



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO
DE LA REPÚBLICA**

**EFECTO DEL CONSUMO DE FRIJOL (*Phaseolus
vulgaris*) COCIDO SOBRE CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS RELACIONADAS CON DAÑO
RENAL EN RATAS DIABÉTICAS**

TESIS

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

PRESENTA

I.B.Q MARÍA DEL CONSUELO LOMAS SORIA

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., NOVIEMBRE 2008



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República

**EFFECTO DEL CONSUMO DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) COCIDO SOBRE
CITOCINAS PROINFLAMATORIAS RELACIONADAS CON DAÑO RENAL EN
RATAS DIABÉTICAS**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:

I.B.Q. María del Consuelo Lomas Soria

Dirigido por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

SINODALES

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Presidente

Firma

Dr. Luis Miguel Salgado Rodríguez
Secretario

Firma

Dr. S. Horacio Guzmán Maldonado
Vocal

Firma

Dra. Minerva Ramos Gómez
Suplente

Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca
Suplente

Firma

Firma

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

Firma

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro.
Noviembre, 2008
México

RESUMEN

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas en la diabetes incrementan la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) e IL-6 (interleucina 6), que a su vez activan al factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B), el cual regula la expresión de proteínas relacionadas con el daño renal presente en la diabetes; sin embargo, las ROS pueden ser inactivadas por la enzima glutatión-S-transferasa (GST) mediante la conjugación con glutatión reducido (GSH). Dichos mecanismos pueden ser regulados a través de compuestos antioxidantes presentes en diversos alimentos, como el frijol. Diversos estudios han demostrado las propiedades antioxidantes e hipoglucemiantes del frijol; sin embargo, poco se sabe acerca del efecto que pudiera ejercer el frijol sobre el daño renal. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del consumo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre citocinas proinflamatorias involucradas en el daño renal en ratas diabéticas. Para ello, se determinó la concentración de taninos condensados, fenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante a las harinas de frijol cocido, donde el frijol Negro 8025 (N) presentó valores 4, 1.5, 8 y 1.2 veces mayores, respectivamente, comparados con el frijol Pinto Durango (PD). Para los estudios *in vivo* se trabajó con animales diabéticos inducidos con estreptozotocina 45 mg/kg (etapa inicial con \approx 250 mg/dl glucosa) y 55 mg/kg (etapa avanzada con $>$ 300 mg/dl glucosa), los cuales se alimentaron con harinas de frijol cocido PD y N incorporadas a la dieta a las concentraciones de 3, 12.5, 25 y 50 %, cuantificándose semanalmente glucosa sanguínea en ayuno. Al finalizar los tratamientos, se determinó la concentración de proteína y microalbúmina en orina, así como el perfil lipídico (colesterol y triglicéridos totales, HDL y LDL) y los niveles de TNF- α e IL-6 en sangre. El consumo de frijol produjo un efecto hipoglucemiante e hipolipidémico en ratas diabéticas de la etapa inicial; mientras que en animales diabéticos de la etapa avanzada no se observó una disminución de los niveles de glucosa, pero sí un decremento en los marcadores de daño renal como proteína y albúmina en orina; además de colesterol total, LDL, IL-6 y TNF- α . Asimismo, se observó un incremento en la concentración de GSH y la actividad de GST, lo que podría estar relacionado con la regulación de la expresión de NF- κ B e I κ B- β en riñón. Estos resultados sugieren que el consumo de frijol controla los niveles de glucosa en ratas de etapas iniciales, mientras que en etapas avanzadas, disminuye el daño renal relacionado con un estado inflamatorio presente en la diabetes.

Palabras clave: Diabetes, *Phaseolus vulgaris* L., daño renal, citocinas, NF- κ B.

SUMMARY

Reactive oxygen species (ROS) produced in diabetes increase the production of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukine (IL-6), which activate the nuclear transcription factor κ B (NF- κ B), regulating the expression of proteins related to renal damage characteristic in diabetes. However, ROS can be inactivated by the enzyme glutathione-S-transferase (GST) by conjugation with reduced glutathione (GSH). These mechanisms can be regulated by antioxidant compounds present in several food items, such as beans. Several studies have demonstrated the antioxidant and hypoglycemic properties of common beans; however, little is known about its effect on renal damage. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on proinflammatory cytokines involved in renal damage in diabetic rats. Determinations of condensed tannins, anthocyanins, total phenols as well as antioxidant capacity of cooked bean flours showed higher values (4, 1.5, 8, 1.2-fold, respectively) for Negro 8025 (N) compared to Pinto Durango (PD) bean. For the *in vivo* studies, animals for early stage (\approx 250 mg/dl glucose) and advanced stage of diabetes ($>$ 300 mg/dl glucose) were chemically induced with streptozotocin (45 and 55 mg/kg BW, respectively) and the animals were fed with PD and N flour cooked bean (3, 12.5, 25 and 50 % w/w) incorporated into the diet. Fasting blood glucose levels were determined every week. At the end of the experiment, protein and albumin concentration in urine and lipid profile (cholesterol, total triglycerides, HDL and LDL) were determined, as well as serum TNF- α and IL-6. Common bean consumption produced a hypoglycemic and hypolipidemic effects in early stage of the diabetic rats. Although a hypoglycemic effect was not observed, diabetic rats in advanced stage of the diabetes showed lower levels of damage renal markers such as urinary protein and albumin, as well as serum total cholesterol, LDL, TNF- α and IL-6. Furthermore, common beans induced GSH content and GST enzyme activity, which might regulate NF- κ B and I κ B- β expression in kidney. These results suggest that consumption of common beans controls both blood glucose and lipids levels in early stage of the diabetes, whereas in advanced stages of the diabetes decreases renal damage related to an inflammatory process.

Keywords: Diabetes, *Phaseolus vulgaris* L., renal damage, cytokines, NF- κ B.

Dedicatorias

A Dios por permitirme subir un escalón más en mi vida, darme salud, paciencia sobre todo a una gran familia.

A mi hermano Yunnan Rodrigo y a mi tía Alejandra Soria, por que se que desde allá en el cielo son como dos ángeles que me cuidan, por darme esa fortaleza siempre y por que sin su ejemplo de vida no hubiera llegado hasta aquí.

A mi madre por su apoyo incondicional en todo momento, por respetar mis decisiones, por enseñarme a no desistir y seguir luchando por enseñarme a saber que si las cosas que valen la pena se hicieran fácilmente, cualquiera las haría, por ser siempre fuerte y luchar ante toda adversidad, darme estudio y ser mi madre y padre a la vez, por ser mi amiga, consejera, compañera y sobre todo por estar a mi lado, la quiero mucho.

A mis hermanos Alejandro y Andrés, mis dos pilares, por quererme tanto, por ser mis amigos y regañarme cuando estoy mal y sobre todo por apoyarme en todo momento, gracias por estar conmigo.

A toda mi familia, a mis pochochochas Camila y Valeria, a mis tías Olga y Brenda por apoyarme cuando decidí venir a Querétaro, a mis tíos Chuy, Robe por aun en la distancia apoyarme, a mi tío Javier por apoyarme a seguir con mis estudios, a mis primos y primas brenda, diana, chepe, chuyo, tito, liz, karla, alejandrito.

Agradecimientos

Al H. Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de posgrado.

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 proyecto.

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

A mis sinodales, Dr. Luis Miguel Salgado, Dr. Horacio Guzmán, Dra. Guadalupe Loarca, Dra. Minerva Ramos, por las aportaciones a esta tesis.

A la Dra. Rosalía Reynoso, por darme el apoyo personal y profesional y que a pesar de sus ocupaciones se dio un espacio para ayudarme a tomar decisiones importantes. Gracias por siempre saber que decir en el momento adecuado.

A la Dra. Minerva Ramos por siempre estar dispuesta a cualquier ayuda tanto técnica como personal, por ser una amiga y compañera de fiestas (bodas) y las que nos faltan.

A Lorenzo por que sin sus "las pase a molestar" los días no hubieran sido los mismos, por escuchar y comerse mis galletas. A los compañeros de laboratorios de Toxi, Gely, Haydé, Raquel, Rocío, Joel, Elisa, por siempre estar dispuestos a ayudar.

A todos mis compañeros de laboratorio de Bioquímica molecular, los que están y los que ya no están (trabajando obviamente) a los nuevos y a los viejos, Cipa, Karla A., Irais, Flor, Karla V., a mi alumna, perdón ex-alumna Ariadna, Magda, a

Iván, angélica (mi mayor) y germán (tenía que ser libra) que son mis compañeros de travesuras y de sacrificios, gracias por hacer que ir al laboratorio valga la pena. A cris y ros, por sus sabios consejos, yanet y eli, muy buenas compañeras y por supuesto a paola que sin ella el laboratorio y el bioterio nunca hubieran sido lo mismo, por siempre hacernos reír y ser una buena compañera.

A todos mis compañeros de generación, en especial al Marcelo “tiburoncín”, por siempre tener una palabra que te alegra el día, a Nestor por ayudarme a moler mi frijol, muchas gracias, a Lupita platina por llevarme a molerlo y ser compañera de casa, a paola “la loca 2” nuevamente, a Julián, por ser mi compañero de comidas y de charlas interminables, a todos por ser unos excelentes amigos, a mi paisana tania “la china” a mary, a todos.

A mariana muchas gracias por tu amistad, a lupillo, don vic, benjamín.

A todos los que olvidé, por que se que me perdonarán por que saben que soy como Dori y que tengo memoria de corto plazo, muchas gracias.

A mis dos mamás Consuelo y Alejandra, por ser mi ejemplo a seguir, por guiarme y dejarme cometer mis propios errores, por que son dos mujeres fuertes y dejan en mi una gran enseñanza por que por ellas dos mi vida es mas feliz cada día y se que aun en la distancia siempre están conmigo.

TODO ESFUERZO TIENE SU RECOMPENSA

(Sabias palabras de mi madre)

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Diabetes mellitus	4
2.1.1 Definición	4
2.1.2 Clasificación	4
2.1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1	4
2.1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2	5
2.1.3 Diagnóstico	6
2.1.4 Causas	7
2.2 Insulina	7
2.2.1 Efecto de la insulina sobre el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas	7
2.3 Complicaciones de la diabetes mellitus	8
2.4 Diabetes y estrés oxidativo	10
2.4.1 Mecanismo de defensa celular antioxidante	13
2.5 Citocinas proinflamatorias y su relación con complicaciones de la diabetes mellitus	14
2.5.1 TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa)	15
2.5.2 NF- κ B (factor de transcripción nuclear κ B)	17
2.6 Dieta y diabetes mellitus	18
2.7 Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	19
2.7.1 Composición química	19
2.8 Capacidad nutracéutica del frijol	20
2.9 Frijol y su capacidad hipoglucemiante y antioxidante	20
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24

5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos	24
6. METODOLOGÍA	25
6.1 Materiales	23
6.1.1 Material biológico	25
6.1.2 Material químico	25
6.2 Métodos	26
6.2.1 Elaboración de harinas de frijol cocido	26
6.2.2 Extracción de compuestos fenólicos	26
6.2.3 Cuantificación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante	27
6.2.3.1 Cuantificación de fenoles totales	27
6.2.3.2 Cuantificación de taninos condensados	27
6.2.3.3 Cuantificación de antocianinas	28
6.2.3.4 Determinación de la capacidad antioxidante del frijol empleando la técnica de ABTS	28
6.2.4 Inducción de diabetes	29
6.2.5 Determinación de glucosa	30
6.2.6 Grupos de estudio	30
6.2.7 Determinaciones semanales	31
6.2.8 Sacrificio y obtención de muestra	32
6.2.9 Evaluación del efecto de frijol cocido sobre daño renal en ratas diabéticas	32
6.2.9.1 Determinación de perfil de lípidos en suero	32
6.2.9.2 Cuantificación de IL-6 y TNF- α en suero	32
6.2.9.3 Determinación de glucosa, proteína y microalbúmina en la orina	34
6.2.9.4 Determinación de sodio y potasio en la orina	34
6.2.9.5 Determinación de la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en riñón	35

6.2.9.6 Determinación del factor glutatión reducido (GSH) en riñón	35
6.2.9.7 Evaluación de la actividad del factor de transcripción nuclear (NF- κ B) y la expresión e I κ B- β	36
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES	38
8.1 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las harinas de frijol cocido	38
8.2 Evaluación del efecto del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) en etapas iniciales y avanzadas de la diabetes	41
8.2.1 Efecto del consumo de frijol sobre los niveles de glucosa en sangre de ratas Wistar diabéticas	41
8.2.2 Efecto del consumo de frijol sobre el peso corporal de ratas Wistar diabéticas	44
8.2.3 Efecto del consumo de frijol sobre el agua consumida en ratas Wistar sanas y diabéticas	46
8.2.4 Efecto del consumo de frijol sobre la ingesta de alimento en ratas Wistar sanas y diabéticas	48
8.2.5 Efecto del consumo de frijol sobre el perfil de lípidos en ratas Wistar sanas y diabéticas	50
8.2.6 Efecto del consumo de frijol sobre el peso relativo de los riñones en ratas Wistar sanas y diabéticas	55
8.2.7 Efecto del consumo de frijol sobre la concentración de glucosa en la orina de ratas Wistar sanas y diabéticas	57
8.2.8 Efecto del consumo de frijol sobre la concentración de albúmina en la orina de ratas Wistar sanas y diabéticas	58
8.2.9 Efecto del consumo de frijol sobre la concentración de proteína en la orina de ratas Wistar diabéticas	61
8.2.10 Efecto del consumo de frijol sobre los niveles de sodio y potasio en la orina de ratas Wistar diabéticas	63

8.2.11 Efecto del consumo de frijol sobre los niveles de IL-6 y TNF- α en suero de ratas Wistar diabéticas	64
8.2.12 Efecto del consumo de frijol sobre glutatión-S-transferasa y glutatión reducido en riñón de ratas Wistar diabéticas en etapa avanzada	66
8.2.13 Efecto del consumo de frijol sobre la expresión de NF-kB citosólica y nuclear en riñón de ratas Wistar diabéticas	69
8.2.14 Efecto del consumo de frijol sobre la expresión de I κ B- β en riñón de ratas Wistar diabéticas en etapas avanzadas	72
9. CONCLUSIONES	74
10. BIBLIOGRAFÍA	76
11. ANEXOS	88

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Diferencias entre la diabetes mellitus tipo 1 y 2	6
2	Grupos experimentales para la evaluación del consumo de frijol sobre el control de la diabetes en su etapa inicial	31
3	Grupos experimentales para la evaluación del consumo de frijol sobre el control de la diabetes en su etapa avanzada	31
4	Concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las harinas de frijol cocido	39
5	Concentración del perfil de lípidos en suero de ratas sanas y diabéticas (etapa inicial) alimentadas con diferentes concentraciones de frijol	52
6	Concentración del perfil de lípidos en suero de ratas diabéticas (etapa avanzada) alimentadas con diferentes concentraciones de frijol	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Posibles mecanismos inducidos por la hiperglicemia, debido a la elevada producción de iones superóxido por la mitocondria	12
2	Mecanismo de acción de los AGEs relacionado con altas concentraciones de glucosa sanguínea	12
3	Generación de especies reactivas en la diabetes	14
4	Activación del factor NF- κ B por diferentes agentes y modulación de la expresión de diferentes genes blanco	17
5	Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre la concentración de glucosa en sangre de ratas diabéticas en a) etapas iniciales y b) avanzadas de la enfermedad	43
6	Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre el peso corporal de ratas diabéticas en a) etapas iniciales y b) avanzadas de la enfermedad	45
7	Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre la ingesta de agua de ratas sanas y diabéticas en a) etapas iniciales y b) avanzadas de la enfermedad	47

8	Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre la ingesta de alimento de ratas sanas y diabéticas en a) etapas iniciales y b) avanzadas de la enfermedad	49
9	Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre el peso relativo de riñones de ratas sanas y diabéticas en a) etapas iniciales y b) avanzadas de la enfermedad	56
10	Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre los niveles de glucosa en orina de ratas sanas y diabéticas en a) etapas iniciales y b) avanzadas de la enfermedad	58
11	Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre los niveles de albúmina en orina de ratas sanas y diabéticas en a) etapas iniciales y b) avanzadas de la enfermedad	60
12	Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre los niveles de proteína en orina de ratas diabéticas en etapa avanzada	62
13	Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre los niveles de sodio y potasio en orina de ratas diabéticas en etapa avanzada	63
14	Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre los niveles de IL-6 y TNF- α en suero de ratas diabéticas en etapas avanzadas	65

15	Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre la actividad de GST en riñón de ratas diabéticas en etapas avanzadas	68
16	Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre la concentración de GSH en riñón de ratas diabéticas en etapas avanzadas	69
17	Efecto del consumo de dos variedades frijol cocido a diferentes concentraciones incorporado a la dieta sobre la expresión de NF- κ B en el núcleo y citoplasma de riñón de ratas diabéticas en etapas avanzadas	71
18	Efecto del consumo de dos variedades frijol cocido a diferentes concentraciones incorporado a la dieta sobre la expresión de IK- κ β en riñón de ratas diabéticas en etapas avanzadas	73

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y el cáncer, constituyen serios problemas de morbimortalidad en el país. Entre las enfermedades crónicas degenerativas, la diabetes mellitus muestra el ascenso más importante en los últimos años (Secretaría de Salud, 2004).

