoglicémico (Vargas y col., 2006), puesto que al llegar al colón, es fermentado por la flora bacteriana, formándose ácidos de cadena corta, los cuales indirectamente impiden la inactivación del receptor de insulina y de esta manera se controlan los niveles de glucosa sanguínea. También se ha reportado que la fibra contenida en diversas variedades de frijol dentro de los cuales se encuentra el frijol negro, produce una mayor saciedad debida a varias causas, mayor volumen de alimento, mayor tiempo de ingestión, lo que produce una mayor sensación de plenitud intestinal, y niveles elevados de colecistocinina, relacionados con reducción en los niveles plasmáticos de glucosa y aumento de insulina en pacientes diabéticos (Serrano y Goñi, 2004). Así mismo, algunos compuestos fenólicos tienen actividad sobre la enzima α -amilasa, dificultando la

digestión de los carbohidratos glicémicos e incrementando el porcentaje de carbohidratos resistentes a la digestión (Pari y Venkateswara., 2003).

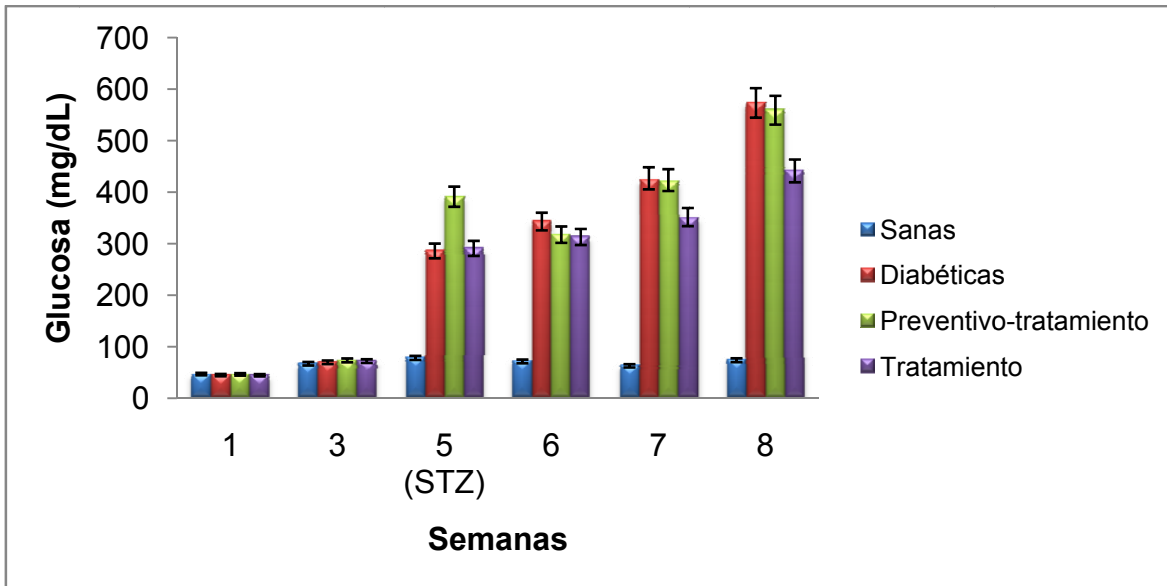


Figura 6. Concentración de glucosa sanguínea de ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de diabetes.

Los valores representan la media \pm EE. *Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizados con la prueba de Dunnet. Sanas.- Control sano. Diabéticas.- Control diabético. Preventivo-tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes antes y un mes después de la inducción. Tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes después de la inducción.

7.2.2 Perfil lipídico

La alteración que sufre el paciente diabético en el metabolismo de lípidos, es conocida como dislipidemia diabética, la cual puede incrementar el riesgo de padecer daño vascular aterosclerótico, la frecuencia de los trastornos cardiovasculares en el diabético no sólo es mayor que en las personas no diabéticas, sino que además, resulta más letal, sobre todo si se presenta acompañada de hipertensión arterial y albuminuria.

La dislipidemia diabética está caracterizada principalmente por niveles elevados de triglicéridos, niveles bajos de HDL (colesterol bueno o lipoproteínas de alta densidad por sus siglas en inglés), y niveles elevados de LDL (colesterol malo o lipoproteínas de baja densidad).

En la diabetes tipo 1, la insulina es un factor de gran importancia en este padecimiento, puesto que su baja o nula presencia produce un aumento rápido de la movilización de ácidos grasos desde los tejidos periféricos hacia el hígado, y determina un aumento de la formación y liberación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en este órgano. Sin embargo, por otro lado, existe una deficiencia de la depuración de triglicéridos plasmáticos, bien por disminución de la actividad de lipoproteína lipasa (LpL), enzima estimulada por la insulina, o por una posible modificación estructural de las VLDL (que las hace menos susceptibles a la acción de la enzima), e incrementa la concentración plasmática de esta lipoproteína (Illnait, 1997).

En la diabetes tipo II, la insulinemia es normal o algo elevada en la mayoría de los pacientes (aunque bajos en relación con la alta concentración plasmática de glucosa). En estos casos, la presencia de insulina en el hígado aumenta la formación y la liberación de VLDL, por lo que también se detecta hipertrigliceridemia. Sin embargo, a pesar de las cifras elevadas de insulina, persiste un defecto del catabolismo de la VLDL por inhibición de la LpL al nivel del tejido adiposo. El colesterol podría estar aumentado, siempre que la conversión de VLDL en lipoproteína de baja densidad (LDL) no está inhibida al nivel del endotelio vascular (Malmsrom y col., 1999).

En el cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos del perfil lipídico de ratas sanas y diabéticas. Se observa que en las concentraciones de colesterol total, hay un aumento significativo en el grupo diabético (88.48 ± 1.20) respecto al grupo sano (45.18 ± 2.02), la hipercolesterolemia en el grupo diabético podría deberse a un incremento de la síntesis de colesterol independiente de insulina, por aumento de VLDL circulante que aporta el 20 % del colesterol total y por disminución del catabolismo de LDL. En cuanto a los grupos preventivo-tratamiento y tratamiento se mantienen las concentraciones de colesterol similares al control sano

(55.90 ± 1.27 y 48.0 ± 4.40 respectivamente), por lo que se puede sugerir que la alimentación con frijol tiene la capacidad de controlar la concentración de colesterol total en sangre.

Por otro lado, también se presentó una regulación de los niveles de triglicéridos para los dos grupos tratados, mostrándose un resultado significativo para el grupo tratamiento, con una disminución de un 22 % respecto al grupo diabético, resultado que podría estar relacionada con el decremento en la concentración de glucosa (23% respecto a diabéticas) para este mismo grupo. Esto debido a que la glucosa es incorporada al tejido adiposo y al mismo tiempo genera de esta manera una disminución de triglicéridos en sangre. Al mismo tiempo, se puede observar una tendencia similar para las concentraciones de VLDL que son menores para los grupos tratados. La disminución de triglicéridos y VLDL sugiere que en este trabajo, el consumo de frijol antes y después de la inducción de diabetes presentan una protección a nivel vascular.

Se ha reportado que las modificaciones estructurales que tienen lugar en las LDL son una consecuencia de la hiperglicemia mantenida. Debido a estas modificaciones, las LDL no son reconocidas por el receptor celular, se mantienen más tiempo en circulación, se incrementa su paso a través del endotelio vascular, aumentan la fagocitosis y el depósito de colesterol en la íntima arterial, y determina, por tanto, un aumento de su aterogenicidad (Illnait, 1997). En el cuadro 3 se puede observar que las ratas diabéticas (45.16 ± 1.86) presentan un aumento en las concentraciones de LDL respecto a las ratas sanas (12.87 ± 4.15), en el mismo contexto se puede observar que el consumo de frijol produjo un control sobre las concentraciones plasmáticas de LDL en los grupos preventivo-tratamiento y tratamiento con valores (10.82 ± 1.64 y 8.03 ± 4.84 respectivamente) similares al obtenido para las ratas sanas.

Los pacientes con diabetes presentan incremento en la prevalencia de anomalías de los lípidos que contribuyen a la enfermedad cardiovascular. La disminución de colesterol LDL, incremento del colesterol HDL y disminución de los triglicéridos ha demostrado reducción de las enfermedades cardiovasculares y de la mortalidad (Malmstrom, 1999). Con respecto a las concentraciones de colesterol

bueno (HDL), este se incrementó en el grupo denominado tratamiento, el cual también disminuyó los niveles de LDL, esto sugiere una protección contra las complicaciones vasculares en ratas alimentadas con frijol después de la inducción.

Cuadro 3. Perfil lipídico en suero de ratas sanas y diabéticas alimentadas con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de la diabetes.

	Triglicéridos	Colesterol total	VLDL	LDL	HDL
Sanas	83.7 ± 9.9	45.18 ± 2.02	23.7 ± 9.9	12.87± 4.15	48.70±0.43
Diabéticas	175.1 ± 9.4	88.48 ± 1.20	35.1 ± 9.4	45.16 ±1.86	26.20 ±4.37
Preventivo-tratamiento	154.4 ± 5.7	55.90 ± 1.27*	23.4 ± 4.8	10.82±1.64*	24.99±2.22
Tratamiento	136.8±10.3*	48.00±4.40*	27.3±10.3	8.03±4.84*	39.96±1.15*

Los valores se presentan como la media de la concentración (mg/dL) de triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL y VLDL en suero sanguíneo ± E.E. *Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control diabético, analizados con la prueba de Dunnet. Sanas.- Control sano. Diabéticas.- Control diabético. Preventivo-tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes antes y un mes después de la inducción. Tratamiento.-Ratas alimentadas con harina de frijol un mes después de la inducción.

7.2.3 Peso corporal

En la diabetes tipo I y II se presenta la ausencia de insulina en la sangre y el nivel de glucagón es superior al normal, por lo tanto, la persona diabética permanece en una especie de ayuno bioquímico a pesar de que abunde la glucosa sanguínea. A causa de la deficiencia de insulina se disminuye la entrada de glucosa a células de tejido muscular y adiposo. El deficiente uso de los carbohidratos en ausencia de insulina origina una lisis incontrolada de grasas y proteínas. Una de las características de la diabetes es el cambio en el uso de combustibles, de carbohidratos a grasas, en tejido adiposo, y proteínas, en

músculo, de este modo la pérdida de peso en el paciente diabético es inminente (Magnuson y col., 2008).

En la figura 7 se puede observar que hasta antes de la inducción no hubo una diferencia en peso entre los tres grupos. Sin embargo, al tercer día de la quinta semana (inducción), ya se observa una disminución en peso de las ratas diabéticas y del grupo preventivo, lo que habla del efecto inmediato en la pérdida de peso que se presenta al inicio de la enfermedad.

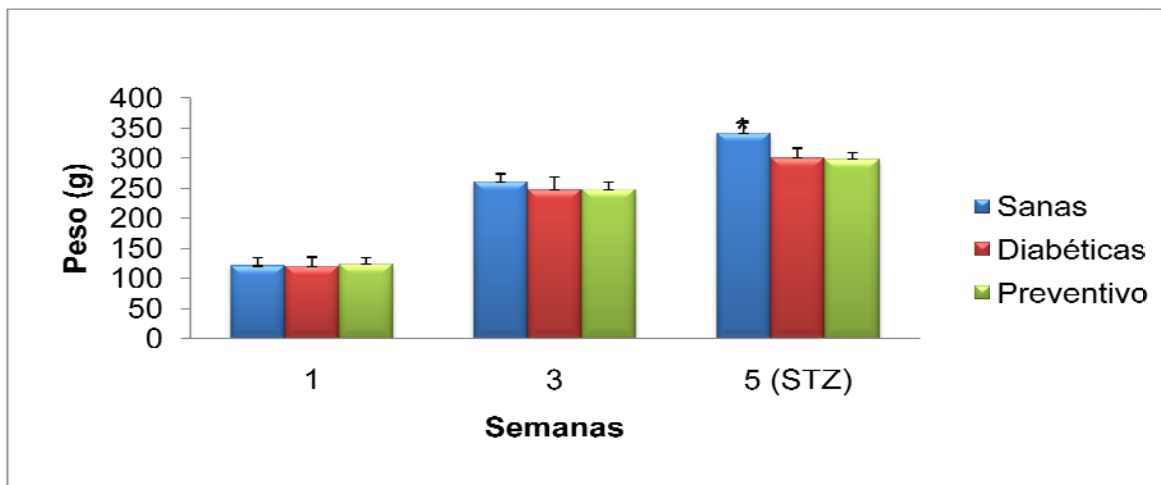


Figura 7. Peso corporal de ratas alimentadas durante cuatro semanas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) y posteriormente inducidas con estreptozotocina.

Los valores representan la media \pm EE. * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizados con la prueba de Dunnet. Sanas.- Control sano. Diabéticas.- Control diabético. Preventivo.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes antes la inducción.

En la figura 8 se presentan los valores del peso semanal de las ratas del segundo experimento, se observa que todos los grupos iniciaron con pesos similares y después de la primer semana de inducción, los pesos de las ratas diabéticas (control y tratamientos) disminuyeron como consecuencia del desarrollo de la enfermedad, sin embargo, las ratas del grupo tratamiento mantuvieron un mayor peso comparado con el grupo diabético, durante todo el experimento, esto podría

estar relacionado con la concentración de glucosa para este grupo, 23 % menor comparado con el grupo diabético. Esta disminución de glucosa en sangre, sugiere que el frijol permite la incorporación del azúcar a músculo y tejido adiposo, incrementando la síntesis de triglicéridos y proteínas musculares, lo que es visible en un mayor peso para las ratas tratadas después de la inducción.

Por otro lado, se observa que el frijol no tuvo efecto sobre el peso de las ratas del grupo preventivo-tratamiento, este efecto puede ser atribuido a las bajas concentraciones de insulina, lo cual genera altas concentraciones de glucosa sanguínea al no incorporarse a los tejidos dependientes de insulina, hay un gasto excesivo de proteínas musculares y triglicéridos, reflejado en el bajo peso corporal de este grupo que es similar al grupo diabético. Recordando que estudios previos han reportado que los flavonoides pueden regenerar el daño a las células β pancreáticas en animales diabéticos (Chakravarthy y col., 1982).

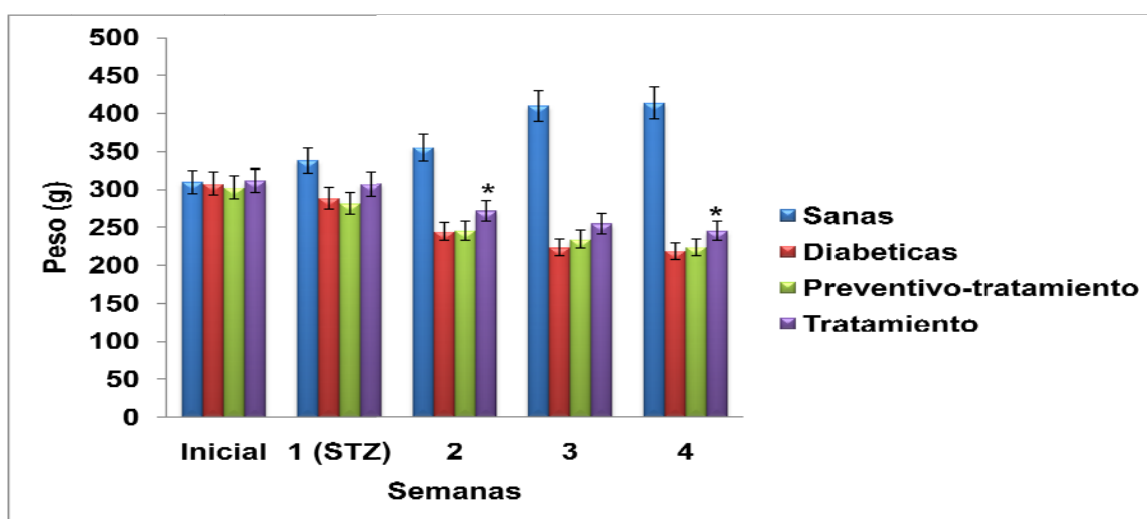


Figura 8. Peso corporal de ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de diabetes.

Los valores representan la media \pm EE. *Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizados con la prueba de Dunnet. Sanas.- Control sano. Diabéticas.- Control diabético. Preventivo-tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes antes y un mes después de la inducción. Tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes después de la inducción.

7.2.4 Consumo de agua

En la diabetes, la degradación de glucosa (glucólisis) se ve disminuida; por un lado, el hígado adopta un estado gluconeogénico produciendo glucosa a partir de otras moléculas como aminoácidos, y por el otro lado, la elevada relación de glucagón/insulina induce la degradación de glucógeno. Por lo tanto, en el hígado se produce una cantidad excesiva de glucosa que se libera a la sangre. De tal modo que cuando la concentración de glucosa en sangre supera la capacidad de reabsorción de los túbulos renales, la glucosa se excreta en la orina, por lo que grandes cantidades de agua son necesarias en este proceso de eliminación de glucosa (Magnuson y col., 2008), por esta razón, cuando hay un descontrol metabólico, a consecuencia de la hiperglucemia, se orina frecuentemente y en grandes cantidades; a esto se le llama poliuria y esto a su vez genera una alta ingesta de agua (Braunwald y col., 1998). Por lo anterior, se determinó el consumo de agua para los dos experimentos, como indicador de control de la enfermedad.