La diabetes y las complicaciones propias de la enfermedad están consideradas como una de las principales causas de mortalidad en México (Rivera y col., 2004; Secretaría de Salud, 2004). Actualmente existen entre 6 y 10 millones de diabéticos (con una prevalencia nacional de 10.7 % en personas entre 20 y 69 años) (Aguilar-Salinas y col., 2003; Rull y col., 2005; Ávila-Curiel y col., 2007).

Las complicaciones de la diabetes, principalmente la nefropatía y las enfermedades cardiovasculares, disminuyen notablemente la calidad de vida de los enfermos y generan un problema muy grande de salud pública. Los costos asociados con sus tratamientos se han incrementado de forma alarmante, pero también la incapacidad progresiva de los individuos afectados representan una sobrecarga para los sistemas de salud, sobre todo al considerar que el 40 % de las personas que padecen esta enfermedad son menores de 40 años (Arredondo y col., 2005).

La generación de las complicaciones de la diabetes está estrechamente relacionada con un incremento de estrés oxidativo. En años recientes se ha propuesto que la hiperglicemia producida en la diabetes genera un incremento de radicales libres, por ejemplo, las especies reactivas del oxígeno (ROS) en algunas células como los macrófagos, células endoteliales (vasos sanguíneos) y tejido adiposo. Esto conlleva a un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6), entre otras. Dichas citocinas a su vez activan al factor de transcripción κ B (NF- κ B), que se encuentra secuestrado por la proteína inhibitoria I κ B- α en el

citosol de células mesangiales (riñón) y en las mismas células endoteliales. Al ser activado se transloca al núcleo para regular la expresión de un gran número de genes, incluyendo a las mismas citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión (ICAM, VCAM y selectina P), factores de crecimiento (TGF- β), generando así, el daño relacionado con las complicaciones propias de la enfermedad.

Por otra parte, se sabe que TNF- α altera la acción de la insulina en tejido adiposo, probablemente a través de una disminución en la actividad del receptor a insulina. Por lo cual, se considera que la hiperglicemia y el estrés oxidativo juegan un papel importante en la diabetes y en sus complicaciones. Por lo tanto, en los últimos años se ha recomendado que el tratamiento más eficaz para el paciente diabético es aquel que incluye fármacos hipoglucemiantes y compuestos antioxidantes (Escobedo-de la Peña y Rico-Verdín, 1996; Brownlee, 2001; Evans y col., 2002; Flores y col., 2005).

Se ha reportado que ciertas poblaciones, entre las cuales se encuentra la de México, muestran una fuerte predisposición genética al desarrollo de la diabetes (Hayes y col., 2007). Sin embargo, éste no es el único parámetro del cual depende la presencia de la enfermedad, ya que existen estudios que demuestran que la diabetes resulta de la interacción de la susceptibilidad genética y el estilo de vida (Schulz y col., 2006). Las causas más importantes relacionadas con el estilo de vida son la obesidad, la inactividad física y la nutrición (Aguilar-Salinas y col., 2003; Monteiro y col., 2005).

Con respecto a la dieta, estudios epidemiológicos han reportado que poblaciones que consumen dietas mediterráneas tienen una menor incidencia de enfermedades crónico degenerativas (Wahle y col., 2004). Estas propiedades se han relacionado con alimentos que contienen compuestos fenólicos y ácido graso omega 3, entre otros. Por lo tanto, patrones dietarios tradicionales pueden ayudar a reducir el riesgo de obesidad, diabetes y sus complicaciones, debido a un adecuado balance de calorías y una ingesta recomendable de fitoquímicos.

En la dieta mexicana existen una serie de alimentos que han sido recomendados para el control de la diabetes, tal es el caso del frijol, el cual es una de las leguminosas más importantes para la población (Paredes López y Valverde, 2006). El consumo de frijol ha recibido recientemente mayor interés, ya que se considera como un alimento nutracéutico (Cavallé de Moya y col., 2003). Los efectos fisiológicos por el consumo de frijol pueden deberse a la presencia de fitoquímicos, tales como, compuestos fenólicos (taninos condensados, flavonoides y antocianinas), fibra, lectinas, ácidos grasos insaturados, ácido fítico, polisacáridos, inhibidores de tripsina, entre otros (Adams y Strandidge, 2006).

El efecto hipoglucemiante del frijol se ha demostrado en estudios realizados con conejos y con ratones diabéticos a los cuales se les administró independientemente un extracto acuoso y etanólico de *Phaseolus vulgaris*, observándose una disminución del pico hiperglicémico y produciendo de manera adicional un incremento en la expresión de enzimas antioxidantes (Roman-Ramos y col., 1995; Petlevski y col., 2001; Subramanian y Leelavinothan, 2002). En base a lo anterior, se sugiere que el frijol presenta capacidad hipoglucemiante y antioxidante.

A pesar de ello, existe una variación importante de su consumo como consecuencia del urbanismo, cambio de los hábitos alimenticios, la migración y el empleo, principalmente (www.siap.sagarpa.gob.mx/cadenas/frijol/demanda.pdf, 2003). Por lo tanto, en este estudio se evaluó el efecto del consumo de frijol cocido (*Phaseolus vulgaris* L.): Pinto Durango y Negro 8025, incorporado en la dieta a diferentes concentraciones, sobre citocinas proinflamatorias relacionadas con el daño renal en ratas diabéticas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Diabetes mellitus

2.1.1 Definición

La diabetes mellitus es un síndrome que manifiesta un trastorno metabólico que cursa con hiperglicemia, es decir, un incremento persistente en los niveles basales de glucosa (≥ 126 mg/dl ml ó 7.0 mmol/l), la que a su vez es consecuencia de una deficiencia en la secreción de insulina o en el efecto biológico de la misma (Ramos, 1994). La diabetes mellitus es una enfermedad crónica y degenerativa que incapacita al cuerpo para metabolizar o usar eficazmente los carbohidratos, las proteínas y las grasas (Islas y Revilla, 2005). Desde el punto de vista epidemiológico, la frecuencia, prevalencia y mortalidad de la diabetes señalan con claridad que se trata de un problema de salud pública (Ramos-Rodríguez y Domingo-Méndez, 1994).

2.1.2 Clasificación

2.1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1, también es conocida como diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) o diabetes juvenil.

En la diabetes mellitus tipo 1, el páncreas no produce insulina, como resultado de la destrucción auto-inmune de las células β pancreáticas, lo que se traduce en un déficit absoluto de insulina y dependencia vital a la insulina exógena. Por lo tanto, la glucosa no puede ser incorporada a ciertas células y se acumula en el torrente sanguíneo elevando el valor de la glicemia (Guía Mexicana de Diabetes, 2005).

2.1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes tipo 2 es la más prevalente y es también llamada diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID).

En la diabetes mellitus tipo 2, aun cuando se secreta insulina, esta hormona no funciona adecuadamente, por lo tanto la glucosa no puede ingresar a los órganos que dependen de insulina para el ingreso de la glucosa (tejido adiposo y muscular) por lo que se acumula en el torrente sanguíneo elevando el nivel de la glicemia (Guía Mexicana de Diabetes, 2005).

El riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 incrementa con la edad, obesidad y la falta de la actividad física, ocurre frecuentemente en individuos con hipertensión o dislipidemia, y varía en diferentes subgrupos raciales/étnicos, por lo que está asociada con una fuerte predisposición genética (The Expert Committee, 2002).

En etapas avanzadas, la diabetes tipo 2 se asocia con un aumento en el deterioro de las células β pancreáticas (Bennett y Knowler, 2001) y a largo plazo el paciente con diabetes tipo 2 podría presentar características clínicas similares a la diabetes tipo 1.

Algunas manifestaciones y síntomas más importantes del padecimiento para ambos tipos de diabetes son: poliuria (excreción excesiva de orina), polidipsia (sed excesiva), pérdida de peso, algunas veces polifagia (ingestión excesiva de alimentos), visión borrosa, disminución de la fuerza muscular, con menor frecuencia somnolencia, cefalea, entre otros (Braunwald y col., 1998).

Por otro lado, existen diferencias entre las diabetes mellitus tipo 1 y 2, algunas de las cuales se mencionan en el cuadro 1 (Guyton, 1999).

Cuadro 1. Diferencias entre la diabetes mellitus tipo 1 y 2

	DEPENDIENTE DE INSULINA (TIPO 1)	NO DEPENDIENTE DE INSULINA (TIPO 2)
Edad de inicio	Antes de los 40 años	Después de los 40 años
Inicio de síntomas	Aguda o subaguda	Lenta
Obesidad	Rara	Común
Insulina	Disminuida o no existe	Variable
Receptores de insulina	Normales	Variable
Remisión clínica	Breve después del tratamiento	Puede ser prolongada
Objetivo de la dieta	Sincronizar la dosis de insulina y la dieta	Reducción de peso, mantener los niveles de glucosa normal y evitar síntomas

(Guyton, 1999)

2.1.3 Diagnóstico

La mayoría de las veces la diabetes puede ser una enfermedad asintomática, pero una vez manifestada la sintomatología clásica del padecimiento, el diagnóstico es relativamente simple en más del 90 % de los casos. Sin embargo, para establecer el diagnóstico de diabetes mellitus en su fase clínica, es indispensable detectar hiperglicemia en ayunas, o bien postprandial, así como glucosa en la orina (Islas y Revilla, 2005).

La evolución clínica de la diabetes mellitus varía con el individuo y, en gran medida, depende del tiempo en que se establezca el diagnóstico y se proporcione al paciente el manejo integral del padecimiento (Arreola y Partida, 2005).

El Comité de Expertos en el Diagnóstico y Clasificación de Diabetes recomendó el uso de la glucosa plasmática en ayunas como prueba para el diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2. Dicho comité propuso disminuir los niveles de detección de >140 mg/100 ml (7.8 mmol/l) a >126 mg/100 ml (7.0 mmol/l). Este

cambio se basó en la elevada incidencia y prevalencia de retinopatía diabética que inicia con estas cifras (Islas-Andrade, 2005).

2.1.4 Causas

Los factores relacionados con la ocurrencia de diabetes son aquellos que incrementan (factores de riesgo) o reducen su presencia, En la diabetes, los principales factores de riesgo tienen que ver con la carga genética y con los estilos de vida, por lo tanto, el riesgo genético es necesario pero no suficiente para desarrollar diabetes. Una dieta rica en grasas saturadas y en azúcares simples, así como, el sedentarismo, son condiciones que caracterizan a la población moderna y que se relacionan estrechamente con la presencia de diabetes (Escobedo de la Peña, 2005).

Se ha calculado que más del 90 % de los casos de diabetes pueden atribuirse a estilos de vida de alto riesgo, de forma tal que la mayoría de los casos de diabetes son potencialmente prevenibles. La diabetes también se asocia con la obesidad y la hipertensión arterial (Escobedo de la Peña, 2005).

2.2 Insulina

2.2.1 Efecto de la insulina sobre el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas

La insulina desempeña un papel importante en el almacenaje de combustibles como el glucógeno y los triglicéridos e inhibe la degradación de estos; estimula la síntesis e inhibe la degradación de proteínas. Así mismo, ejerce una acción directa, positiva o negativa, sobre la expresión de ciertos genes, estimulando las señales de transducción al unirse con su receptor (Flores y col., 2005).

La insulina produce una disminución de la glucosa disponible, mediante tres acciones básicas: a) estimula la formación de glucógeno al inducir la vía metabólica de la glucogénesis por acción sobre la enzima glucógeno sintetasa b) inhibe la gluconeogénesis y c) promueve el aumento del consumo de glucosa en los tejidos periféricos, como músculos y adipositos. Como resultado de este proceso se favorece la disminución de ácidos grasos libres circulantes, a consecuencia de cuatro mecanismos: a) inducción de la lipogénesis, b) inhibición de la lipólisis, c) disminución de la cetogénesis y d) disminución de la acidosis. Además, se reduce la cantidad de aminoácidos circulantes, mediante cuatro acciones: a) aumento del transporte activo de aminoácidos, b) aumento del anabolismo de proteínas, c) inhibición del catabolismo de proteínas, especialmente en los músculos y d) disminución de la oxidación de aminoácidos (Mathews y Van Holde, 2002).

2.3 Complicaciones de la diabetes mellitus

Los niveles elevados de glucosa (hiperglicemia), que caracterizan a la diabetes, eventualmente generan una serie de complicaciones, que de no ser tratadas, provocan la muerte (Reusch, 2003). Dentro de las complicaciones más comunes en la diabetes mellitus se encuentran las siguientes.

1) Macro-vasculares:

a) Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad en la cual las paredes de los las arterias se hacen más gruesas y duras. En un tipo de aterosclerosis, la grasa se acumula en el interior de las arterias y hace más lento el flujo de sangre y afecta la irrigación en distintos tejidos y órganos, provocando infarto al miocardio, apoplejía o amputación de alguna extremidad en el paciente (Wei y col., 1998).

Dicha complicación vascular representa la causa directa de muerte en más del 50 % de los pacientes diabéticos, ya que favorece lesiones vasculares miocárdicas, cerebrales, renales y la aparición de isquemia a nivel de miembros inferiores, que promueven la aparición de infecciones secundarias y gangrena (Wei y col., 1998; Eknoyan, 2007).

2) Micro-vasculares:

b) Retinopatía diabética

La retinopatía diabética es una complicación ocular, causada por el deterioro de los vasos sanguíneos que irrigan la retina del ojo. Estos vasos sanguíneos debilitados pueden dejar salir líquido o sangre, formar ramas frágiles en forma de cepillo y agrandarse en ciertos lugares. Cuando la sangre o el líquido de los vasos lesionan o forman tejidos fibrosos en la retina, la imagen enviada al cerebro se hace borrosa, si esta alteración no es tratada, puede causar ceguera.

c) Neuropatía diabética

La neuropatía diabética es una complicación común de la diabetes, en la cual se presenta daño a los nervios como resultado de una hiperglicemia o por la disminución del flujo sanguíneo, el cual puede ser temporal o permanente. La neuropatía puede afectar nervios craneales o de la columna vertebral y sus ramificaciones tienden a desarrollarse por etapas (Ginsberg, 2000).

d) Nefropatía diabética

La nefropatía es una enfermedad secundaria de la diabetes en la cual el riñón pierde la capacidad para funcionar apropiadamente. Esta condición se caracteriza por los niveles elevados de albúmina y presencia de proteína en la orina. La nefropatía diabética es la causa más común de insuficiencia renal crónica (Atlas de la diabetes, 2002). La microalbúmina es un poderoso predictor de riesgo renal, así como también un marcador de daño glomerular y considerado como un marcador de nefropatía progresiva. Niveles elevados de albúmina en la

orina aumentan progresivamente el riesgo de desarrollar macroalbuminuria y de presentar eventos cardiovasculares. Por lo que la disminución de la albúmina en orina no solamente protege al riñón, también al sistema cardiovascular (Wiseman y col, 1985; Userpater y col., 2004).

La nefropatía diabética es una de las complicaciones crónicas más graves y más frecuentemente observada en los pacientes con diabetes tipo 2. Dicha alteración es una de las principales causas de mortalidad por diabetes (Aguilar y col., 2000).

La mortalidad en pacientes diabéticos con nefropatía es de 20-40 veces mayor que en pacientes sin nefropatía. Se desarrolla en aproximadamente 40 % de los pacientes con diabetes tipo 2, particularmente cuando se presenta descontrol metabólico crónico, además de historia familiar de nefropatía diabética o de hipertensión arterial (Aguilar y col., 2000).

Estudios controlados demuestran que mantener niveles adecuados de glucosa retarda el inicio y disminuye la progresión de las secuelas de la diabetes mellitus. Sin embargo, el deterioro progresivo de la función renal no depende únicamente del control de la glicemia, ya que otros factores contribuyen en las manifestaciones de esta compleja patología que presenta cambios hemodámicos, metabólicos y estructurales como por ejemplo, las citocinas, los factores de crecimiento, los factores genéticos, el óxido nítrico, radicales de O₂, las lipoproteínas de baja densidad glicosiladas, entre otros (Vázquez y col., 2005).

2.4 Diabetes y estrés oxidativo

Estudios clínicos han demostrado que existe una relación estrecha entre la hiperglicemia y las complicaciones micro y macro-vasculares de la diabetes tanto en el tipo 1 como en el tipo 2. El estrés oxidativo, resultado de un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) o de su inadecuada

eliminación, juega un papel importante en la patogénesis de las complicaciones de la diabetes mellitus. Se han propuesto diversos mecanismos para explicar los efectos patológicos de la diabetes en los cuales la mayor parte de éstos se atribuyen a los niveles elevados y persistentes de glucosa (Evans y col., 2002).

El incremento de los radicales libres, producidos por la hiperglicemia, inhibe a la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa que participa en la vía de la glucólisis. Este aumento conlleva a una acumulación de metabolitos río arriba de esta enzima, los cuales activan otras vías metabólicas: a) vía de los azúcares polihidroxilados, b) vía de la hexosamina, c) producción de diacilglicerol (DAG), el cual a su vez activa a la proteína cinasa C (PKC), y d) síntesis de productos de glicosilación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés), los cuales también estimulan a PKC. Por lo tanto, tratamientos que inhiben la actividad de la PKC mejoran la nefropatía diabética (Figura 1) (Brownlee, 2001; Evans y col., 2002; Schultz y col., 2005; Yamagishi y col., 2007; Aronson, 2008).