En la figura 9 se muestran los valores correspondientes al promedio de agua consumida durante las cinco semanas de experimentación. Se puede observar que las semanas antes de la inducción el consumo de agua para los tres grupos fue similar (135 mL aprox.), sin embargo, a partir de la inducción el consumo de agua se incrementó incluso para el grupo preventivo (850 mL), lo cual muestra que el frijol no ejerce un efecto marcado sobre el consumo de agua. Recordando también que en este grupo hubo una concentración de glucosa incluso mayor que el grupo diabético, por lo que es necesario una gran cantidad de agua para la eliminación de glucosa.

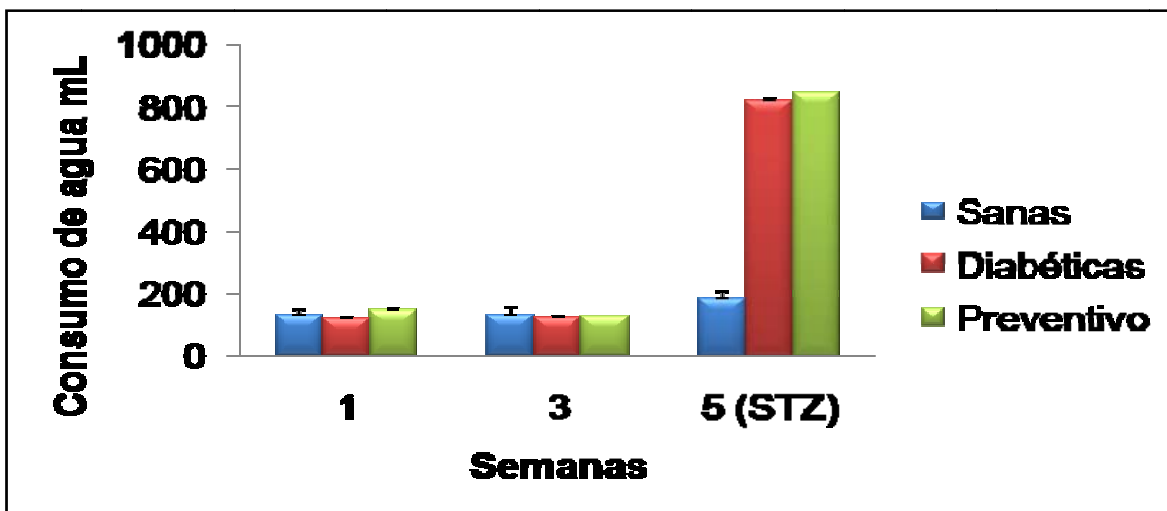


Figura 9. Agua consumida de ratas alimentadas durante cuatro semanas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) y posteriormente inducidas con estreptozotocina.

Los valores representan la media \pm EE. * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizados con la prueba de Dunnet. Sanas.- Control sano. Diabéticas.- Control diabético. Preventivo.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes antes la inducción.

La figura 10 muestra el promedio de agua consumida por los diferentes grupos en las cuatro semanas de experimentación. En términos generales se puede observar que el consumo de agua para el grupo diabético se incrementó respecto al grupo sano, lo que era de esperarse de acuerdo al aumento de glucosa generado en el desarrollo de la enfermedad para las ratas diabéticas. También se observa que el consumo de frijol ejerce un efecto sobre el agua consumida para el grupo tratamiento (20 % menos consumo de agua) respecto a las ratas diabéticas, mientras que para el grupo preventivo-tratamiento se observa un control sobre este parámetro solamente en las dos primeras semanas del experimento.

Figura 10. Consumo de agua de ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de diabetes.

Los valores representan la media \pm EE. *Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizados con la prueba de Dunnet. Sanas.- Control sano. Diabéticas.- Control diabético. Preventivo-tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes antes y un mes después de la inducción. Tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes después de la inducción.

7.2.5 Consumo de alimento

La polifagia es otro de los síntomas generales de la diabetes, este padecimiento está caracterizado por un consumo excesivo de alimento. El paciente diabético que mantiene concentraciones de glucosa sanguínea elevadas no puede incorporar glucosa a tejidos adiposo y muscular, la ausencia de glucosa dentro de estas y otras células genera la necesidad de energía, lo que trae como resultado el consumo no moderado de alimento (Lundstrom y Rossini, 2004).

En la figura 11 se muestra las cantidades de alimento consumido durante las cuatro semanas del primer experimento. Se observa que antes del desarrollo de la

enfermedad el consumo de alimento se mantuvo similar para los tres grupos. En el mismo contexto, se observa que en la semana de inducción de diabetes, la enfermedad ya desarrollada en las ratas se evidenció con un consumo elevado de alimento para el grupo preventivo (220 g aprox.), el cual fue similar al control diabético. Lo que sugiere que un consumo de frijol previo al desarrollo de la diabetes, no tiene efecto sobre la polifagia propia de la enfermedad.

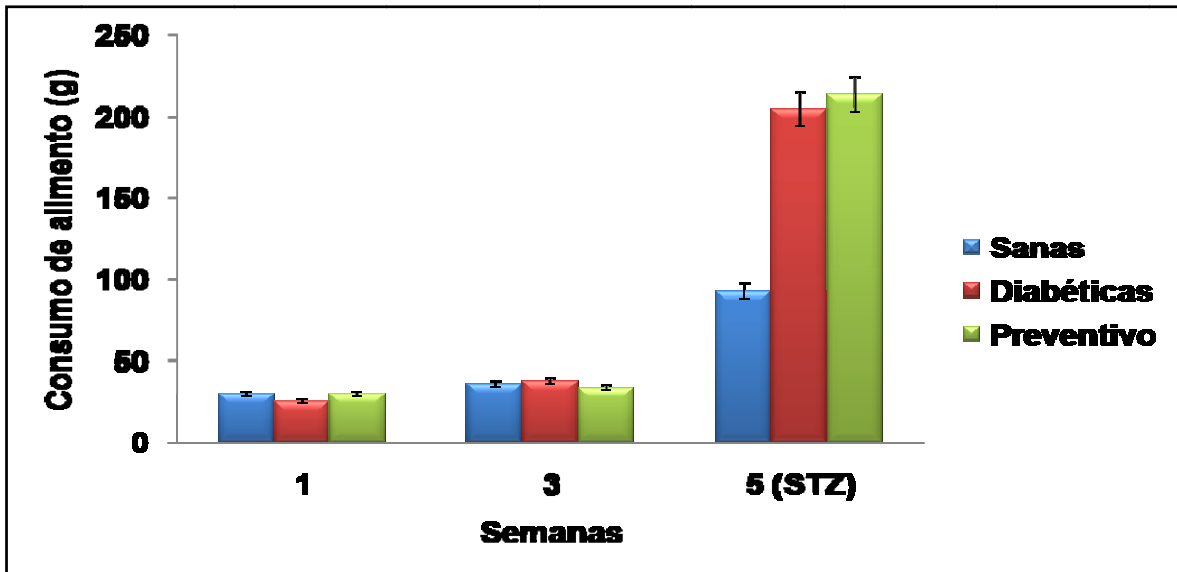


Figura 11. Alimento consumido por ratas alimentadas durante cuatro semanas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) y posteriormente inducidas con estreptozotocina.

Los valores representan la media \pm EE. *Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizados con la prueba de Dunnet. Sanas.- Control sano. Diabéticas.- Control diabético. Preventivo.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes antes de la inducción.

En la figura 12 se presentan las cantidades de alimento consumido por los grupos del segundo experimento. Como se puede apreciar, el control diabético consume mucho más alimento que el grupo sano (91 g y 196 g respectivamente), por otro lado se observa que los grupos preventivo-tratamiento y tratamiento muestran un menor consumo de alimento (16% menos) respecto su control diabético, esto puede deberse a que el contenido de fibra pudiera estar ejerciendo mayor saciedad en las ratas, o bien podría aumentar la concentración de insulina (Pari y

Venkateswara., 2003), mejorando así la expresión de péptidos anorexigénicos e inhibiendo la secreción de glucagón y ácido gástrico, así contribuye en el vaciado gástrico. Este último efecto conduce también a un incremento de la saciedad con disminución en el consumo de alimentos conjuntamente con un deseo disminuido de ingerir alimentos (www.themedicalbiochemestrypage.org).