La activación de PKC se ha relacionado con cambios funcionales de las células endoteliales vasculares mediante la activación de factores de transcripción (NF- κ B) y por alteraciones en la expresión de ciertas proteínas membranales como la fibronectina. Así mismo, los AGEs producidos por células endoteliales se unen a los receptores AGE (RAGE) de las mismas células endoteliales, células mesangiales, glomerulares y macrófagos, generando especies reactivas de oxígeno (ROS) y activando NF- κ B, para la expresión de genes, principalmente de algunas citocinas, los cuales son mediadores importantes de la inflamación (Brownlee, 2001) (Figura 2).

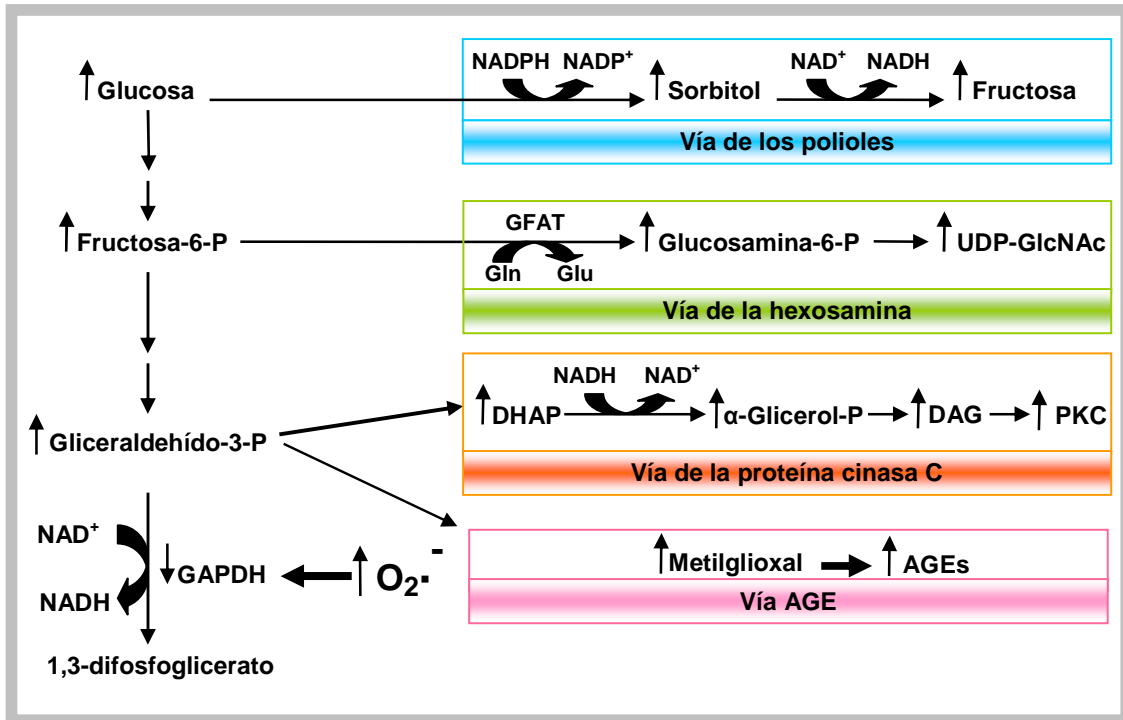


Figura 1. Posibles mecanismos inducidos por la hiperglicemia, debido a la elevada producción de iones superóxido por la mitocondria (Brownlee, 2001).

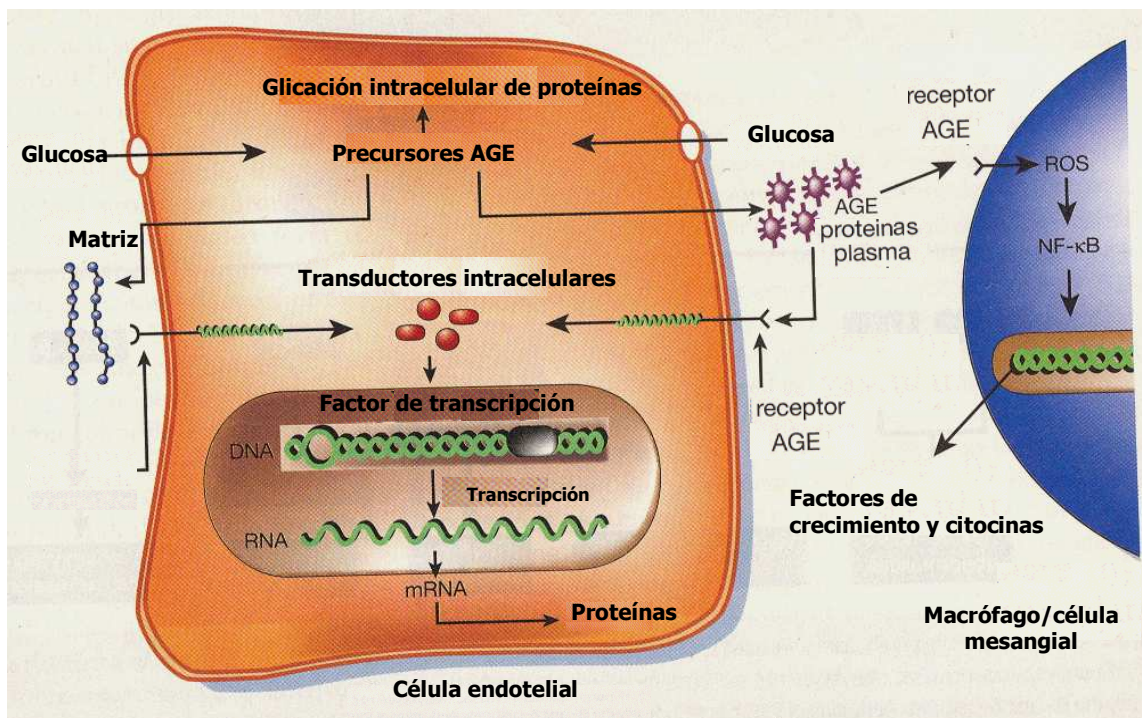


Figura 2. Mecanismo de acción de los AGEs relacionado con altas concentraciones de glucosa sanguínea (Brownlee, 2001).

2.4.1 Mecanismo de defensa celular antioxidante

El estrés oxidativo es controlado por mecanismos de defensa celular, que consisten en sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Los niveles de estos mecanismos de defensa antioxidante, se ven alterados en la diabetes, además, ineficiente eliminación de los radicales libres juega un papel importante en el daño a tejidos (Figura 3) (Schulz y col., 2005).

Los sistemas antioxidantes endógenos mas importantes son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx). El sistema del glutatión esta constituido por el glutatión reducido (GSH) y por la actividad de la enzima glutatión reductasa que se encarga de reducir sistemáticamente al glutatión oxidado, así mismo, la transferrina y la ceruloplasmina se consideran proteínas antioxidantes. Como antioxidantes exógenos se tienen a las vitaminas A, C y E y algunos metales como el cobre y el selenio, este último al actuar como cofactor de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) (Willcox y col., 2004).

La enzima glutatión-S-transferasa (GST) y el cofactor GSH son considerados unas de las principales defensas del organismo contra el estrés oxidativo. Sin embargo, en la diabetes dichos parámetros se ven severamente afectados, ya que disminuyen sus niveles tanto en suero como en órganos (Young y col., 2001). Por lo que, una disminución del estrés oxidativo, a través del tratamiento con antioxidantes, actuando como inductores de enzimas antioxidante, puede ser una estrategia efectiva para reducir las complicaciones de la diabetes (Schultz y col., 2005).

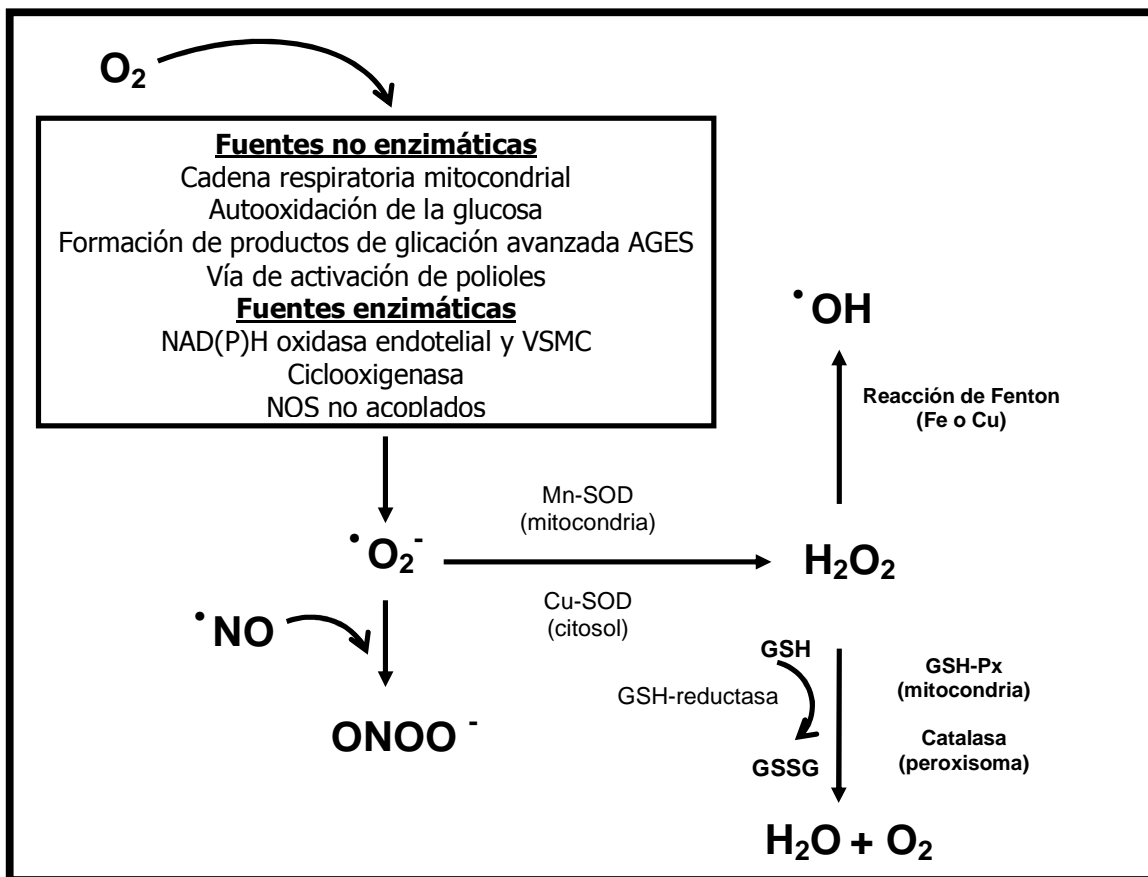


Figura 3. Generación de especies reactivas en la diabetes (Schultz y col., 2005).

2.5 Citocinas proinflamatorias y su relación con complicaciones de la diabetes mellitus

Las citocinas son polipéptidos producidas por una variedad de células como los macrófagos y los monocitos durante el proceso inflamatorio, los cuales sintetizan de manera importante interleucinas, TNF- α , interferón gamma, TGF- β , entre otros (Muntaner y col., 1999).

Las citocinas y los factores de crecimiento se han implicado como agentes que contribuyen a los cambios estructurales, metabólicos y de la hemodinámica renal que se observa en la diabetes mellitus (Vázquez y col., 2005). Así mismo, las citocinas incrementan el estado de coagulación, disminuyen la lipoproteína de alta

densidad (HDL) y elevan los valores de triglicéridos y el colesterol total, parámetros relacionados con la aterosclerosis (Muntaner y col., 1999).

En los últimos años se ha sugerido que el proceso de inflamación crónica, es importante en la patología y las complicaciones de la diabetes. A este respecto es importante resaltar el hecho de que las enfermedades crónicas contienen un elemento común, que es la inflamación, la cual en algunas ocasiones se presenta antes de que la enfermedad sea clínicamente diagnosticada (Hwang y col., 2008). De tal forma que, la producción de citocinas desencadenada por un proceso de inflamación crónico leve ejerce un efecto deletéreo sobre la acción periférica de la insulina y contribuye o es parcialmente la causa del desarrollo de algunas de las complicaciones asociadas con la diabetes, como la aterosclerosis acelerada y nefropatía diabética (Rodríguez y Guerrero, 2005).

Se ha demostrado que una vez desarrollada la enfermedad, la elevación crónica de los niveles de glucosa en el organismo genera radicales libres, los cuales influyen sobre las complicaciones de la diabetes. El desarrollo y la prueba de esta hipótesis ha ido a la par con la demostración que citocinas como el TNF- α , IL-1 e IL-6 tienen un papel relevante en el desarrollo de la retinopatía, la nefropatía y la aterosclerosis, entre otras complicaciones, mientras que la IL-10 es una citocina antiinflamatoria que regula en proceso de inflamación y puede contrarrestar dicho efecto (Popa y col., 2007).

2.5.1 TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa)

TNF- α es un miembro de la creciente familia de péptidos mediadores, los cuales comprenden por lo menos 19 citocinas (Popa y col., 2007). TNF- α está involucrada en diferentes vías de señalización con dos respuestas celulares bien establecidas, la inducción de la muerte celular y la activación de transcripción génica para la sobrevivencia celular. Esta citocina es producida por diferentes

tipos de células, incluyendo macrófagos, monocitos, células T, adipocitos y fibroblastos (Popa y col., 2007).

Entre los mecanismos de activación de la transcripción génica para sobrevivencia, TNF- α activa el factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Figura 4) y la proteína activadora 1, los cuales inducen la expresión de genes involucrados en la inflamación, el crecimiento celular y la regulación de señales (Flores y col., 2005).

En sujetos con resistencia a la insulina se ha demostrado la expresión de TNF- α en el músculo esquelético; además, esta expresión se encuentra incrementada en sujetos obesos y está relacionada con la elevación de los niveles de insulina. Estos datos sugieren que el TNF- α altera la acción de la insulina, y el mecanismo probable involucra una disminución en la actividad del sustrato del receptor a insulina, por lo cual, se considera que juega un papel patológico importante en la diabetes (Flores y col., 2005; Alexandraki y col., 2006).

Junto con otras citocinas proinflamatorias, TNF- α ha surgido como un factor importante en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas promoviendo la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, la activación de células inflamatorias y la iniciación de la cascada inflamatoria dentro de la pared arterial. Además, se ha demostrado que TNF- α interfiere directamente con las rutas metabólicas de triglicéridos y colesterol (Popa y col., 2007).

En un estudio realizado por Dipetrillo y col. (2003) demostraron que TNF- α está relacionado con la nefropatía diabética, la excreción de esta citocina en la orina precede al desarrollo de la microalbuminuria en un modelo animal. Por otro lado, esta citocina provoca el desplazamiento de células inflamatorias a la estructura microvascular de los riñones, lo cual predispone al desarrollo de la nefropatía diabética (Williams y Nadler, 2007).

Actualmente, se sabe que la gran mayoría de los genes que codifican proteínas clave en la respuesta inflamatoria de la aterosclerosis son modulados por NF- κ B (Sánchez y Kaski, 2001; Evans y col., 2002).

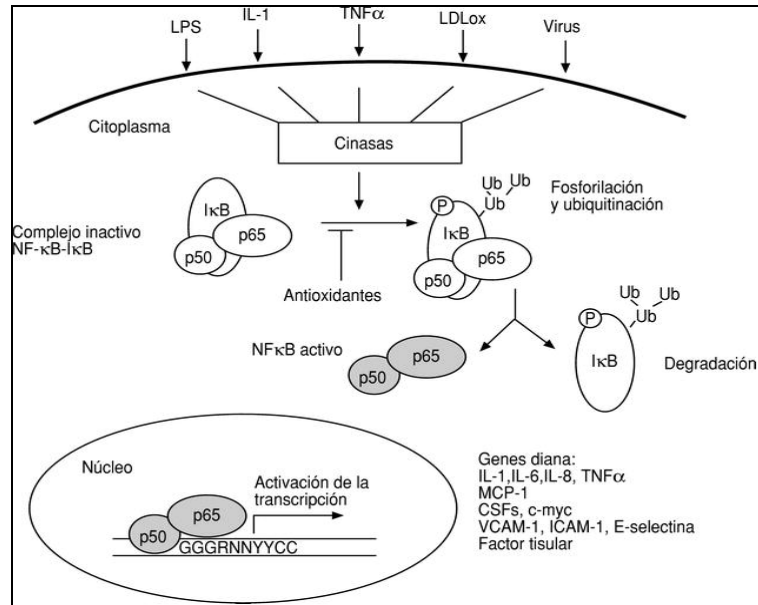


Figura 4. Activación del factor NF- κ B por diferentes agentes y modulación de la expresión de diferentes genes blanco (Martínez-González y col., 2001). LPS=lipopolisacáridos, IL-1= interleucina 1, IL-8= interleucina 8, LDL-ox= Lipoproteína de baja densidad oxidada, MCP-1=proteína quimiotáctica de monocitos 1, VCAM= molécula de adhesión de células vaculares 1, ICAM, ICAM= molécula de adhesión intercelular 1.