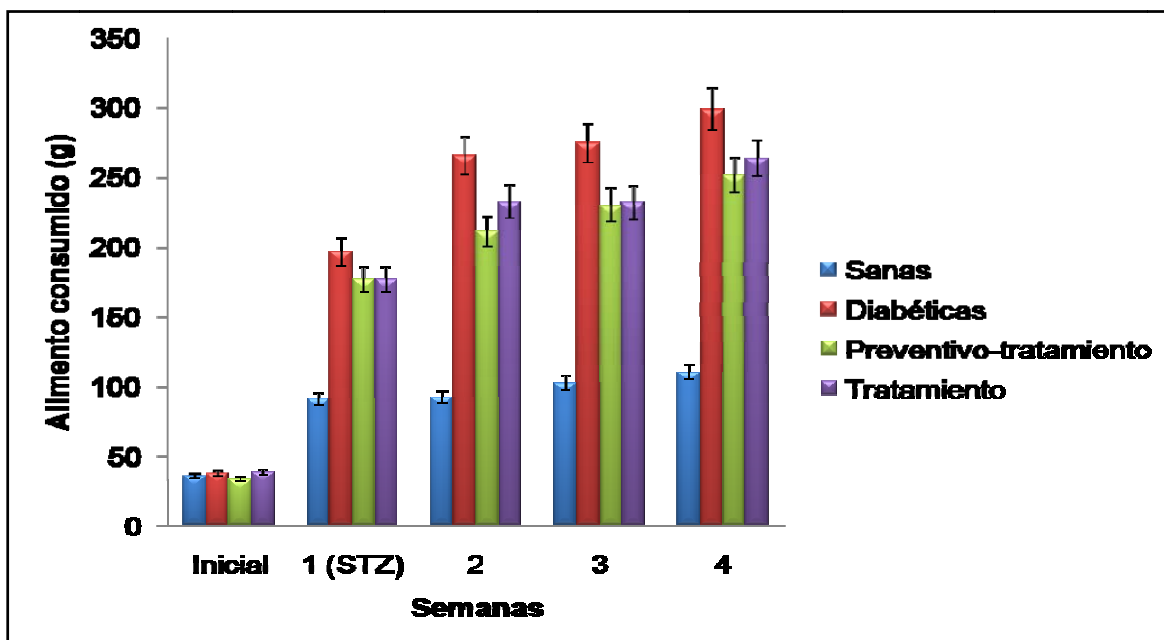


Figura 12. Alimento consumido por ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de diabetes.

Los valores representan la media \pm EE. *Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizados con la prueba de Dunnet. Sanas.- Control sano. Diabéticas.- Control diabético. Preventivo-tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes antes y un mes después de la inducción. Tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes después de la inducción.

7.2.6 Parámetros de función renal

7.2.6.1 Glucosa en orina

La determinación de glucosa en orina (glucosuria), suele formar parte del análisis de orina rutinario, la presencia de ésta en la orina refleja que sus cifras estaban

altas en el momento en que la sangre fue filtrada en los riñones. Por lo general, aparece glucosa en la orina cuando la glucemia supera los 160–180 mg/dl, a lo que se le denomina umbral del riñón para la glucosa. Cuanto mayor es la cantidad de glucosa que hay en la sangre, mayor podría ser la presencia de glucosa en la orina. La presencia de glucosa en la orina no muestra en sí que se ha dañado el riñón, sin embargo, la pérdida de glucosa en la orina, en forma sostenida, es un marcador de descontrol metabólico, que favorece con el tiempo la aparición de complicaciones renales, además de ser un indicador de las pérdidas nutricionales del paciente (Lundstrom y Rossini, 2004).

La figura 13 muestra la concentración de glucosa en mg/dL de los cuatro diferentes grupos para este experimento. Se observa que la concentración de glucosa del control diabético es mayor (928 mg/dL) comparada con el grupo de ratas sanas (100 mg/dL). Del mismo modo se puede observar que las concentraciones de los grupos preventivo-tratamiento y tratamiento son elevadas (785 y 642 mg/dL respectivamente), sin embargo, son menores hasta en un 30 % comparadas con el control diabético. Por lo que se sugiere que para este experimento el consumo de frijol ejerce un control sobre la concentración de glucosa sanguínea lo que se refleja en la menor presencia de glucosa en orina y menor consumo de agua, principalmente para el grupo tratamiento.

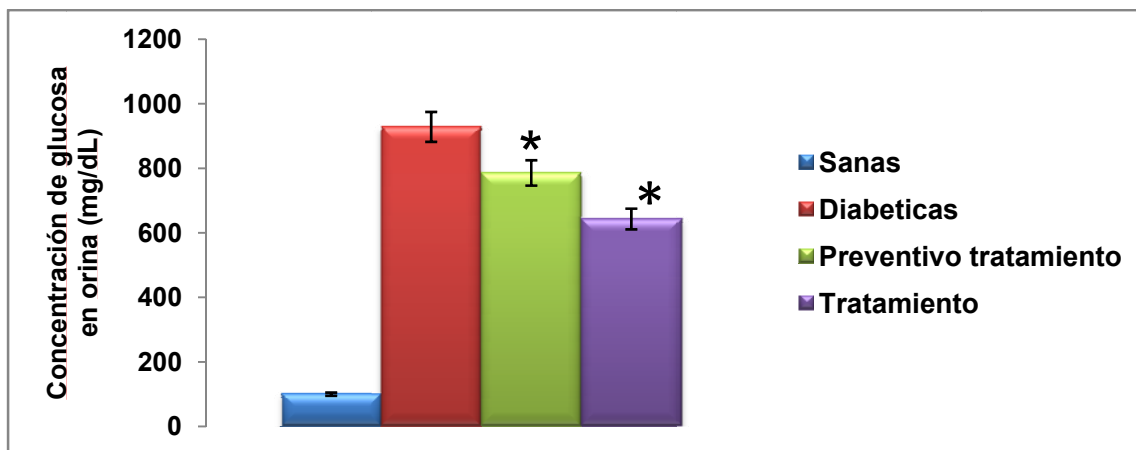


Figura 13. Concentración de glucosa en orina de ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de diabetes.

Los valores representan la media \pm EE. *Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizados con la prueba de Dunnet. Sanas.- Control sano. Diabéticas.- Control diabético. Preventivo-tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes antes y un mes después de la inducción. Tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes después de la inducción.

7.2.6.2 Concentración de creatinina en orina

La creatinina es un metabolito del recambio muscular, es extraída de la creatina o fosfocreatina y es liberada hacia la sangre. La creatinina se produce a una velocidad relativamente constante en una cantidad que depende de la masa muscular de cada persona. Se excreta por medio de los riñones en la orina a través de la filtración glomerular o la secreción tubular (Atlas de la diabetes, 2002). La creatinina se determina en varias condiciones, si se necesita un estimado del índice de filtración glomerular, monitoreo de enfermedades renales agudas y crónicas, desórdenes metabólicos como la diabetes, metabolismo de proteínas elevado, entre otros (www.nkdep.nih.gov).

En la figura 14 se muestra la concentración de creatinina en mg/dL para los cuatro grupos correspondientes a este experimento, notando que la concentración de creatinina del control diabético es mayor comparada con las ratas sanas (5.0 ± 1.0 y

9.8±1.9 mg/dl respectivamente) resaltando que el valor de las ratas sanas es similar a lo reportado por Fisher (2009) (5.5 mg/dl para ratas sanas y 12 mg/dl para ratas diabéticas). Mientras que las concentraciones de los grupos tratados, 6.46 ± 3.50 para el grupo preventivo-tratamiento y 7.25 ± 3.80 para el grupo tratamiento, fueron menores respecto a su control. La concentración de creatinina encontrada para los grupos tratados sugiere que el consumo de frijol ejerce un control sobre la degradación de proteínas musculares, lo que pudiera estar reflejado en una protección renal, tal como, lo ha reportado Lomas y col. (2008) en ratas tratadas con esta misma variedad de frijol.