2.5.2 NF- κ B (factor de transcripción nuclear κ B)

NF- κ B es un factor de transcripción que se encuentra en el citoplasma de linfocitos, monocitos, células endoteliales y células musculares lisas y está involucrado en la regulación de genes que participan en el proceso inmunológico y de respuesta inflamatoria. NF- κ B puede ser activado por una amplia gama de estímulos exógenos y endógenos, incluyendo hiperglicemia, ROS, un incremento de ácidos grasos libres, TNF- α , IL-1 β , IL-6 y otras citocinas proinflamatorias (Evans y col., 2002). En la mayoría de los tipos de células, la forma inducible NF- κ B es una heterodímero conformado por dos subunidades p50 y p65; p65 contiene un dominio de activación mientras que p50 tiene una subunidad regulatoria para la

unión al DNA. En el citoplasma, NF- κ B se encuentra unido a la proteína inhibitoria I κ -B α , (Muntaner y col., 1999). Para que NF- κ B se transloque al núcleo requiere que I κ -B α sea fosforilada por IKK, la cual está conformada por dos subunidades IKK α e IKK β y la subunidad regulatoria IKK γ , una vez fosforilada I κ -B α , esta se ubiquitina y se degrada liberando así a NF- κ B (Evans y col., 2002). NF- κ B en el núcleo activa a los mismos genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria, regulando la misma producción de las citocinas proinflamatorias como al propio TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 y moléculas de adhesión ICAM y VCAM (Figura 4) (Muntaner y col., 1999; Flores y col., 2005).

La expresión de moléculas, como las citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento y TGF- β , así como la peroxidación de lípidos, parecen ser la causa de la acumulación de la matriz extracelular en la progresión del daño renal. Además, estudios han demostrado que el desarrollo de diabetes se correlaciona con niveles elevados de activación de NF- κ B en ratones NOD (Egido y col., 2000).

Se ha calculado que más del 90 % de los casos de diabetes pueden atribuirse a estilos de vida de alto riesgo, de forma tal que la mayor parte de los casos de diabetes son potencialmente prevenibles (Escobedo de la Peña, 2005). Por lo tanto, se sugiere que el uso de antioxidantes, encontrados en algunas plantas y frutos con dichas propiedades y con efecto hipoglucemiante, podrían mejorar las complicaciones de la diabetes mellitus.

2.6 Dieta y diabetes mellitus

La dieta tiene un papel fundamental en la prevención y control de la diabetes. Estudios epidemiológicos han demostrado que poblaciones que consumen dietas mediterráneas tienen una menor incidencia de enfermedades crónicas degenerativas (Wahle y col., 2004). Por lo tanto, patrones dietarios tradicionales pueden ayudar a reducir el riesgo de obesidad y diabetes, debido a un adecuado balance de calorías y adecuado consumo de nutrientes. Aunque no

es posible definir una dieta típica para el mexicano, si se puede hablar de algunos alimentos que se encuentran normalmente en las mesas de los mexicanos como son el frijol y el maíz.

2.7 Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) está ampliamente distribuido en el mundo y se consume principalmente en países de Latinoamérica y África. En México, el frijol es un alimento que ha formado parte de la cultura gastronómica desde tiempos prehispánicos (Rodríguez y Fernández, 2003; Paredes López y Valverde, 2006).

Las distintas variedades de frijol se caracterizan por su tamaño, forma, color de su semilla, tipo de crecimiento. Por la preferencia del consumidor, el frijol se clasifica en azufrado, mayocoba, negro, peruano, flor de mayo y flor de junio. La distribución depende de la zona geográfica; en la zona norte de México se consumen las variedades azufradas, mientras que en las zonas centro los rosa moteado y en el sur se consumen principalmente las variedades de frijol negro. Prácticamente cada localidad de México tiene preferencias que varían en color tamaño y brillo del grano (Castellanos, 1997).

2.7.1 Composición química

Dentro de la composición del frijol, los carbohidratos son los componentes mayoritarios; contiene cerca de 55-65 % de peso seco; de esta fracción, la mayor parte son carbohidratos complejos, almidón y fibra dietética, mientras que la fracción de azúcares (mono, di y oligosacáridos), tales como, rafinosa, estaquiosa y verbascosa, es significativamente menor. Aun cuando el contenido en grasa del frijol es bajo (14 %), contiene un alto porcentaje de fosfolípidos que han demostrado tener un potente efecto hipolipemiante, incluso a bajas concentraciones. El frijol es una fuente importante de proteínas, su contenido varía entre 16 y 33 % (Guzmán y Paredes, 1998). El frijol es abundante en aminoácidos

como la lisina; sin embargo, es deficiente en aminoácidos azufrados como triptofano, metionina y cisteína; además aporta vitaminas del complejo B y minerales como el hierro y calcio. También contiene factores antinutricios como los inhibidores de tripsina, ácido fítico, taninos y saponinas que reducen su valor biológico (Sáyago-Ayerdi y col., 2005, Díaz-Batalla y col., 2006). Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que dichos compuestos pueden tener un efecto benéfico a la salud, protegiendo contra ciertas enfermedades crónico-degenerativas (Serrano y Goñi, 2004, Iniestra-González y col., 2005).

2.8 Capacidad nutracéutica del frijol

Un alimento nutracéutico es aquel que tiene el balance apropiado de ingredientes, contiene componentes biológicamente activos, los cuales ayudan a funcionar mejor y más efectivamente al organismo de los seres humanos en varios aspectos, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades (Goldberg, 1994).

En años recientes, el frijol ha recibido mayor atención debido a su carácter nutracéutico, ya que contiene componentes que juegan un papel importante en la prevención de enfermedades crónico degenerativas como la diabetes y el cáncer.

Los efectos fisiológicos producidos por el consumo de frijol se le han atribuido principalmente a la presencia de fitoquímicos, tales como, compuestos fenólicos (taninos condensados, flavonoides y antocianinas) fibra, lectinas, ácidos grasos insaturados, ácido fítico, fibra soluble e insoluble, inhibidores de tripsina, entre otros (Serrano, 2004; Adams y Strandidge, 2006).

2.9 Frijol y su capacidad hipoglucemiante y antioxidante

La fibra soluble del frijol es particularmente eficiente para disminuir los niveles de colesterol en la sangre, a través del tracto gastrointestinal puede

interactuar con diferentes elementos y captar agua. Este hecho hace de la fibra un elemento muy importante en el proceso de la digestión, ya que limita y/o disminuye la velocidad de absorción de algunos nutrientes y favorece el tránsito intestinal. Dadas estas características, la fibra permite una absorción más lenta de la glucosa, lo cual condiciona índices glicémicos moderados y, por lo tanto, contribuye a controlar la hiperinsulinemia (Ludwing y col., 1999).

En un estudio realizado en conejos, se demostró que la administración de un extracto acuoso de *Phaseolus vulgaris* disminuye el área bajo la curva de tolerancia a la glucosa y el pico hiperglicémico, incluso mayor que el fármaco tolbutamida (Roman-Ramos y col., 1995). Por otra parte, Petlevski y colaboradores (2001) analizaron en ratones no obesos diabéticos, inducidos con aloxano, el efecto de dos extractos etanólicos de *Phaseolus vulgaris* (concentrado a 45 °C y otro sin concentrar), obteniendo como resultado una disminución en un 10 y 20 %, respectivamente, de los niveles de glucosa en sangre.

Otro componente importante relacionado con diabetes son los compuestos fenólicos. En el frijol se ha determinado la presencia de flavonoides (quercetina, camferol), ácidos fenólicos (ácido vanilínico, ácido ferúlico), isoflavonas y cumestrol (Díaz Batalla y col., 2006) y se ha sugerido que estas propiedades benéficas se deben a que dichos compuestos intervienen como antioxidantes.

En general, se acepta que los flavonoides tienen diversas actividades sobre la salud, entre otras razones porque tienden a mejorar la resistencia capilar e inhibir la inflamación, atrapan radicales libres e inhiben una variedad de enzimas como la cinasa de residuos de tirosina, la proteína cinasa C, la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa y otras que participan en las vías de transducción de señales y que interfieren con la activación de NF-kB (Soriano Bello, 2006).

Pari y Venkateswara (2003) reportaron que un extracto acuoso de vainas de frijol, administrado vía intragástrica por 45 días, induce enzimas antioxidantes

como la glutatión reductasa, la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión-S-transferasa y glutatión peroxidasa, cuyo papel principal se basa en disminuir el estrés oxidativo.

Estas propiedades hipoglucemiantes y antioxidantes se le han atribuido principalmente a los compuestos fenólicos presentes en frijol y a otros posibles constituyentes bioactivos con capacidad antioxidante (Serrano y Goñi, 2004), los cuales también podrían contribuir en la disminución del estrés oxidativo presente en la diabetes.

Se ha demostrado que las complicaciones de la diabetes son originadas por un estado inflamatorio del organismo, producido por los altos niveles de glucosa. Aun más, el frijol es un alimento que contiene compuestos fenólicos con alta actividad antioxidante y pueden ser capaces de disminuir el estado de inflamación, previniendo así el desarrollo de complicaciones que puedan llevar a la muerte del paciente diabético.

En general, el frijol contiene compuestos fenólicos que están 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- κ B, al contrarrestar la degradación de I κ -B, lo que genera una disminución de la producción de enzimas proinflamatorias como la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y a la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS). Además, los compuestos fenólicos activan enzimas antioxidantes, inhiben a PKC y a la proteína cinasa activadora de mitógenos (MAPK) (Santangelo y col., 2007). Lo cual puede ayudar a mejorar las complicaciones de la diabetes y el estado inflamatorio presente en ella.

3. JUSTIFICACIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa de gran importancia, ya que para cierta población mexicana se considera como un alimento básico. Además, se ha vinculado con el control de algunas enfermedades como la diabetes y este beneficio se atribuye a sus compuestos bioactivos.

La prevalencia de diabetes ha incrementado notablemente en los últimos años y actualmente México ocupa el noveno lugar de mortalidad por diabetes en el mundo. Esta enfermedad responde a la sobrepoblación pero también a los cambios en el estilo de vida. La diabetes es una enfermedad caracterizada por hiperglicemia crónica, que está asociada con un largo período de daño, disfunción y falla de varios órganos, que conlleva a complicaciones como la nefropatía diabética, en donde el deterioro progresivo no depende únicamente del control de la glicemia ya que diversos factores contribuyen en las manifestaciones de esta compleja patología como por ejemplo: el estrés oxidativo, citocinas, factores de crecimiento, factores genéticos, radicales de O₂, lipoproteínas de baja densidad glicosiladas, entre otros.

Se ha comprobado que el consumo de frijol tanto en altas como en bajas concentraciones disminuye niveles de glucosa y tiene efecto antioxidante en estudios con modelos animales; sin embargo hasta el momento poco se sabe acerca del efecto que pudiera ejercer sobre las complicaciones de la diabetes como daño renal, el cual se ha relacionado con el proceso de inflamación.

4. HIPÓTESIS

El frijol incorporado a la dieta regula el proceso inflamatorio relacionado con daño renal en animales diabéticos inducidos con estreptozotocina, dichos efectos son dependientes de la variedad y concentración de frijol.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido Pinto Durango y Negro 8025 sobre la expresión de citocinas proinflamatorias involucradas en el daño renal en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Cuantificar fenoles totales, taninos condensados, antocianinas y evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* en las harinas de frijol cocido.

5.2.2 Evaluar el efecto hipoglucemiante y antilipidémico de diferentes concentraciones de frijol incorporado a la dieta de ratas diabéticas en etapas iniciales y avanzadas de la enfermedad.

5.2.3 Determinar en ratas diabéticas el efecto de frijol cocido sobre la actividad de la enzima antioxidante GST y su cofactor GSH en riñón, así como, la expresión de citocinas proinflamatorias séricas (IL-6 y TNF- α).

5.2.4 Evaluar en riñón la actividad de NF- κ B y la expresión de I κ B- β en animales diabéticos alimentados con frijol cocido.

6. METODOLOGÍA

6.1 Materiales

6.1.1 Material biológico

- Se utilizaron ratas Wistar macho de peso entre 250–300 g, procedentes del bioterio CINVESTAV, México.
- Las variedades de frijol Pinto Durango y Negro 8025 fueron proporcionadas por el campo experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) cosecha 2007, Unidad Celaya.

6.1.2 Material químico

- 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.
- Estándar de sodio (1000 g/l) para espectroscopía atómica, marca Perkin Elmer.
- Estándar de potasio (1000 g/l) para espectroscopía atómica, marca Fluka.
- Sistema inmunoensayo para IL-6 y TNF- α marca BioSource.
- Anticuerpos monoclonales de NF- κ B, I κ -B β y actina de la marca Santa Cruz Biotechnology.

6.2 Métodos

6.2.1 Elaboración de harinas de frijol cocido

Las distintas variedades de frijol (PD y N) se cocieron en una relación 1:1.6 p/v con agua potable a una temperatura de 96 ± 2 °C, hasta obtener una cocción homogénea. Se trituraron y después se secaron en un horno a 60 °C por 24 horas; posteriormente, se molieron en un molino pulvex para la obtención de las harinas, las cuales se almacenaron en refrigeración hasta su uso. A estas harinas de frijol se les determinó la concentración de compuestos fenólicos totales, taninos condensados, antocianinas y se evaluó su capacidad antioxidante.

6.2.2 Extracción de compuestos fenólicos

Para poder cuantificar compuestos fenólicos totales, taninos condensados, y capacidad antioxidante en las harinas de frijol cocido primero se realizó una extracción de dichos compuestos.

A un gramo de harina de frijol se le adicionaron 10 ml de metanol, se protegió de la luz y se agitó durante 24 horas. El material obtenido se centrifugó a $5000 \times g$ por 10 minutos a temperatura ambiente, finalmente se recuperó el sobrenadante.

Para la cuantificación de antocianinas se realizó la siguiente extracción: a 0.5 g de harina de frijol se le adicionaron 4 ml de etanol acidificado (85 ml de etanol al 95 % + 15 ml de HCl 1.0 N); se protegió de la luz y se mezcló durante 2 minutos, se ajustó el pH a 1.0 con HCl. Después se agitó durante 30 minutos y, de ser necesario, se reajustó el pH. El material obtenido se centrifugó a $10\ 000 \times g$ por 20 minutos a temperatura ambiente, finalmente se recuperó el sobrenadante.

6.2.3 Cuantificación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

6.2.3.1 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, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotungstico y ácido fosfomolibdico que se reduce por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La coloración azul producida absorbe a una longitud de onda de 760 nm.

Para la cuantificación de fenoles totales, se tomó alícuota (40 μ l) del sobrenadante obtenido de la extracción y se llevó a un volumen total de 500 μ l, posteriormente se mezcló con 250 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N) y después se adicionaron 1250 μ l de Na_2CO_3 (20 %) y se dejó reposar en la oscuridad por 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se leyó la absorbancia a 760 nm. La cuantificación se realizó interpolando los resultados en una curva estándar de ácido gálico (0 a 20 μ g). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (AG) por gramo de harina (mg equivalentes AG/g de harina).

6.2.3.2 Cuantificación de taninos condensados

La cuantificación de taninos se realizó de acuerdo al método de la vainillina, descrito por Desphande y Cheryan (1987), adaptado para el uso de microplaca. Al sobrenadante obtenido de la extracción (50 μ l) se le agregaron 200 μ l de la solución de vainillina al 0.5 % recién preparada (vainillina 1 % en metanol y HCl 8 % en metanol en una relación 1:1). Posteriormente se preparó un blanco al cual se le adicionaron 50 μ l de metanol y 200 μ l de HCl al 4 %. Para cuantificar los taninos condensados se leyó la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro (Thermo, Multiskan Ascent). Se utilizó una curva estándar de (+)catequina (0-0.2 mg/ml) y

los resultados obtenidos se expresaron como mg equivalentes de (+)catequina/g de harina.

6.2.3.3 Cuantificación de antocianinas

La determinación de antocianinas totales se realizó siguiendo el método de Abdel-Aal y Hucl (1999) y algunas modificaciones de Rivera-López (1998). Brevemente se realizó como sigue: después de la extracción, el sobrenadante se aforó a 10 ml usando etanol acidificado. Posteriormente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-visible a 535 nm. El valor de la absorbancia obtenido se sustituye en la siguiente fórmula:

$$C = (A/\epsilon) \times (V/1000) \times PM \times (1/g \text{ de muestra}) \times 10^6$$

Donde:

C = concentración de antocianinas totales (mg/kg),

A = lectura de absorbancia a 535 nm,

ϵ = coeficiente de absortividad molar cianidina 3-glucósido ($25\ 965\ \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$),

V = volumen total del extracto de antocianinas,

PM = Peso molecular de la cianidina 3-glúcosido (449 g/mol),

Los resultados se expresaron como mg equivalentes de cianidina 3-glucósido/kg de muestra.

6.2.3.4 Determinación de la capacidad antioxidante del frijol empleando la técnica de ABTS

La determinación se realizó en las harinas de frijol cocido siguiendo el ensayo de capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC, por sus siglas en inglés) descrito por Re y col. (1999) y Van Den Berg y col. (1999). La técnica

consistió en mezclar ABTS 7 mM y persulfato de potasio 2.45 mM en agua, para producir el radical ABTS[•].