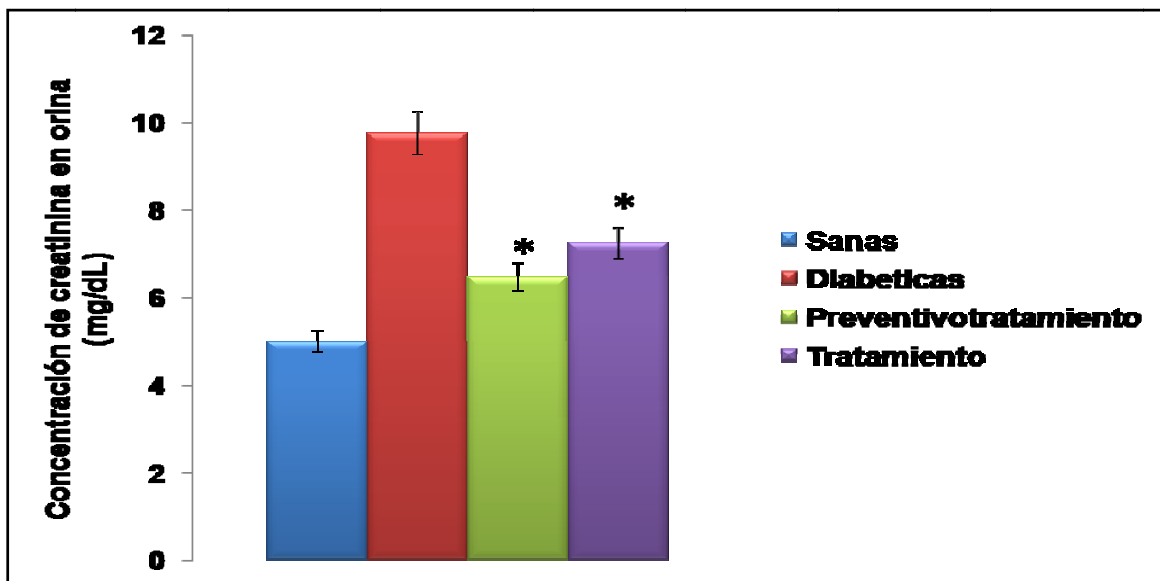


Figura 14. Concentración de creatinina en orina de ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de diabetes.

Los valores representan la media ± EE. *Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizados con la prueba de Dunnet. Sanas.- Control sano. Diabéticas.- Control diabético. Preventivo-tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes antes y un mes después de la inducción. Tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes después de la inducción.

7.2.6.3 Concentración de microalbúmina

Una de las principales complicaciones ocasionada por la progresión de la diabetes es la nefropatía diabética. La nefropatía diabética está definida como la pérdida progresiva de la función renal asociada a la diabetes, acompañada por presencia de niveles elevados de albúmina y proteínas en la orina (Navarro, 2003). La progresión del daño renal conocido también como daño renal crónico, se caracteriza por el engrosamiento del glomérulo, durante esta etapa, el riñón comienza a permitir la salida a través de la orina de cantidades anormales de proteína (Userpater e Inserra., 2004). Dichas proteínas son utilizadas como factores predictivos del daño renal y en estados iniciales del daño se detecta microalbuminuria (Wiseman y col, 1985).

Por lo anterior, se determinó la concentración de microalbúmina y proteína total en la orina de las ratas tratadas con frijol N8025 antes y después de la inducción de la diabetes

En la figura 15 se puede apreciar que los valores de microalbúmina para el control diabético son mucho mayores comparados con las ratas sanas (1.05 ± 0.50 Vs 0.34 ± 0.05 mg/12h), a este respecto se podría suponer que el control diabético presenta alteración renal. En el mismo contexto, se observa que el consumo de frijol para los grupos tratados ejerce una disminución de la concentración de microalbúmina en la orina de las ratas. Presentándose valores de 0.84 ± 0.47 mg/12h para el grupo preventivo tratamiento, aún cuando no fue estadísticamente significativos en esta determinación si es un valor menor comparado con su control, sin embargo, la concentración obtenida para el grupo tratamiento si mostró diferencia significativa comparada con el control (1.05 ± 0.50 contra 0.67 ± 0.30), por lo que se puede decir que el consumo de frijol posterior al desarrollo de la enfermedad, podría disminuir el daño renal.

Por otro lado, también existe información que demuestra que la presencia de microalbúmina es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares y define un grupo de alto riesgo para la mortalidad cardiovascular temprana tanto en

la diabetes tipo 2 como en la hipertensión, puesto que la microalbúmina implica una permeabilidad vascular anormal y presencia de aterosclerosis. En los pacientes diabéticos, la microalbúmina se relaciona con presiones sanguíneas elevadas, colesterol total sérico elevado y lipoproteínas de alta densidad-colesterol disminuidas (Bakris, 2004), Recapitulando los resultados de perfil lipídico de este trabajo, también se observó una disminución de estos parámetros en ratas que consumieron frijol después de la inducción, por lo que se puede sugerir que el frijol es útil en la prevención del riesgo cardiovascular y daño renal, generados en la progresión de la diabetes.

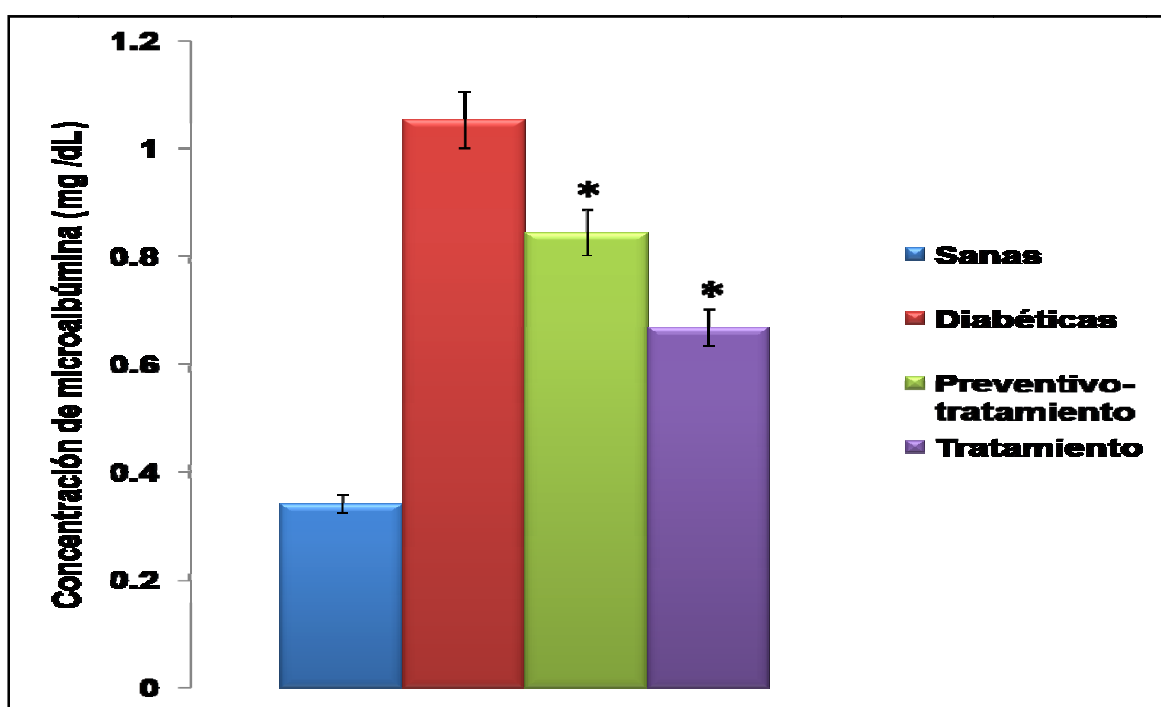


Figura 15. Concentración de microalbúmina en orina de ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de diabetes.

Los valores representan la media \pm EE. *Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizados con la prueba de Dunnet. Sanas.- Control sano. Diabéticas.- Control diabético. Preventivo-tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes antes y un mes después de la inducción. Tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes después de la inducción.

7.3 Concentración sérica de IL-1 β y TNF- α

La inflamación es una reacción vascular de los tejidos que tiene como finalidad eliminar los agentes nocivos y los tejidos lesionados, sin embargo, la inflamación excesiva puede ser un factor crítico en muchas enfermedades cardiovasculares tales como, obesidad, cáncer y diabetes principalmente. Este tipo de inflamación está caracterizada por un incremento en la producción de moléculas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), y diversas interleucinas (Miranda y Reza, 2007), el desarrollo de la diabetes y la destrucción pancreática que conlleva, ha sido atribuida en gran medida a la acción de los mencionados productos pro-inflamatorios (Manrique y Silva, 2006).

Estudios recientes han demostrado que la inducción de hiperglicemia, tanto en sujetos sanos como en individuos con intolerancia a la glucosa, produce un incremento en los niveles plasmáticos de componentes inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las interleucinas 1 (IL-1 β) y 6 (IL-6) (Navarro, 2003).