Posteriormente la solución concentrada de ABTS[•] se diluyó con un buffer de fosfatos salino (PBS), pH 7.4, hasta obtener una absorbancia final de 0.7 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm. Después se adicionaron 10 μ l de muestra en 990 μ l de la dilución de ABTS a 734 nm y después de 6 minutos se midió la absorbancia a la misma longitud de onda. Para la determinación de la capacidad antioxidante se realizó una curva estándar de Trolox preparado con PBS (0-20 μ M). Los resultados se expresaron como μ M equivalentes de Trolox/g de harina.

Estudios *In vivo*

6.2.4 Inducción de diabetes

Los experimentos *in vivo* se dividieron en dos etapas, en todos los experimentos se utilizaron ratas Wistar macho de 250-300 g de peso donadas por el bioterio CINVESTAV, México. Los animales se sometieron a un periodo de adaptación de por lo menos una semana a 25 °C, bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con acceso libre a comida y agua. Antes de iniciar el experimento, los animales se alimentaron una semana con alimento comercial Zeigler (NIH-31 Rismart S.A. de C.V.) molido. Para la inducción de la diabetes, las ratas permanecieron 15 horas en ayuno y posteriormente se les inyectó una dosis única de estreptozotocina (STZ) vía intraperitoneal. Se realizaron dos etapas de experimentación, en la etapa inicial se empleó una dosis de STZ de 45 mg/kg de peso corporal, para inducir una diabetes que no presenta daño renal y para la etapa avanzada se utilizó una dosis de STZ 55 mg/kg de peso corporal, con esta dosis se presenta daño renal a partir de la tercer semana de inducción. Cinco días después de la administración de STZ se cuantificó glucosa en sangre y los animales se asignaron aleatoriamente para formar los grupos de experimentación. Se consideraron para la etapa inicial, animales con glucosa sanguínea en el rango

de 180–250 mg/dl y para la etapa avanzada animales en el rango de 250-300 mg/dl. Las ratas del grupo control negativo (sanas) recibieron vía intraperitoneal solución salina.

6.2.5 Determinación de glucosa

La glucosa se cuantificó en muestras de sangre obtenidas de la vena caudal de las ratas (localizada en el extremo de la cola del animal), con un mínimo de 8 horas en estado de ayuno. Para ello se empleó un glucómetro marca ROCHE, el cual tiene un rango de sensibilidad que va de 10-600 mg/dl (0.6-33.3 mmol/l) de glucosa, utilizando tiras reactivas de la marca Accutrend.

El glucómetro mide el poder reductor generado por la enzima glucosa deshidrogenasa, al metabolizar la glucosa a gluconolactona, indicando la concentración de glucosa en mg/dl.

6.2.6 Grupos de estudio

La metodología se dividió en dos etapas. Para la etapa inicial se utilizaron un total de 60 ratas (54 diabéticas y 6 sanas), las cuales fueron divididas en diez grupos de seis ratas cada uno (cuadro 2). Los animales fueron alimentados durante cinco semanas con harinas de frijol cocido Pinto Durango y Negro 8025 incorporado a la dieta, a diferentes concentraciones 3, 12.5, 25 y 50 %. Para la etapa avanzada se emplearon un total de 36 ratas (30 diabéticas y 6 sanas), las cuales fueron divididas en seis grupos de seis ratas cada uno (cuadro 3). Los animales fueron alimentados durante tres semanas con harinas de frijol cocido Pinto Durango y Negro 8025 incorporado a la dieta, a dos concentraciones 3 y 50 % (representando el consumo *per cápita* urbano y rural, respectivamente). Al finalizar cada experimento se realizaron evaluaciones en riñón y en muestras de orina y suero.

Cuadro 2. Grupos experimentales para la evaluación del consumo de frijol sobre el control de la diabetes en su etapa inicial

GRUPO	ANIMALES	DIETA
1	Sanos	Alimento Zeigler molido
2	Diabéticos ¹	Alimento Zeigler molido
3	Diabéticos ¹	Frijol Pinto Durango 3 %
4	Diabéticos ¹	Frijol Pinto Durango 12.5 %
5	Diabéticos ¹	Frijol Pinto Durango 25 %
6	Diabéticos ¹	Frijol Pinto Durango 50 %
7	Diabéticos ¹	Frijol Negro 8025 3 %
8	Diabéticos ¹	Frijol Negro 8025 12.5 %
9	Diabéticos ¹	Frijol Negro 8025 25 %
10	Diabéticos ¹	Frijol Negro 8025 50 %

¹ La diabetes fue inducida con una dosis de estreptozotocina de 45 mg/kg

Cuadro 3. Grupos experimentales para la evaluación del consumo de frijol sobre el control de la diabetes en su etapa avanzada

GRUPO	ANIMALES	DIETA
1	Sanos	Alimento Zeigler molido
2	Diabéticos ²	Alimento Zeigler molido
3	Diabéticos ²	Frijol Pinto Durango 3 %
4	Diabéticos ²	Frijol Pinto Durango 50 %
5	Diabéticos ²	Frijol Negro 8025 3 %
6	Diabéticos ²	Frijol Negro 8025 50 %

² La diabetes fue inducida con una dosis de estreptozotocina de 55 mg/kg

6.2.7 Determinaciones semanales

Para la evaluación de los tratamientos se llevó un control semanal de los siguientes parámetros: a) peso corporal, b) glucosa sanguínea en ayuno, c) consumo de agua y d) consumo de alimento.

6.2.8 Sacrificio y obtención de muestras

Los animales de la etapa inicial se sacrificaron al término de cinco semanas y los animales de la etapa avanzada al final de 3 semanas. Los tiempos de sacrificio fueron diferentes debido a que a mayores dosis de estreptozotocina administrada es mayor la severidad de la enfermedad, por lo tanto el tiempo de vida de las ratas es menor. Una vez finalizada cada etapa, los animales permanecieron en ayuno y se recolectó una muestra de orina de 12 horas, posteriormente, los animales se anestesiaron colocándolos en una cámara con éter etílico. Una vez anestesiados se tomó una muestra de sangre por punción cardiaca, ésta se centrifugó para la obtención de suero el cual se congeló y se almacenó a -20 °C para posteriores determinaciones bioquímicas, después se cortó la arteria principal para su sacrificio. Posteriormente, se removieron los riñones, los cuales fueron pesados y congelados con nitrógeno líquido finalmente se almacenaron a -70 °C para análisis moleculares.

6.2.9 Evaluación del efecto de frijol cocido sobre daño renal en ratas diabéticas

6.2.9.1 Determinación del perfil de lípidos en suero

La determinación de perfil de lípidos (triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL y VLDL) se llevó a cabo en el suero sanguíneo de las ratas en estudio, para esto, se utilizaron kits enzimáticos de la marca Randox.

6.2.9.2 Cuantificación de IL-6 y TNF- α en suero

La determinación de IL-6 y TNF- α en suero, se realizó con un kit comercial marca BioSource, siguiendo la técnica de inmunoensayo (ELISA tipo sándwich). Para determinar la concentración se utilizó una curva estándar derivada de cada una de las citocinas y se expresó como picogramos por mililitro.

La técnica se realiza en una microplaca estéril de fondo plano, sensibilizada con el primer anticuerpo específico para IL-6 (Rat Interleucina 6). Primero se agregaron 100 μ l de muestra a cada pozo de la placa, o es su caso su estándar correspondiente 0, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1000 y 2000 pg/ml y se incubó por dos horas a 37 °C sin agitación. Durante esta primera incubación el antígeno presente en la muestra (IL-6) se une al primer anticuerpo inmovilizado en la placa. Transcurrido el tiempo se realizan lavados para eliminar el antígeno que no se unió, una vez lavada la placa se depositó en los pozos un segundo anticuerpo unido a biotina, incubándose una hora a temperatura ambiente.

Durante la segunda incubación, el antígeno, ya inmovilizado en la placa, se une al segundo anticuerpo. Después de remover el exceso de anticuerpo, se adicionó una solución que contiene la enzima estreptavidina peroxidasa, que se une a este segundo anticuerpo y se incubó por 30 minutos. Estas uniones al anticuerpo con biotina, completa las cuatro partes del sándwich. Después se removió toda la enzima que no se ligó y se adicionó una solución que contiene el sustrato de la enzima estreptavidina peroxidasa, incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente, este actúa sobre la unión de la enzima para producir un compuesto colorido (azul). Finalmente se detuvo la reacción y el producto se leyó a 450 nm en un lector de ELISA dentro de los 30 minutos posteriores de haber detenido la reacción. La intensidad de este producto colorido (amarillo) es directamente proporcional a la concentración de antígeno IL-6 presente en la muestra original. Se incluyeron controles negativos para confirmar la ausencia del antígeno buscado.

Para la cuantificación de TNF- α el procedimiento es muy similar al descrito anteriormente, la única diferencia es que para esta citocina el antígeno se une simultáneamente al anticuerpo inmovilizado en la placa y a la solución que contiene el segundo anticuerpo, por lo que no se lleva a cabo la incubación a 37 °C durante 90 minutos descrita para IL-6.

6.2.9.3 Determinación de glucosa, proteína y microalbúmina en la orina

Para la obtención de la muestra de orina, los animales se separaron en jaulas individuales en condiciones de ayuno, por un lapso de 12 horas. Posteriormente, las muestras recién recolectadas se emplean inmediatamente para la determinación de glucosa y proteína, para esto. Se utilizaron tiras reactivas Multistix 10SG. En cuanto a la determinación de microalbúmina se emplearon tiras reactivas de Microalbumin de la marca Bayer, las cuales se sumergieron en la orina y, posteriormente, se realizó la lectura de todos parámetros en un analizador Clinitek. La orina restante se filtró y se congeló hasta su uso para las determinaciones de sodio y potasio.

6.2.9.4 Determinación de sodio y potasio en la orina

Para esta determinación se utilizaron las muestras de orina recolectadas previamente, las cuales fueron descongeladas y filtradas. Primero se realizaron las curvas de calibración para sodio y potasio, para ello, se preparó una serie de diluciones a concentraciones de 0, 10, 30, 50, 80, 120 y 150 mg/l, a partir de una solución patrón (1000 mg/l) para cada ión disuelto en ácido nítrico al 2 % y lantano. Las soluciones se leyeron a una longitud de onda de 303.3 nm para el sodio y a 404.4 nm para el potasio, en un espectrofotómetro de flama marca Perkin-Elmer. Se empleó como blanco una solución de ácido nítrico al 2 % y lantano.

Para realizar el análisis de las muestras, se preparó una dilución (1:10) de cada una de las muestras y se leyó su absorbancia. Se determinaron los mg/l de sodio y potasio con la ayuda de su respectiva curva de calibración. Los resultados se expresaron como ppm de cada ión.

6.2.9.5 Determinación de la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en riñón

Se pesaron 0.5 g de riñón y se homogenizaron con 2 ml de solución amortiguadora de Tris-sacarosa en un politrón, se centrifugaron a 8750 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se centrifugó a 100, 000 x g durante 60 minutos a 4 °C. Después se recuperó el sobrenadante (citosol) y se almacenó -70° C para su posterior análisis. El extracto citosólico se diluyó con solución amortiguadora de fosfatos 1 M pH 6.5 (1:30). A cada pozo de la microplaca se le adicionaron 50 µl de citosol previamente diluido, posteriormente se le adicionó 100 µl de solución amortiguadora de GSH y finalmente 150 µl de una solución de cloro-dinitro-benceno (CDNB); el producto de esta reacción se midió cada 20 segundos durante 2 minutos a 340 nm en un lector de ELISA Turnable Versamax. Se cuantificó la concentración de proteínas totales mediante el kit de proteínas BCA-Pierce, empleando una curva estándar de albúmina. La actividad enzimática se expresó como nmol/min mg proteína, empleando la siguiente ecuación:

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

Donde:

abs min 2 es la absorbancia a 340 nm en el minuto 2

abs min 1 es la absorbancia a 340 nm en el minuto 1

mg proteína son los miligramos de proteína en el citosol

0.0096 el coeficiente de extinción de CDNB en $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

6.2.9.6 Determinación del factor glutatión reducido (GSH) en riñón

Para la cuantificación primero se precipitaron las proteínas del extracto citosólico con ácido tricloro acético al 20 % y se dejó reposar 30 minutos en hielo, después se centrifugó a 8 500 x g durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante se

utilizó para los posteriores análisis. A cada pozo de la microplaca se le adicionaron 150 μ l de solución amortiguadora Tris-EDTA, después se le adicionaron 50 μ l de muestra, 80 μ l de metanol y finalmente 20 μ l DTNB, para leerse después de cinco minutos en un lector de ELISA Turnable Versamax a 412 nm. La concentración de GSH en μ M se obtuvo extrapolando la absorbancia de las muestras en la curva de calibración de GSH (0-200 μ M). Finalmente se cuantificó la concentración de proteínas totales, mediante el kit de proteínas BCA-Pierce, empleando una curva estándar de albúmina. Los resultados se expresaron como μ M/mg de proteína.

6.2.9.7 Evaluación de la actividad del factor de transcripción nuclear (NF- κ B) y la expresión de I κ B- β

La evaluación de la actividad del factor de transcripción NF- κ B p65 y de la expresión de I κ B- β se realizó mediante la técnica de Western blot. Para esto se llevaron a cabo extracciones de las fracciones proteicas citosólicas y nucleares de los riñones para la actividad de NF- κ B, así como extracciones totales para la expresión de I κ B- β . Para la obtención de proteína total, el tejido se homogenizó con 500 μ l de solución amortiguadora de extracción, esta mezcla se mantuvo en agitación durante 45 minutos a 4 °C. Después se centrifugó a 10, 000 x *g* durante 30 minutos a 4 °C. Para la obtención de la fracción citosólica y nuclear, el tejido se homogenizó con 300 μ l de solución amortiguadora de extracción y se centrifugó a 10 000 x *g* por cinco minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante o la fracción citosólica y la pastilla restante se resuspendió en otra solución amortiguadora de extracción, esta mezcla se mantuvo en hielo y se agitó en vortex y finalmente se centrifugó a 10 000 x *g* por diez minutos a 4 °C. El sobrenadante de las tres fracciones se colectó y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (1951).

Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis de las proteínas en gel de poliacrilamida al 10 %. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubaron con un primer anticuerpo monoclonal, para NF- κ B conejo anti-NF-

kB p65 (1:2000) y para IKB- β conejo anti-IKB- β (1:2000) por tres horas. El segundo anticuerpo para ambas proteínas fue cabra anti-conejo (1:2000) con el cual se incubó durante una hora. La membrana se incubó con una solución de quimioluminiscencia y el revelado se realizó en películas fotográficas Kodak, empleando una solución reveladora y una solución fijadora (Kodak). La películas se digitalizaron y se obtuvo el área de píxeles de las bandas mediante el programa ImageJ 1.39d. Para verificar la cantidad de proteína cargada en el gel se realizó la proteína actina con la cual fue posible normalizar la cantidad de proteína en el gel.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

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 Tukey-Kramer y la prueba de Dunnet. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico JMP 5.0.1.

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las harinas de frijol cocido

Diversos estudios han demostrado que el frijol es capaz de regular los niveles de glucosa, así como, disminuir el estrés oxidativo. Estas propiedades hipoglucemiantes y antioxidantes se le han atribuido, principalmente, a la presencia de los microconstituyentes bioactivos y a las características fisicoquímicas del almidón resistente, inhibidores de proteasas y los compuestos fenólicos (Subramanian y col., 2002; Pari y col., 2003).

Respecto a los compuestos fenólicos, un gran número de éstos ya se han identificado en diferentes variedades de frijol (Guzmán y col., 1998; Díaz-Batalla y col., 2006; Aguilar y col., 2008), y se ha sugerido que sus propiedades benéficas están relacionadas a su capacidad antioxidante (Tsimidou, 1998). Además que están asociados con la disminución en el riesgo de padecer enfermedades crónico-degenerativas (Scalbert y col., 2005). Así mismo, la capacidad antioxidante está dada principalmente por la naturaleza de los compuestos fenólicos presentes en el alimento (Agostini y col., 2004). Sin embargo, la concentración y la naturaleza de estos compuestos presentes en las diferentes variedades de frijol podrían afectar sus efectos nutracéuticos. Es por esto que se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos totales, taninos condensados, antocianinas y su capacidad antioxidante.

En cuanto a los compuestos fenólicos, los resultados obtenidos muestran que la harina del frijol N presentó 1.5, 4 y 8 veces más concentración de fenoles totales, taninos condensados y antocianinas, respectivamente, que el frijol PD, lo cual pudiera estar relacionado con una mayor capacidad antioxidante del frijol N, en comparación con el frijol PD (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las harinas de frijol cocido

Parámetro	PD	N
Fenoles Totales ¹	0.63 ± 0.01 ^b	0.92 ± 0.06 ^a
Taninos condensados ²	3.73 ± 0.12 ^b	14.55 ± 0.02 ^a
Antocianinas ³	18.06 ± 1.88 ^b	150.03 ± 6.85 ^a
Capacidad Antioxidante ⁴	94.35 ± 5.00 ^b	112.18 ± 3.08 ^a

Los valores representan la media ± E.E. a y b indican diferencia estadística significativa entre variedades para cada parámetro evaluado ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey. PD= Pinto Durango, N= Negro 8025.