Por otro lado, una vez desarrollada la diabetes, existe una relación entre la inflamación y las complicaciones de la enfermedad, específicamente el desarrollo de la nefropatía. Diversos estudios han mostrado que los pacientes diabéticos con un incremento de la excreción urinaria de albúmina (EUA) presentan niveles elevados de parámetros inflamatorios, tales como, TNF- α y otras citocinas (Navarro, 2003)

Puesto que las citocinas pro-inflamatorias juegan un papel crucial en el desarrollo y complicaciones de la diabetes, se evaluaron en este estudio para determinar su papel en la destrucción de células β -pancreáticas y en el daño renal.

En la figura 16 se muestran las concentraciones séricas para el primer experimento (preventivo) tanto de TNF- α como de IL-1 β , se observa que para ambas citocinas la concentración es menor comparadas con su control diabético, incluso similares a la concentración de su respectivo grupo sano.

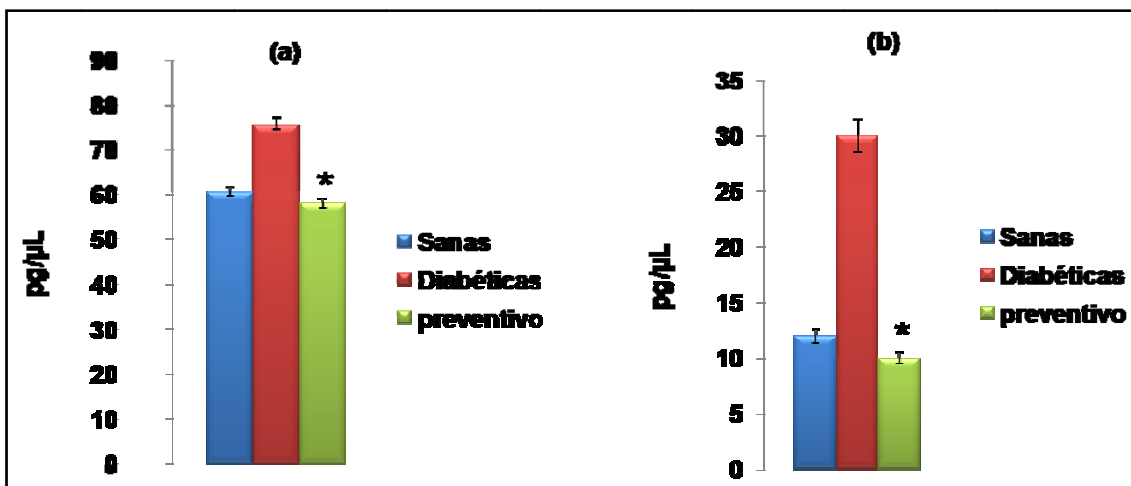


Figura 16. Concentración sérica de (a) TNF- α y (b) IL-1 β de ratas alimentadas durante cuatro semanas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) y posteriormente inducidas con estreptozotocina.

Los valores representan la media \pm EE. * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizados con la prueba de Dunnet. Sanas.- Control sano. Diabéticas.- Control diabético. Preventivo.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes antes la inducción.

Se sabe que durante el desarrollo de la enfermedad cada una de estas citocinas, dependiendo de su concentración, alterará el metabolismo normal de la célula β pancreáticas afectando la síntesis y secreción de insulina (Manrique y Silva, 2006). Por lo anterior se esperaría, que al encontrar una menor concentración de TNF- α e IL-1 β , las concentraciones de glucosa disminuyeran debido a una mayor producción de insulina comparadas con el control diabético. Sin embargo, la concentración para el grupo alimentado con frijol (preventivo), como se mencionó anteriormente, fue incluso mayor que para las ratas diabéticas. Una posible explicación es que el daño ocasionado al páncreas por medio de la estreptozotocina no está directamente relacionado con la concentración de estas citocinas a los tiempos evaluados.

Con el objetivo de saber si existe una correlación entre los niveles de citocinas en sangre y el daño renal se midieron los niveles de las citocinas pro-inflamatorias

IL-1 β y TNF- α en el suero de las ratas del segundo experimento (grupos preventivo-tratamiento y tratamiento), los resultados se muestran en la figura 17. Se observa que se presentó una disminución de IL-1 β para los grupos preventivo-tratamiento y tratamiento (51% y 30 %, respectivamente) comparados con el control diabético. Por otro lado, en cuanto a la concentración de TNF- α , sólo hubo una disminución para el grupo tratamiento con un 33% menos que el control diabético.

Esto sugiere que la incorporación de frijol en la dieta de las ratas diabéticas ayuda a disminuir estas citocinas relacionadas con la progresión del daño al páncreas, así como, el daño renal, principalmente para el grupo tratamiento, que tuvo un consumo de frijol solo después de la inducción, lo que correlaciona con las concentraciones de glucosa sanguínea y microalbúmina, glucosa y creatinina en orina que fueron menores para este grupo respecto a su control diabético.

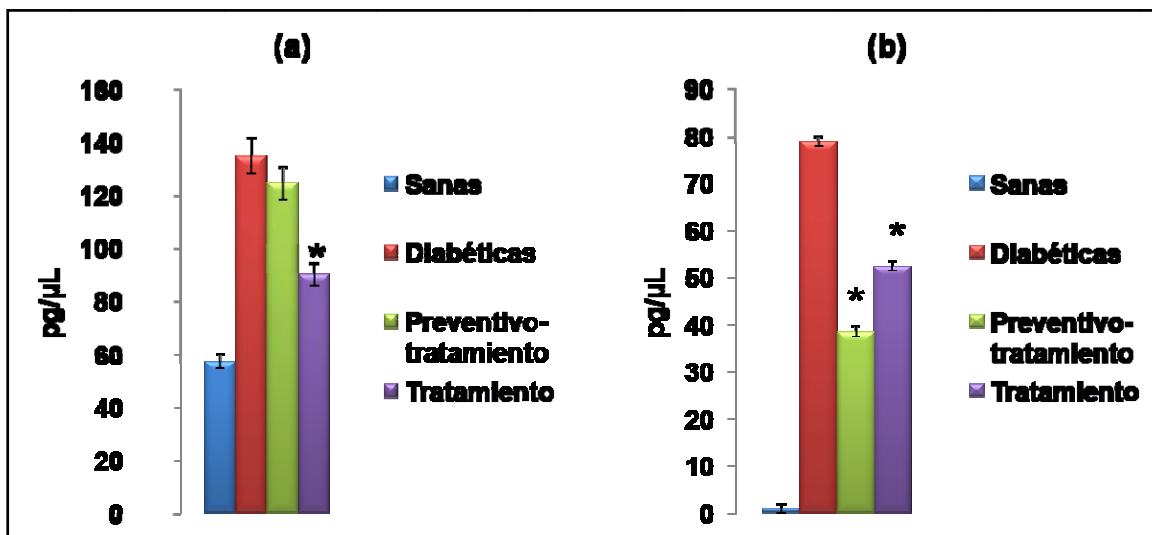


Figura 17. Concentración sérica de (a) TNF- α y (b) IL-1 β de ratas alimentadas con una dieta suplementada con frijol N8025 (25%) antes y después de la inducción de diabetes.

Los valores representan la media \pm EE. *Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) respecto al control diabético, analizados con la prueba de Dunnet. Sanas.- Control sano. Diabéticas.- Control diabético. Preventivo-tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes antes y un mes después de la inducción. Tratamiento.- Ratas alimentadas con harina de frijol un mes después de la inducción.

7.4 Análisis histológico del riñón

En la figura 18 se presenta las microfotografías de las preparaciones histológicas de riñón de las ratas en estudio, los glomérulos se observan prácticamente normales, solamente se observó un ligero incremento en tamaño para los glomérulos de las ratas diabéticas.

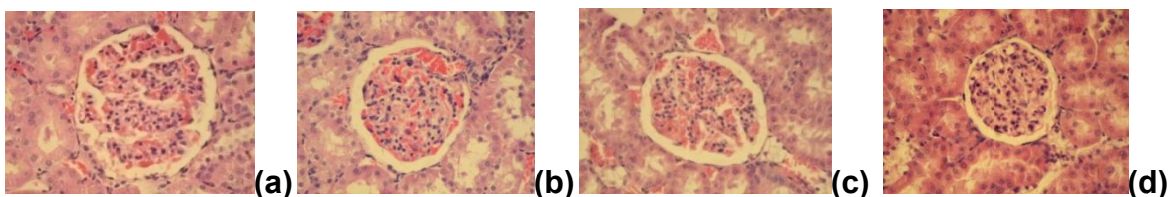


Figura 18. Microfotografías de corteza renal pertenecientes al riñón de (a) control diabético (b) grupo preventivo- tratamiento. (c) Grupo tratamiento.(d)Control sano. Tinción con hematoxilina-eosina.

Estos resultados demuestran que el daño ocasionado al riñón por la enfermedad, aún no es visible a nivel glomerular en el tiempo evaluado. Sin embargo, los resultados obtenidos en cuanto a microalbúmina, glucosa y creatinina en orina predicen un futuro daño a estructural que a este momento del experimento puede ligeramente observarse con un incremento en el volumen glomerular observado en las microfotografías del control diabético.

7.5 Análisis histológico de páncreas

Actualmente se han realizado diversos estudios en los que se han probado diferentes antioxidantes en la prevención de la destrucción pancreática (Hideaki y col., 2000; Slonim y col., 1993), sin embargo el frijol no ha sido utilizado con este fin, aunque si se tiene información del uso de frijol utilizado sobre las complicaciones de la enfermedad y con resultados que demuestran que puede actuar como hipoglicémico y antioxidante (Roman-Ramos y col., 1995; Petlevski y col., 2001; Subramanian y Leelavinothan, 2002). Por ello en este trabajo se realizó un análisis histológico que permitió evaluar el efecto del frijol antes y después de la enfermedad sobre el daño pancreático generado por una inyección única de

estreptozotocina, así como, el daño generado con el progreso de la propia enfermedad.

El análisis histológico se realizó en los preparados pancreáticos de ambos experimentos. Para los grupos pertenecientes al primer experimento, se observó que en 30% de las ratas del grupo preventivo existe una conservación de hasta un 40% en islotes pancreáticos respecto al control diabético (figura 19). Aunque este resultado no es estadísticamente significativo podría explicar a nivel fisiológico que el consumo de frijol disminuye el daño pancreático en animales alimentados con esta leguminosa.

En la figura 19 B se puede observar un islote representativo del grupo preventivo el cual puede ser comparado con el islote de la figura 19 A representativo del grupo diabético.

Figura 19. Micrografías histológicas del páncreas de ratas tratadas con frijol N8025 antes de la inducción de diabetes. (A) Islote de control diabético. (B) Islote de grupo preventivo. (C) Área de células β . * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control diabético, analizados con la prueba de Dunnet.

En el segundo experimento se observó que en 70% de las ratas pertenecientes al grupo Tratamiento (figura 20 C) hubo una conservación de los islotes de hasta un 30% respecto al grupo diabético (figura 20 A) resultado que fue estadísticamente significativo.

Por otro lado no se observaron resultados significativos para el grupo preventivo-tratamiento (figura 20 B), para el cual la conservación de los islotes fue sólo del 5% respecto al control diabético.

Recordando que el grupo preventivo-tratamiento fue alimentado con una dieta a base de frijol (25%) durante un mes antes de ser inducido a la enfermedad y continuando un mes después de la misma y que el grupo tratamiento fue alimentado con la misma dieta pero solo durante un mes después de la inducción, se esperaría que el primero tuviera una mayor protección contra la destrucción del páncreas, sin embargo no fue así, mostrándose una mayor conservación en el grupo alimentado con la dieta de frijol después de la inducción. Esto podría explicarse con lo ya antes mencionado, puesto que el frijol a altas concentraciones de consumo, podría actuar como pro oxidante y junto con el estrés oxidativo ya propio de la enfermedad avanzada propiciar la destrucción de las células pancreáticas, tal como se observó.

Figura 20. Micrografías histológicas del páncreas de ratas tratadas con frijol N8025 antes y después de la inducción de diabetes. (A) Islote de control diabético. (B) Islote de grupo preventivo-tratamiento. (C) Islote de grupo tratamiento. (D) Área de células β .

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

En base a estos últimos resultados se demuestra que el consumo de frijol en el inicio de la enfermedad puede prevenir a nivel fisiológico la destrucción de los islotes pancreáticos de algunas ratas lesionadas con estreptozotocina, mientras que el frijol consumido antes y después de la inducción de la enfermedad incrementa el estrés oxidativo que se sumaría al propio de la enfermedad. Esto concuerda con las citocinas inflamatorias anteriormente mencionadas, en la que se observa que hay mayor concentración de TNF- α para el grupo preventivo-tratamiento (130 $\mu\text{g/mL}$), similar al control diabético (140 $\mu\text{g/mL}$) mientras que para el grupo tratamiento se presentó una concentración de 85 $\mu\text{g/mL}$.

VIII. CONCLUSIONES

El consumo de frijol N8025 a altas concentraciones una vez iniciada la diabetes, muestra efectos hipoglicemiantes e hipolipemiantes, sin embargo, si se consume previamente y después de la inducción de la diabetes no mejora los niveles de glucosa sanguínea pero sí disminuye los niveles de colesterol.

La protección del páncreas fue mejor en animales que consumieron frijol después de la diabetes comparados con los animales alimentados antes y después de la enfermedad, esto podría atribuirse al efecto potenciado de la STZ producido por algún componente del frijol.

El frijol muestra efectos benéficos sobre alteraciones renales independientemente de sus efectos hipoglucemiantes.

La protección renal y pancreática producida por el frijol podría estar relacionado con la citocina IL-1 β y TNF- α respectivamente.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Aal, E. S., Hucl, P. A. 1999. Rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. J. Agric. Cereal Chem. 76: 350-354.

Ali, A., Rizvi L. 2007. Inflammation markers as mediators of vasculo-endothelial dysfunction and atherosclerosis in the metabolic syndrome and type 2 diabetes. Chin Med J. 120:1918-1924.

Aparicio-Fernández, X., Manzo-Bonilla, L., Loarca-Piña, G. 2005. Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1. J. Food Sci. 70:73-78.

Aronson, D. 2008. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. Adv. Cardiol. 45:1-16.

Arredondo, A, Zúñiga, A, Parada, I. 2005. Health care costs and financial consequences of epidemiological changes in chronic diseases in Latin America: evidence from Mexico. J. Public Health. 119:711-20.

Atlas de la diabetes. Ian, N. Scobie, M. D. 2002. Medway maritime hospital. 2a. edición. The encyclopedia. 7-31.

Bakris, L. G. 2004. Medical Book: Microalbuminuria. 3rd. Edit. McGraw-Hill. Sección I. Cap. 2. p. p. 21-31.

Bonora E. 2008. Protection of pancreatic beta-cells: is it fastible? Health Science J. 18:74-83.

Bosch, X. Alfonso, F. y Bermejo, Javier. 2002. Diabetes y enfermedad cardiovascular. Una mirada hacia la nueva epidemia del siglo XXI. Rev Esp Cardiol. 2002;55:525-7

Braunwald, E., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L. 1998. Principios de medicina interna. Harrison. Décimo quinta edición. Edit. McGraw-Hill. p.p. 2467-2487.

Braunwald, E., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L. 1998. Principios de medicina interna Harrison. 15^a edición. Editorial Mc. Graw-Hill. p. p. 2467-2487.

Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *J. Nat.* 414: 813-320.

Cardador-Martínez A., Loarca-Piña GF., Oomah BD. 2002. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *J. Agric Food Chem.* 50: 6975-80.

Cardador-Martínez A., Castaño-Tostado E., Loarca-Piña GF. 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L) against aflatoxin B1. *Food Addit Contam.* 19:62-9.

Chakravarthy, B. K., Gupa, S., Gode, K. D. 1982. Functional beta cell regeneration in the islets of pancreas in alloxan induced diabetic rats by (-)-epicatechin. *Life Sci.* 24:2693-2697.

Chomczynski P, Saachi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *J. Anal. Biochem.* 162:156-159.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1980. Diversificación genética de las especies cultivadas del género *Phaseolus*. *Rev. Fitotec. Mex.* 29: 16-17.

Delgado, S. A., Bonet, A. Gepts, P. 1988. The wild relative of *Phaseolus vulgaris* in Middle America. 1st Edit. Dordrecht:. Pp.163-184.

Deshpande, S.S., Cheyran, M. 1987. Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. J. Food Sci. 52:332-334.

Diaz-Batalla, L., Widholm, J. M., Fahey, G.C., 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.

Eknoyan, G. 2007. Obesity, diabetes and chronic kidney disease. Contrib. J. Nephrol. 151:1-18.

Espinoza-Alonzo, L. G., Lygin, A., Widholm, J. M. , Valverde, M.E., Paredes- López, O. 2006. Polyphenoles in Wild and Weeby Mexican Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L). J. Agric. Food Chem. 54:4436-4444.

Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., Grodsky, G. M. 2002. Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. Endocr Rev. 23:599–622

Feregrino, P. A. A. 2008. Caracterización y efecto de polisacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025 sobre el estadio temprano de cáncer de colon. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro.

Fisher, H. 2009. Variations in the Urinary Creatinine Excretion of Diabetic Rats Fed Diets with Different Protein and Amino Acid Content. The Journal nutrition. 85:65-70.