¹ Expresados en mg eq. ácido gálico/g de harina,

² Expresados en mg eq. (+)catequina/g de harina,

³ Expresados en mg eq. cianidina 3-glucósido/kg de harina,

⁴ Expresada en μM eq. Trolox/g de harina.

En la literatura existen pocos estudios relacionados con la cuantificación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en harinas de frijol cocido. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio pueden compararse con lo reportado por Serna y col. (2007), quienes evaluaron la concentración de taninos condensados y antocianinas en harinas de frijol cocido, encontrando concentraciones para taninos condensados de 2.9 y 12.1 mg eq. (+)catequina/g de harina; antocianinas de 14.02 y 160.53 mg eq. cianidina 3-glucósido/kg de harina para las variedades Pinto Zapata y Negro 8025, respectivamente, los cuales son similares a los resultados obtenidos en este estudio.

Espinosa-Alonso y col. (2006) evaluaron diversas variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) tales como, negro, gris moteado, cafeto, amarillo pálido, mestizo, crema moteado. Ellos reportan una concentración de fenoles totales, taninos condensados y antocianinas en un rango de 0.90-2.11 mg ácido gálico/ g de harina, 10.05-35.7 mg eq (+)catequina/g de harina y 10-1850 mg eq. cianidina 3-glucósido/kg de harina, respectivamente. A pesar de que la concentración de fenoles totales y taninos condensados para el frijol N se encuentran dentro del intervalo reportado por estos autores, los valores son bajos, así como también para PD, lo que podría atribuirse a que en el estudio realizado por Espinosa-Alonso, ellos emplearon harinas de frijol crudo y en nuestro estudio

ambas variedades se sometieron a cocción. Aparicio-Fernández y col. (2005) evaluaron el contenido de taninos condensados en la variedad Negro Jamapa con y sin tratamiento térmico observando una disminución, hasta de un 10 %, en dicho parámetro, al llevar a cabo la cocción del frijol, lo que se sugiere que parte de los compuestos fenólicos presentes en el frijol se degradan al recibir tratamiento térmico, o bien se acomplejan con otros componentes (carbohidratos y/o proteínas).

En cuanto a los resultados obtenidos de capacidad antioxidante de las harinas de frijol, se obtuvo para PD un valor de 94.35 ± 5.00 y para N de 112.18 ± 3.08 $\mu\text{M eq. Trolox/g}$ de harina (Cuadro 4). Se puede observar que el frijol N mostró 18 % mayor capacidad antioxidante. Lo cual puede compararse con lo reportado por Serna-Gutiérrez (2007), quienes encontraron una capacidad antioxidante para la variedad de Pinto Zapata de 257.1 ± 5.89 $\mu\text{M eq. Trolox/g}$ de harina y para N $357.4 \pm$ $\mu\text{M eq. Trolox/g}$ de harina. Al igual que en nuestros resultados el frijol N mostró mayor capacidad antioxidante (28 %) que un frijol Pinto.

Estudios han demostrado que el contenido de compuestos fenólicos así como la actividad antioxidante varían de un cultivar a otro (Cardador-Martínez y col., 2005). Esto puede deberse atribuirse a que la capacidad antioxidante esta dada principalmente por la naturaleza de los compuestos fenólicos presentes en el alimento (Agostini y col., 2004). En este contexto, 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. A este respecto se han realizado estudios *in vitro* en donde se ha observado 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. Así mismo se ha demostrado que tienen la capacidad de modular enzimas de destoxificación

(Yeh, y col., 2003). La capacidad antioxidante *in vitro* es utilizada como una prueba preeliminar 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 las harinas de frijol cocido pueden ser fuentes potenciales de compuestos antioxidantes y dichos resultados sugieren que esta actividad podría inactivar los radicales generados en un organismo en un estado de hiperglicemia.

8.2 Evaluación del efecto del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en etapas iniciales y avanzadas de la diabetes

8.2.1 Efecto del consumo de frijol sobre los niveles de glucosa en sangre de ratas Wistar diabéticas

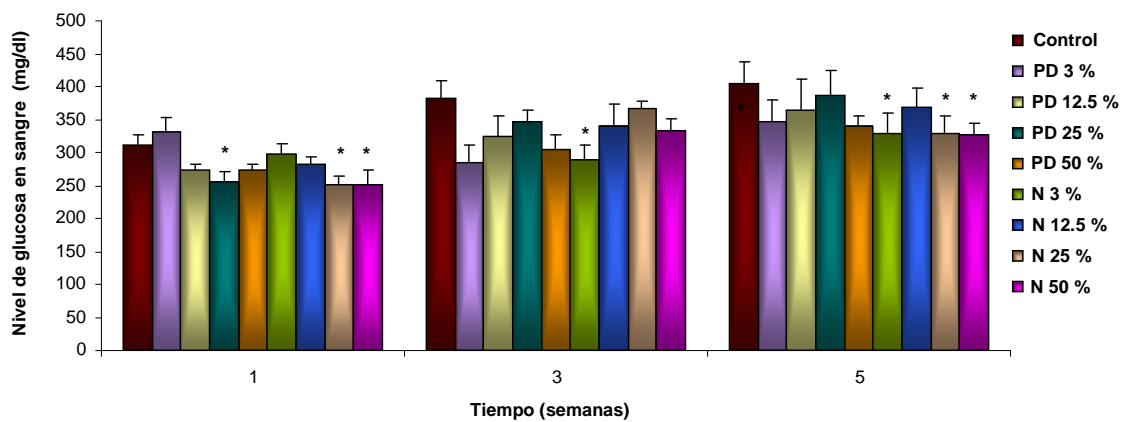
La diabetes experimental inducida en los animales se realizó mediante una inyección vía intraperitoneal de 45 mg/kg (etapa inicial) y 55 mg/kg (etapa avanzada) de STZ. A estas dosis el fármaco provoca la destrucción parcial de las células β pancreáticas encargadas de producir y secretar insulina al organismo, por lo tanto, la diabetes presentada es parecida a una diabetes tipo 1. La ausencia de insulina provoca una disminución de la incorporación de glucosa en tejidos periféricos como el adiposo y muscular, por lo que disminuye la utilización de la misma generando incrementos de la glucemia (Wilson y col., 1990).

En la figura 5 se puede observar el efecto que tiene la alimentación diaria de frijol PD y N incorporado en la dieta sobre los niveles de glucosa sanguínea en ayuno de ratas Wistar sanas y diabéticas a lo largo del experimento, en ambas etapas del estudio. Desde la primera semana de tratamiento (Figura 5a) se observó un efecto hipoglucemiante en los grupos alimentados con ambas variedades, sosteniéndose así hasta el final de la quinta semana. En el caso del frijol PD hay una disminución de los niveles de glucosa de hasta un 25 %, y para el N hasta un 28 %. Por lo tanto, la alimentación con frijol mantiene cierto control de

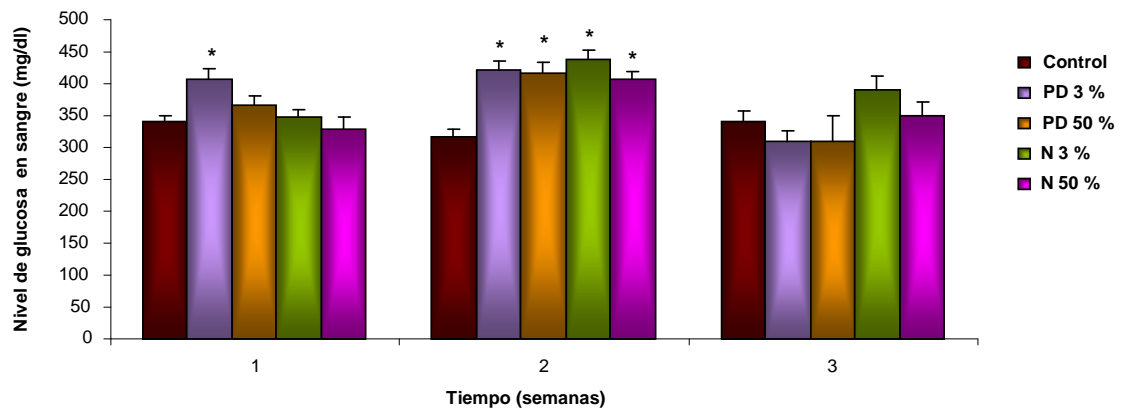
la enfermedad, ya que a pesar de que para algunos grupos la disminución de la glicemia no es estadísticamente significativa, la diabetes no avanza como en el caso del grupo control. Esto puede deberse a que los carbohidratos presentes en el frijol se encuentran estrechamente relacionados con el cambio en los niveles de glucosa sérica. Se ha reportado que el frijol contiene carbohidratos glicémicos, los cuales son digeridos y absorbidos por el intestino delgado, modificando así los niveles de glucosa en sangre en el organismo. Cabe mencionar que el frijol presenta un bajo índice glicémico debido a que sólo el 37.3 % del total del almidón disponible puede repercutir directamente en la respuesta glucémica. Además, la mitad de este valor corresponde a carbohidratos de digestión lenta, por lo que son absorbidos más lentamente (Foster-Powel y col., 2002).

Por otra parte, el gran aporte de fibra por parte del frijol produce una mayor saciedad, además de elevados niveles de colecistocina y arrastre de grasas, lo cual, se ha relacionado con disminución en los niveles de glucosa y colesterol (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.

Se ha reportado que los compuestos fenólicos pueden regular gluconeogénesis en animales diabéticos, al disminuir la actividad hepática de las enzimas glucosa 6-fosfatasa y fructosa 1,6-bifosfatasa (Pari y col., 2003), cuya función es obtener glucosa a partir de precursores no glucosídicos como los aminoácidos, lactato, piruvato y glicerol (Mathews, 1998). Así mismo, compuestos fenólicos tales como ácido gálico, catequina, ácido siríngico, ácido cafeíco, clorogénico y vainillina (Guzmán y col., 2004), ayudan a la sensibilización de la insulina, por lo que se incorpora glucosa a tejidos dependientes de esta hormona y puede verse reflejado en una disminución de glucosa en sangre. Además, estos compuestos intervienen como antioxidantes naturales, contribuyendo con su acción protectora sobre el estrés oxidativo (Tsimidou, 1998).



(a)



(b)

Figura 5. Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre la concentración de glucosa en sangre de ratas diabéticas en etapas a) iniciales y b) avanzadas de la enfermedad

Los valores se presentan como media de la concentración de glucosa en sangre \pm E.E. * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), analizados con la prueba de Dunnet. PD= Pinto Durango, N= Negro 8025.

Los resultados para la etapa avanzada (Figura 5b) mostraron que no hubo una disminución en los niveles de glucosa sanguínea, en animales que tienen niveles de glucosa superiores a 350 mg/dl. Es importante mencionar que una vez que los animales presentan diabetes, ésta evoluciona rápidamente y se generan

las complicaciones, por lo que a este nivel, ya no es posible observar una protección con frijol, en cuanto a los niveles de glucosa. Por lo tanto, en etapas avanzadas los niveles de glucosa en sangre no pueden controlarse sólo con alimentación, se requiere además de fármacos hipoglucemiantes.

8.2.2 Efecto del consumo de frijol sobre el peso corporal de ratas Wistar diabéticas

La insulina es importante para incorporar glucosa en las células musculares para la obtención de energía, por lo que la ausencia de esta hormona inicia un proceso catabólico al incrementar la degradación tanto de la grasa acumulada como de proteínas musculares (Klimes, 1997), lo cual correlaciona con la pérdida de peso. Por lo que una de las características de una diabetes no controlada es la pérdida de peso corporal la cual correlaciona con un progreso de la enfermedad, por lo tanto dicho parámetro fue determinado en este estudio.

En la figura 6 se muestra el peso de los animales sanos y diabéticos con respecto al tiempo de experimentación de cada etapa en estudio. Cabe mencionar que en ambas etapas se inicia de pesos similares. Sin embargo, la enfermedad en los animales de la etapa avanzada (Figura 6b) avanza con mayor severidad ya que semanalmente las ratas diabéticas control perdieron aproximadamente 30 g (36%), obteniendo un peso promedio de 189 g al final del experimento (3 semanas). En tanto que para la etapa inicial (Figura 6a) la evolución fue más lenta ya que al final del experimento (5 semanas) los animales muestran pesos mayores que los observados para la etapa avanzada a pesar de que el tiempo de experimentación es mayor. Por ejemplo, el peso promedio en las ratas diabéticas inducidas con 45 mg/kg de STZ (etapa inicial) a la quinta semana es de 216 g; por otro lado, las que fueron inducidas con 55 mg/kg de STZ presentaron un peso similar de 210 g pero a la segunda semana de experimentación.

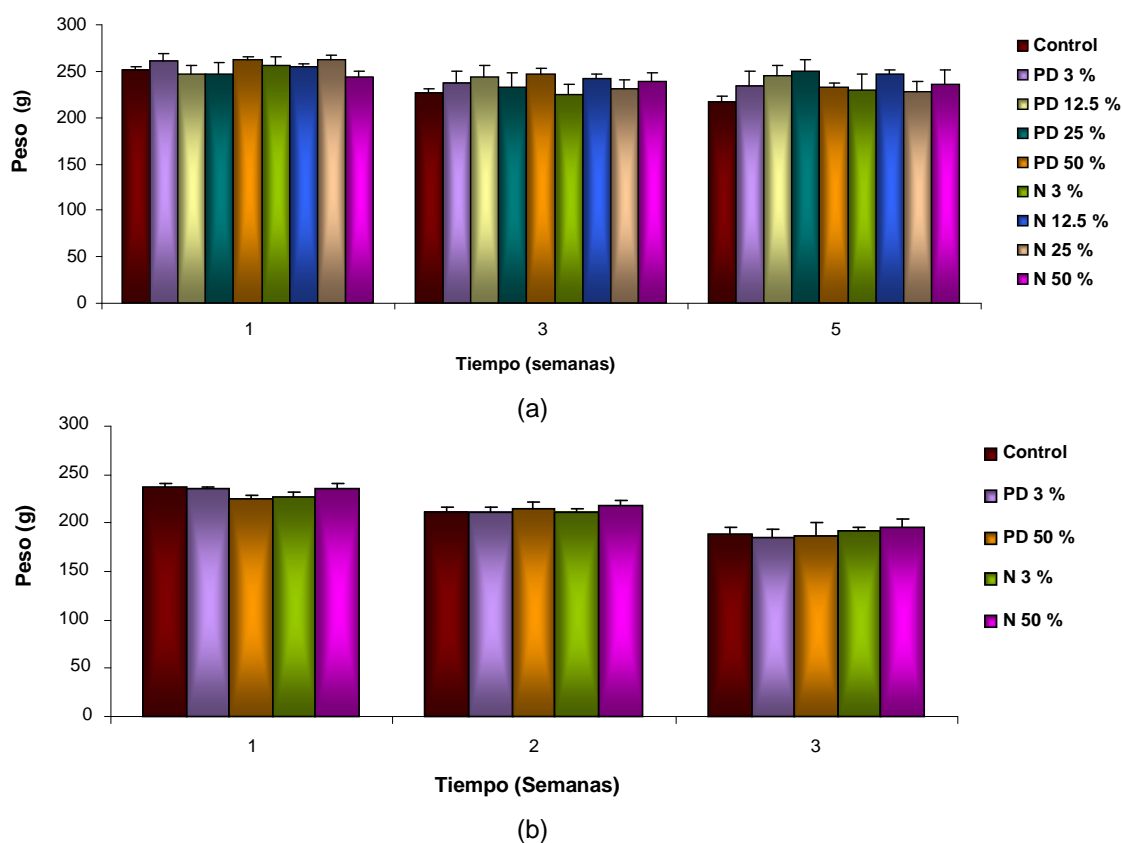


Figura 6. Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre el peso corporal de ratas diabéticas en a) etapas iniciales y b) avanzadas de la enfermedad

Los valores se presentan como media del peso corporal \pm E.E. * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), analizados con la prueba de Dunnett. PD= Pinto Durango, N= Negro 8025.

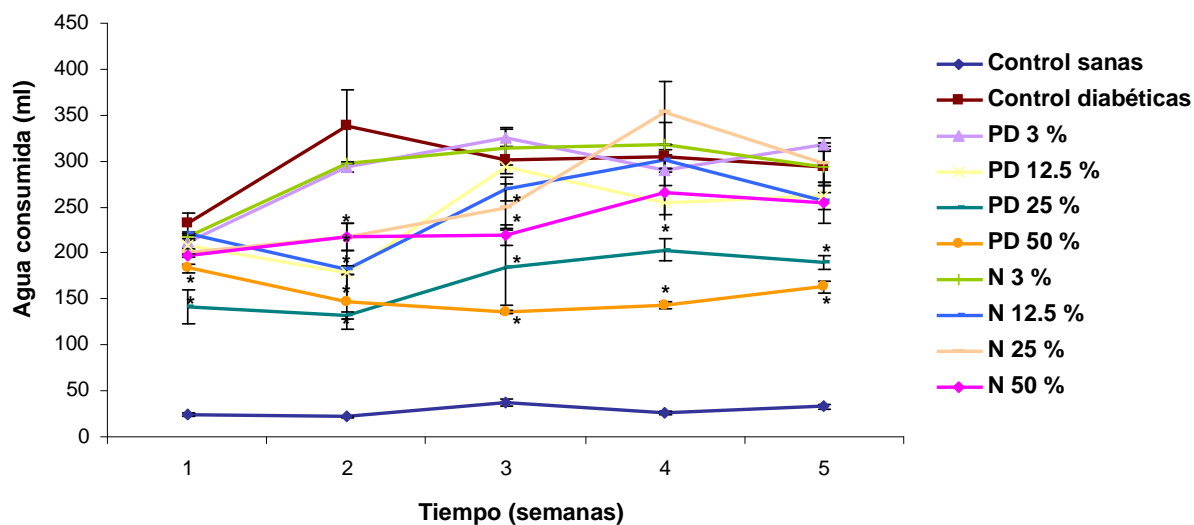
Con respecto al tratamiento, en la etapa inicial se observa (Figura 6a) que la incorporación de frijol en la dieta de los animales produce un ligero incremento (16 %, 35 g) en el peso corporal a lo largo de las cinco semanas de tratamiento respecto a su control de ratas diabéticas. A pesar de que estos valores no fueron estadísticamente significativos, si tienen relevancia fisiológica, ya que el grupo alimentado con frijol PD al 12.5 % presentó un peso promedio de 247 g en la primer semana y después de 4 semanas, su peso corporal fue de 244 g, corroborando que el frijol en etapas iniciales de la enfermedad ayuda a que esta no evolucione. Con estos resultados se puede sugerir que algunos componentes del frijol pudieran estar regulando la incorporación de glucosa a tejidos

dependientes de insulina, incrementando la síntesis de triacilglicéridos y de proteínas musculares. Por otro lado, estudios previos han reportado que los flavonoides pueden regenerar el daño a las células β pancreáticas en animales diabéticos (Chakravarthy y col., 1982) y el frijol es una leguminosa que contiene cantidades considerables de estos compuestos fenólicos. Sushmita y col. (1997) reportaron que *P. vulgaris* contiene cerca de 50 mg de flavonoides/100 g de frijol.

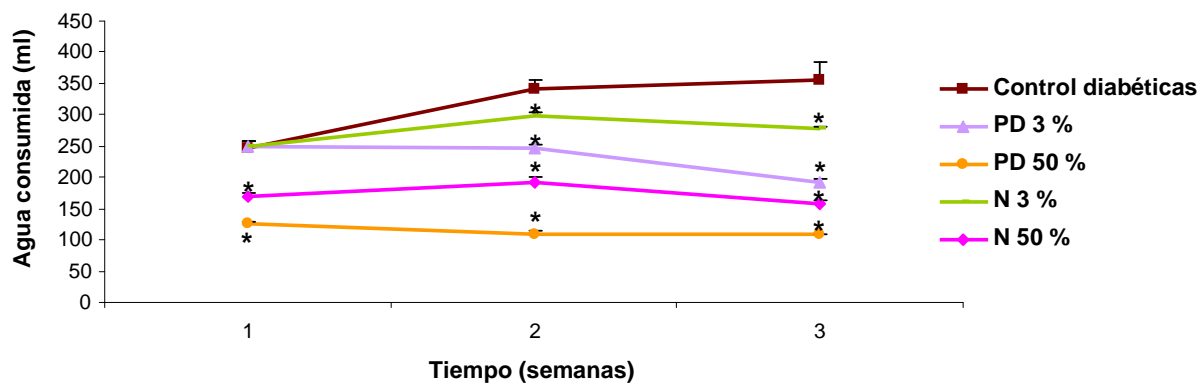
Por otra parte, el frijol no tuvo ningún efecto sobre el peso corporal en etapas avanzadas (Figura 6b), ya que los grupos tratados con ambas variedades evolucionan de la misma manera que su grupo control de ratas diabéticas. Por lo que, en esta etapa la enfermedad progresa de manera mas acelerada y esto aumenta el riesgo de desarrollar las complicaciones de la diabetes. Esto también puede deberse a que en estados avanzados de la enfermedad, la incorporación de frijol en la dieta de las ratas ya no es capaz de regular o evitar que progrese este parámetro. Así mismo, en esta etapa avanzada tampoco se observó una disminución de los niveles de glucosa.

8.2.3 Efecto del consumo de frijol sobre el agua consumida en ratas Wistar sanas y diabéticas

La diabetes es una enfermedad que se caracteriza, entre otros síntomas, por polidipsia (sed excesiva) (Braunwald y col., 1998). El exceso de glucosa en la sangre necesita de la excreción de cantidades elevadas de agua, vía urinaria, para eliminar la glucosa disuelta en el organismo (King, 1991). Debido a esto hay una deshidratación ocasionada por el arrastre de líquido, como consecuencia, el consumo de agua en los animales diabéticos se hace evidente (Federación Mexicana de Diabetes, 2003). Por lo que, en el presente experimento se determinó el consumo de agua como un indicador de la evaluación del control de la enfermedad.



(a)



(b)

Figura 7. Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre la ingesta de agua de ratas sanas y diabéticas en a) etapas iniciales y b) avanzadas de la enfermedad

Los valores se presentan como la media de los mililitros de agua consumida \pm E.E. * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control de ratas diabéticas, analizados con la prueba de Dunnett. PD= Pinto Durango, N= Negro 8025.

En la figura 7a se observa el promedio de agua consumida (ml) durante cinco semanas por los animales en experimentación (etapa inicial). En primera instancia se puede observar, en general, que el grupo de ratas diabéticas ingirió

mayor cantidad de agua (295 ml) en comparación con las ratas sanas (28 ml). Por otro lado, a partir de la primera semana de tratamiento existe una disminución del consumo de agua para los animales alimentados con ambas variedades de frijol a las concentraciones de 25 y 50 %, en comparación con el grupo control de ratas diabéticas ($p < 0.05$). Este comportamiento se sigue presentando a lo largo del experimento y persiste hasta el final de la quinta semana, lo que nos indica que las dietas con las harinas de frijol cocido a altas concentraciones regula esta alteración de la enfermedad.

Por otro lado, los resultados obtenidos de la ingesta de agua para la etapa avanzada del experimento se muestran en la figura 7b donde, al igual que en la etapa inicial, se observa una disminución en el consumo de agua a partir de la primera semana para el frijol N y PD al 50 % (en un 30 % y 50 %, respectivamente), mostrando este mismo comportamiento hasta el final del experimento. Después de la segunda semana, la concentración de 3 % para ambas variedades también disminuye el consumo de agua comparado con el grupo control de ratas diabéticas ($p < 0.05$). En ambas etapas el frijol que presentó un menor consumo de agua fue el frijol PD al 50 % (hasta un 70 %), seguido de N al 50 % (hasta un 55 %).

8.2.4 Efecto del consumo de frijol sobre la ingesta de alimento en ratas Wistar sanas y diabéticas

Otra característica importante en la diabetes es la polifagia, es decir, un incremento en el consumo de alimento. La figura 8a corresponde a la cantidad promedio (g) de alimento consumido semanalmente por los grupos sanos y diabéticos. A este respecto, en la etapa inicial se observó que los animales diabéticos consumieron mayor cantidad de alimento (55 %) que los animales sanos. Por otro lado, los grupos diabéticos tratados con las harinas de frijol cocido consumieron una cantidad menor de alimento (hasta un 50 % menos) durante las semanas de tratamiento, con respecto a su control.

En la etapa avanzada los resultados se muestran en la figura 8b, en donde, a diferencia de la etapa inicial, a lo largo del tratamiento con las harinas de frijol no se observa ningún efecto sobre el alimento consumido, esto puede deberse a la severidad de la enfermedad ya que, como se mencionó, el frijol no reguló los niveles de glucosa sanguíneos y, por lo tanto, no se presentó un control del consumo de alimento.

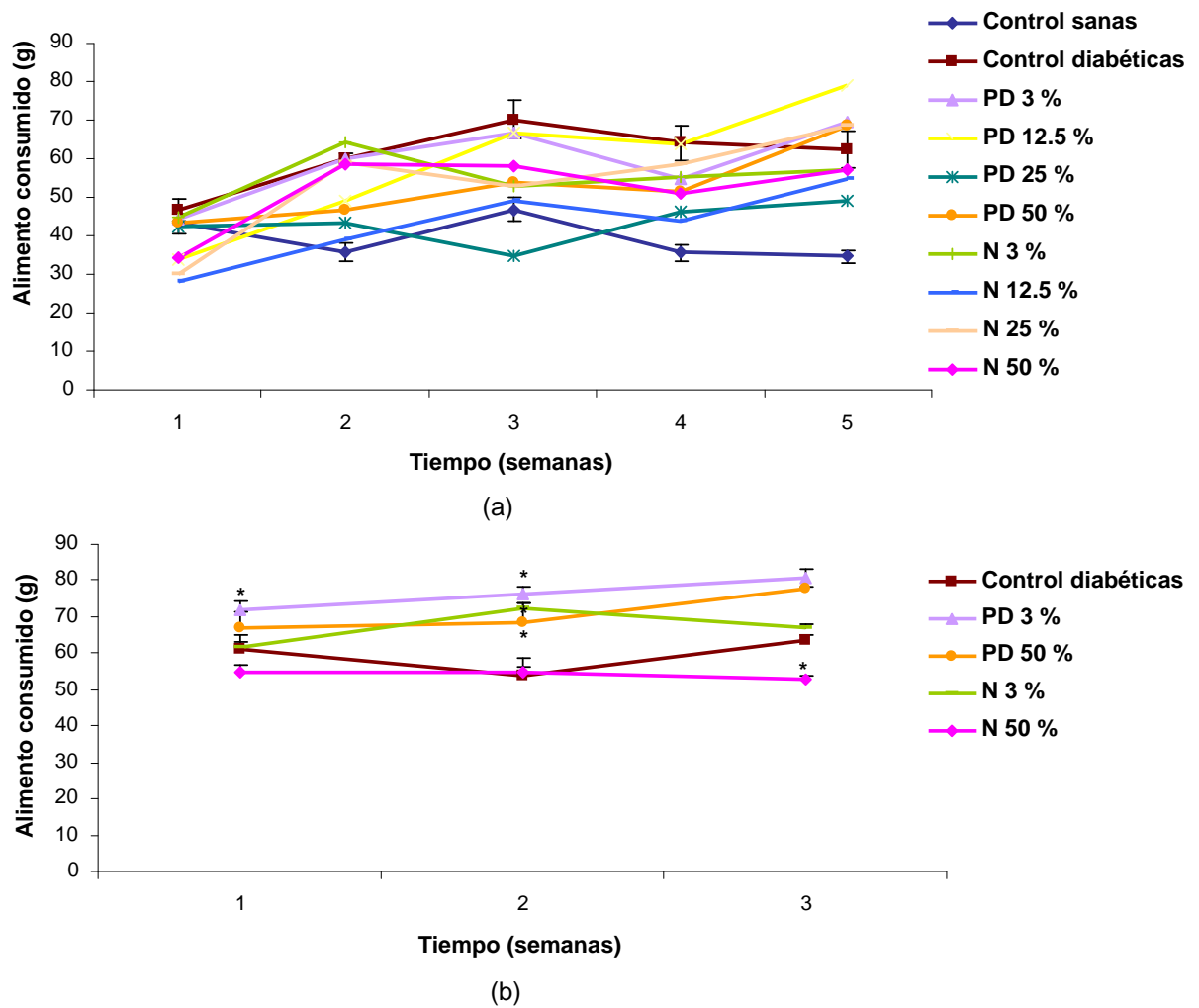


Figura 8. Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre la ingesta de alimento de ratas sanas y diabéticas en a) etapas iniciales y b) avanzadas de la enfermedad

Los valores se presentan como la media de los gramos consumidos de alimento. *Indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto al control (ratas diabéticas), analizados con la prueba de Dunnet. PD= Pinto Durango, N= Negro 8025.

Con los resultados obtenidos de la etapa inicial se puede sugerir que el frijol pudiera ejercer una sensación de saciedad producida por el contenido de fibra, o bien podría aumentar la concentración de insulina (Pari y col., 2003), mejorando así la expresión de péptidos anorexigénicos. La insulina inhibe la expresión de péptidos orexigénicos, encargados de inducir el hambre, además estimula la expresión de los anorexigénicos, los cuales provocan una sensación de saciedad (Milagro y col., 2002). Por lo tanto, si se incrementan los niveles de insulina, también se ve reflejado en una disminución en los niveles de glucosa, por lo que los resultados de ambas etapas corroboran lo mencionado anteriormente, ya que en la etapa inicial existe una disminución en los niveles de glucosa en sangre, así como del consumo de alimento, mientras que para la etapa avanzada hay regulación en los niveles de glucosa en sangre y tampoco se observa una disminución en el consumo de alimento.

Un control adecuado de la diabetes es importante, los cambios que ocurren en etapas tempranas pueden ser reversibles. Con el fin de disminuir el número de complicaciones de la diabetes y retrasar su desarrollo, se ha recomendado el uso de componentes biológicos activos presentes en plantas. Los principios activos biológicos más importantes para este propósito son vitaminas y minerales, proteínas, polisacáridos, lectinas, saponinas y flavonoides. Según datos científicos dentro de las plantas más empleadas con este fin se encuentra el frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Savickiene, 2002).

8.2.5 Efecto del consumo de frijol sobre el perfil de lípidos en ratas Wistar sanas y diabéticas

Además de los trastornos del metabolismo de la glucosa que caracterizan la diabetes mellitus, en los pacientes diabéticos suelen asociarse cambios en el patrón de los lípidos séricos que constituyen un riesgo importante desde el punto de vista vascular.

El daño vascular aterosclerótico es la complicación más común en los diabéticos. La enfermedad coronaria y la enfermedad cerebrovascular ocurren en el diabético en una frecuencia de 2 a 3 veces mayor que en aquellas personas que no padecen esta enfermedad. Estudios epidemiológicos destacan de manera especial que la frecuencia de insuficiencia arterial periférica es de 20 a 40 veces superior en los diabéticos en relación con las personas no diabéticas. Por lo tanto, los trastornos cardiovasculares en el diabético es no sólo mayor que en las personas no diabéticas, sino que además resulta más letal, sobre todo si se presenta acompañada de hipertensión arterial y albuminuria (Illnait, 1997).

La hipertrigliceridemia es la dislipidemia más frecuente en la diabetes. Es bien conocido que en la diabetes mellitus tipo 1, la deficiencia aguda de insulina 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 lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) en este órgano. Al mantenerse el déficit de insulina, se inhibe la síntesis de triglicéridos hepáticos y la formación y liberación de VLDL. Por otro lado, existe una deficiencia de la depuración de triglicéridos plasmáticos, bien por disminución de la actividad de la lipoproteína lipasa (LpL), enzima estimulada por insulina, o por una posible modificación estructural de las VLDL (que las hace menos susceptibles a la acción de la enzima), incrementando la concentración plasmática de esta lipoproteína. En la diabetes mellitus tipo 2, 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 (Illnait, 1997).

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 la enfermedad y mortalidad.

En el cuadro 5 se muestra el perfil lipídico correspondiente a la etapa inicial de experimentación. En cuanto a los niveles de triglicéridos podemos observar que existe un incremento significativo en el grupo de ratas diabéticas control (204 mg/dl) comparado con el grupo de ratas sanas (86 mg/dl), como era de esperarse. Ramesh y col. (2006) reportaron que las ratas sanas control tuvieron niveles de triglicéridos de 80 mg/dl y las ratas diabéticas de 180 mg/dl.

Cuadro 5. Concentración del perfil de lípidos en suero de ratas sanas y diabéticas (etapa inicial) alimentadas con diferentes concentraciones de frijol

	Triglicéridos	Colesterol total	HDL	LDL	VLDL
Control sanas	86.32 ± 11.43	52.27 ± 2.52	49.56 ± 4.17	12.34 ± 4.63	17.26 ± 1.86
Control diabéticas	204.64 ± 45.28	80.00 ± 6.64	34.67 ± 7.53	48.68 ± 6.11	40.92 ± 9.05
PD 3 %	161.63 ± 48.53	61.49 ± 7.61	45.52 ± 7.32	17.49 ± 6.24	32.32 ± 8.68
PD 12.5 %	142.02 ± 10.51	60.84 ± 4.06	54.76 ± 4.79*	10.33 ± 5.13 *	27.47 ± 2.10
PD 25 %	161.62 ± 35.87	55.13 ± 1.89 *	43.23 ± 3.91	10.02 ± 4.77 *	32.32 ± 7.17
PD 50 %	87.75 ± 18.69 *	51.59 ± 4.59 *	34.63 ± 4.83	13.72 ± 1.74 *	19.21 ± 3.72 *
N 3 %	91.02 ± 9.14 *	63.84 ± 8.43	42.72 ± 5.36	24.02 ± 4.75	18.20 ± 1.82 *
N 12.5 %	91.42 ± 13.34 *	64.97 ± 6.13	47.79 ± 0.77	26.68 ± 14.21	20.11 ± 2.66 *
N 25 %	48.80 ± 3.92 *	54.49 ± 5.22 *	43.25 ± 0.94	10.18 ± 2.93 *	9.76 ± 0.78 *
N 50 %	44.34 ± 6.84 *	63.76 ± 9.17	39.23 ± 3.51	26.17 ± 7.45	8.86 ± 1.36 *

Los valores se presentan como la media de la concentración (mg/dl) de triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL o VLDL en suero sanguíneo ± E.E. * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control (ratas diabéticas), analizados con la prueba de Dunnet. PD= Pinto Durango, N= Negro 8025

Con respecto a los niveles de triglicéridos en los grupos tratados con frijol PD la solo la concentración al 50 % los niveles significativamente, no siendo así para el frijol N, ya que este frijol produce una disminución a todas las concentraciones (hasta en un 78 %), aunque no es dosis dependiente. Se puede decir que a altas concentraciones de ambas variedades existe una regulación de

los niveles de triglicéridos, siendo mejor la variedad N para las etapas iniciales de la enfermedad. En este mismo contexto, podemos observar una tendencia similar a la disminución en los niveles de VLDL, por lo que en este estudio, la disminución de los niveles de VLDL y triglicéridos en sangre sugiere una protección a nivel vascular.