Friedman, H. H. 2004. Manual de diagnóstico. Edit. MASSON. 5a edición. Pp 368-369.

García., T. F. 1997. Fundamentos de Inmunobiología. Dirección General de publicaciones UNAM. 1ª Edición. Pp. 353-354.

George S. Eisenbarth, M.D., Ph.D., Barbara Davis. 2007. Update in type 1 of diabetes. J. Clin Endocrinol Metab.92: 2403-2407.

Gepts, P., Osborn, T. C., Rashka, K., Bliss, F. A. 1986. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. J. Econ. Bot. 40:451-468.

Hamden, K., Carreau, S., Jamoussi, K., Miladi, S., Lajmi, S., Aloulou, D., Ayadi, F., Elfeki, A. 2009. 1Alpha,25 dihydroxyvitamin D3: therapeutic and preventive effects against oxidative stress, hepatic, pancreatic and renal injury in alloxan-induced diabetes in rats. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 55:215-22.

Heidari Z, Harati M, Mahmoudzadeh-Sagheb HR, Moudi B. 2008. Beta cell protective effects of sodium tungstate in streptozotocin-induced diabetic rats: glycemic control, blockage of oxidative stress and beta cell histochemistry. Iran Biomed J.12(3):143-52.

Hirano T., Akira S., Taga T., Kishimoto T. 1990. Biological and clinical aspect of interleukin 6. J. Immunol. Today. 11: 443-449.

Illnait, P. J. 1997. La dislipidemia en el paciente diabético. Parte I: Bioquímica patológica. Rev. Cubana Med. Gen. Integr. 13:372-377.

Lei, J., Hong-Yu X., Li-Ji, J., Shu-Ying, L., and Yong-Ping X. 2007. Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes. European Journal of pharmacology. 582:162-167.

Lomas, S. M. C. 2008. Efecto del consumo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido sobre citocinas proinflamatorias relacionadas con daño renal en ratas diabéticas. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.

Ludwig, S. D. 2003. Glicemic Load Comes of Age. *J. Nutr.* 133:2728-2732.

Lundstrom, E. R., Rossini, A. A. 2003. *The Diabetes Handbook*. Edit. Sudbury, Mass. Pp. 18-19.

Magnuson, M.A. Gannon, M. Ables, E.T. Crawford, L. Lowe, D. Offield, M.F. Wright, C.V. 2008. pdx-1 function is specifically required in embryonic beta cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis. *Dev Biol* 314: 406-17.

Magnuson, M.A. Gannon, M. Ables, E.T. Crawford, L. Lowe, D. Offield, M.F. Wright, C.V. 2008. pdx-1 function is specifically required in embryonic beta cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis. *Dev Biol* 314: 406-17.

Malacara, J.M., García, V.M., Valverde, R.C. 1997. *Fundamentos de endocrinología*. Cuarta edición. Edit. Salvat. p.p. 485-512.

Malmstrom, R., Packard, C. J., Caslake M., y Taskinen, M. R. 1999. Fisiopatología de la Dislipidemia Diabética: Nuevas Ideas. *Card Risk Factors*. 8: 236-242.

Manrique, C., Silva, G. 2006. Apoptosis de las células β del páncreas durante la diabetes tipo I. *Rev. Fac Med Uni Nac Colomb*. 54. 3. p.p 35-69.

Miranda, G. LM. Reza, A. A. 2007. Obesidad, inflamación y diabetes. *Gac Méd Méx*. 144:128-135

Navarro. L. 2003. Nefropatía diabética, ¿Una cuestión de inflamación? Hipótesis del daño renal inflamatorio en la diabetes mellitus tipo II. *Rev. Nefrol*. 82:940-946.

Nicoletti A, Sassy-Prigent C. 1996. An alternative quantitative polymerase chain reaction method. *Rev. Anal. Biochem.* 236:229-241.

Paredes, L. O., Guevara, L. F., Bello, P. L. A. 2006. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. FCE. SEP. CONACYT. CAB.

Pari, L., Venkateswara, S. 2003. Effect of an aqueous extracto of *Phaseolus vulgaris* on plasma insulin and hepatic key enzymes of glucosa metabolism in experimental diabetes. *Pharmazie.* 58:916-925.

Perez, T.G. 2003. Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. *Rev. Cubana Invest Biomed.* 22: 48-57.

Petlevski, R., Hadzija, M., Slijepsevic, M. 2001. Effect of “antidiabetics” herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. *J Ethnopharmacol.* 75:181-192.

Pitsavos, C., Demosthenes, B. P., Tzima, N., Chrysohoou, C., Economou, M., Zampelas, A., Stefanadis, C. 2005. *Am. J. Clin. Nutr.* 82:694-9

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applyin an improved ABTS radical cationdecolorization assay. *Rev. Free Rad Biol Med.* 26: 1231-1237.

Rodríguez, C.L., Fernández, R.X. 2003. Los frijoles (*Phaseolus vulgaris*): Su aporte a la dieta del costarricense. *Rev. Acta Med Costarrica.* 45:321-341.

Román-Ramos, R., Flores-Saenz, J. L., Alarcón-Aguilar, F. J. 1995. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. *J. Ethnopharmacol.* 48:25-32.

Sánchez-Recalde, A., Kaski, J. C. 2001. Diabetes mellitus, inflamación y aterosclerosis coronaria: perspectiva actual y futura. *Rev Esp. Cardiol.* 54:751-763.

Schultz, J., Harris, A., Rychly, D., Ergul A. 2005. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic Science to clinical practice. Rev. Bio. Central. p. p. 1-11.

Serrano J., Goñi I. 2004. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. ALAN.54:p.p. 38-42.

Serna, M. C. 2007. Estudio de la relación del consumo de diferentes concentraciones de frijol cocido con la prevención y desarrollo de cáncer de colon. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Reventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. Meth. Enzymol. 299:152-178.

Slonim, A. E., Surber, L. M., Page, L. D., Sharp, A. R. Burr, M. I. 1993. Modification of Chemically Induced Diabetes in Rats by Vitamin E. J. Clin. Invest. 71:1282-1288.

Soriano Bello, E. L. 2006. El uso del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) como planta medicinal. Tlahui-Medic. No. 21.

Subramanian, V., Leelavinothan, P. 2002. Antioxidant effect of *Phaseolus vulgaris* in streptozotocin-induced diabetic rats. Asia Pacific J.Clin.Nutr. 11:206-209.

Suchmita, N., Ranjana, N. 1997. Anti-oxidant flavonoids in common Indian foods. South Asian J. Prevent Cardiol. 1:33-35

Szkudelski, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. Physiol. Res. 50: 536-546.

Takeoka, G. R., Dao, L. T., Full, G. H., Wong R.Y., Harden, L. A., Edwards R. H., Berrios. J. J. 1997. Characterization of black bean (*Phaseollus vulgaris* L.) anthocyanins. J Agric Food Chem. 45: 3395-3400.

Ulloa, H. J., Hasan, A. 2001. Efectos antioxidante y antiagregante del fríjol rojo: un probable factor ateroprotector en la población latinoamericana. *Revista de Cirugía*. 58:916-925.

Userpater, M. Inserra, F. 2004. Pérdida de proteínas urinarias como marcador de daño renal no glomerular y de riesgo cardiovascular. *Rev. Nefrol. Dial. y Transpl.* 24:81-86.

Vargas, T. A., Osorio, D. P., Agama, A. E., Morales, F. L., Bello, P. L. A. 2006. Digestibilidad del almidón en diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Interciencia*. 31:75-84.

Venereo, G. J. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 31(2):126-33

Wang H., Cao G., Prior RL. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J Agric Food Chem.* 45: 304-309.

Wahle, K. W., Caruso, D., Ochoa, J.J., Quiles, J. L. 2004. Olive oil and modulation of cell signaling in disease prevention. *J. Lipids.* 398:1223-31

Weiguang, Y., J. Fischer, G., Krewer, and C., Akoh. 2005. Phenolic compounds for blue berries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 53:7320:7329.

Wellen K. E., Htamisliligil, G. S. 2005. Inflammation, Stress and Diabetes. *J Clinic Invest.* 115:5-11.

Wiseman, M. J., Saunders, A. J., Keen, H., Viberti, G. 1985. Effect of blood glucose on increased glomerular filtration rate and kidney size in insulin dependent diabetes. *New Eng J Med.* 12:617-621.

Wilson, G. L., Leiter, E.H. 1990. Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr Top Microbiol Immunol.* 156:27-54.

www.imss.gob.mx

www.themedicalbiochemestrypage.org

www.nkdep.nih.gov (National Kidney Disease Education program)