En cuanto al colesterol total (cuadro 5), al igual que los triglicéridos, el grupo de ratas sanas presenta una menor concentración de colesterol (52.27 ± 2.52 mg/dl), comparada con el grupo de ratas diabéticas control (80 ± 6.64 mg/dl). Se observa que las dietas con frijol disminuyen el colesterol total, siendo la concentración al 50% del frijol PD que presentó una menor reducción de este parámetro, alcanzando los niveles del grupo de ratas sanas. También el frijol N disminuyó los niveles, siendo significativo al 25 %.

La hipercolesterolemia en el paciente diabético podría deberse a un incremento en 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, lo cual explicaría una disminución de colesterol en las ratas tratadas con frijol.

Un parámetro de riesgo cardiovascular, son los niveles elevados de LDL en sangre. Por lo que en el cuadro 5 se puede observar que las ratas sanas presentan niveles bajos de LDL (12.34 ± 4.63 mg/dl) comparada con las ratas diabéticas control (48.68 ± 6.1 mg/dl) las cuales presentan hasta 4 veces más concentración de LDL, incrementando el riesgo cardiovascular. El tratamiento con frijol de ambas variedades produjo una disminución de LDL, para algunos grupos de frijol PD llegando a los niveles de las ratas sanas, y el frijol N redujo en un 50 % los niveles de LDL, a excepción del grupo N 25 % el cual tuvo una disminución hasta del 80 %.

Cuadro 6. Concentración del perfil de lípidos en suero de ratas diabéticas (etapa avanzada) alimentadas con diferentes concentraciones de frijol

	Triglicéridos	Colesterol total	HDL	LDL	VLDL
Diabéticas control	160.16 ± 7.65	85.28 ± 9.97	19.09 ± 0.44	53.29 ± 6.61	32.03 ± 1.53
PD 3 %	162.00 ± 3.37	60.48 ± 4.61 *	25.71 ± 3.91	42.83 ± 4.29	33.99 ± 1.15
PD 50 %	171.82 ± 13.58	49.83 ± 5.87 *	11.41 ± 0.77	53.53 ± 8.92	34.36 ± 2.71
N 3 %	164.39 ± 6.90	71.94 ± 8.80	25.61 ± 3.81	43.44 ± 10.65	32.87 ± 1.38
N 50 %	162.24 ± 6.57	58.17 ± 6.71 *	40.35 ± 8.38 *	26.19 ± 4.93 *	33.59 ± 1.59

Los valores se presentan como la media de la concentración (mg/dl) de triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL o VLDL en suero sanguíneo ± E.E. * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control de ratas diabéticas, analizados con la prueba de Dunnett. PD= Pinto Durango, N= Negro 8025.

Por otro lado, en la etapa avanzada (cuadro 6) podemos observar que no existe una regulación de los niveles de triglicéridos por lo que podemos sugerir que en nuestro estudio la regulación de estos está dada como ya se mencionó por la incorporación de glucosa al tejido adiposo. Debido a que en la etapa inicial si se observa una disminución de la glucosa y a su vez de los triglicéridos. Como ya se mencionó, el control de triglicéridos está dado por la incorporación de glucosa al tejido adiposo. Por ello, en la etapa inicial se observa una disminución de glucosa y a su vez de triglicéridos. Por otro lado, en la etapa avanzada no existe una regulación de los niveles de glucosa y tampoco de la concentración de triglicéridos. Sin embargo, si existe una disminución de la concentración de colesterol para los grupos alimentados con frijol PD al 3 y 50 % (hasta de un 42 %), así como para N al 50 % (31 %). Además, la alimentación con N 50 %, disminuye los niveles de LDL, así como incrementa los niveles de HDL.

La disminución de colesterol pudiera estar relacionado con la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), debido a que los carbohidratos indigestibles tales como la fibra soluble e insoluble, almidón resistente y los oligosacáridos presentes en el frijol pueden ser fermentados por la microflora colónica, dando origen a los AGCC como acético, propiónico y butírico. Los AGCC tienen efectos fisiológicos que repercuten sobre el metabolismo lipídico, ya que el

ácido propiónico se ha relacionado con la disminución de colesterol debido a la inhibición de la colesterogénesis, a través de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA) (Serrano y Goñi, 2004).

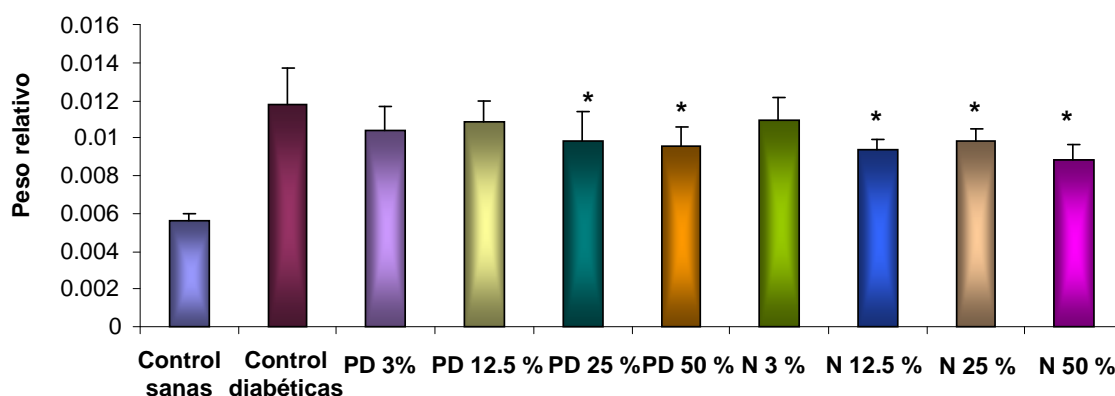
8.2.6 Efecto del consumo de frijol sobre el peso relativo de los riñones en ratas Wistar sanas y diabéticas

Una de las complicaciones propias de la diabetes es la nefropatía diabética, en donde una de las características más comunes es la hipertrofia de los riñones. Debido a que se mantiene elevada el azúcar en la sangre existe una mayor filtración de los riñones, debido a que hay un aumento del flujo de sangre y éstos se hacen más grandes. Por ello en este experimento se tomó en cuenta el peso de los riñones como un indicador del control de esta complicación.

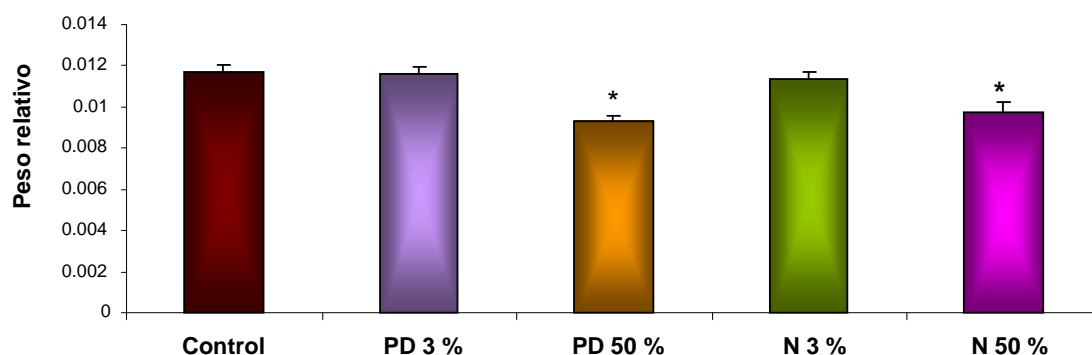
En la etapa inicial del experimento se puede observar que el peso relativo de los riñones de las ratas diabéticas (0.012) fue mayor comparado con el de las ratas sanas (0.005) ($p < 0.05$) (Figura 9a). Por otro lado, los grupos de ratas diabéticas a los que se les incorporó frijol en su dieta mostraron un menor peso de los riñones (16-25 %), siendo estadísticamente significativo para las concentraciones de 25 y 50 % para ambas variedades. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Yamabe y col., (2007), quienes observaron que en ratas Wistar macho diabéticas inducidas con estreptozotocina existe un aumento en el peso de los riñones respecto a las ratas sanas, y que la administración intragástrica de polifenoles extraídos de *Corni fructus* (20 mg/kg P.C.) a ratas diabéticas disminuye significativamente el peso de los riñones, sugiriendo que estas fracciones mejoran los cambios renales y la hipertrofia.

También, en la etapa avanzada se puede observar que también existe una disminución estadísticamente significativa del peso relativo de los riñones, en los grupos tratados para ambas variedades al 50 % (Figura 9b). Sin embargo, no se observa una regulación con respecto al control de la concentración de 3 %. Esto

puede deberse a la severidad de la enfermedad y a este nivel la protección se observa principalmente a mayores concentraciones de frijol. Este comportamiento protector se observa para ambas etapas, en donde se sugiere que ambas variedades de frijol producen una protección similar a altas concentraciones.



(a)



(b)

Figura 9. Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre el peso relativo de riñones de ratas sanas y diabéticas en a) etapas iniciales y b) etapas avanzadas

Los valores se presentan como el peso relativo de los riñones (peso de ambos riñones/peso corporal) \pm E.E. *Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control de ratas diabéticas, analizados con la prueba de Dunnet. PD= Pinto Durango, N= Negro 8025.

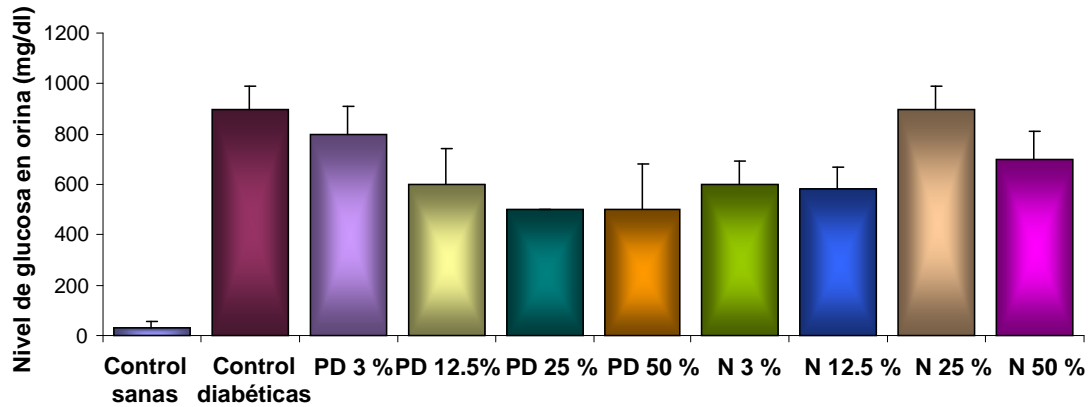
8.2.7 Efecto del consumo de frijol sobre la concentración de glucosa en la orina de ratas Wistar sanas y diabéticas

La determinación de glucosa en orina (glucosuria) suele formar parte del análisis de orina rutinario. En condiciones normales no debería haber glucosa en la orina, pero cuando la concentración en sangre de dicho carbohidrato supera un determinado límite (160-180 mg/dl), se elimina a través del riñón con la orina, ya que la cantidad de glucosa filtrada a través de los glomérulos excede a la capacidad máxima de resorción de los túbulos renales.

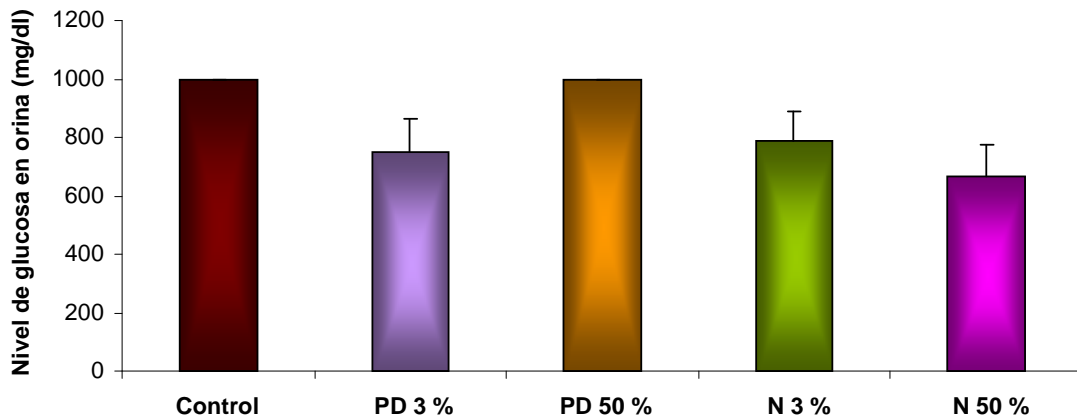
Los resultados correspondientes a los niveles de glucosa en la orina excretada durante 12 h de ratas sanas y diabéticas se muestran en la figura 10. En la etapa inicial (Figura 10a), se puede observar que las ratas diabéticas presentaron niveles de glucosa mayores (1000 mg/dl) que las ratas sanas (33 mg/dl) y aunque no estadísticamente significativo, se observa que los grupos alimentados con ambas variedades de frijol disminuyen los niveles de glucosa en orina hasta en un 50 % en las ratas diabéticas. Esto también derivado de una disminución en los niveles de glucosa en sangre, así mismo esta disminución de glucosa en orina se reflejó en un menor consumo de agua.

En la etapa avanzada (Figura 10b), se observa una disminución de los niveles de glucosa en orina (hasta en un 30 %); sin embargo, esta disminución tampoco fue estadísticamente significativa.

Cabe mencionar que es probable que no se observe una disminución estadísticamente significativa debido a que los intervalos de medición de la glucosa a través de las tiras reactivas son muy amplios y, por lo tanto, esto pueda estar originando un margen de error mayor. Sin embargo, con estos resultados, se puede sugerir que si existe una regulación de la glucosa en la orina.



(a)



(b)

Figura 10. Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre los niveles de glucosa en orina de ratas sanas y diabéticas en a) etapas iniciales y b) etapas avanzadas

Los valores se presentan como la media de la concentración (mg/dl) de los niveles de glucosa en orina \pm E.E. * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control de ratas diabéticas, analizados con la prueba de Dunnet. PD= Pinto Durango, N= Negro 8025.

8.2.8 Efecto del consumo de frijol sobre la concentración de albúmina en la orina de ratas Wistar sanas y diabéticas

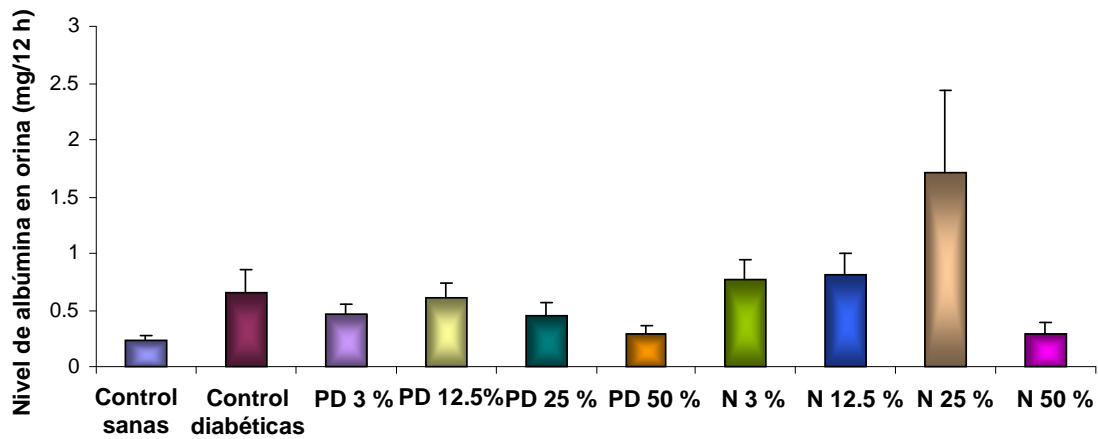
La nefropatía diabética es una enfermedad secundaria de la diabetes en la cual el riñón pierde la capacidad para funcionar apropiadamente. Esta condición se caracteriza por los niveles elevados de albúmina y presencia de proteína en la

orina. La nefropatía diabética es la causa más común de insuficiencia renal crónica (Atlas de la diabetes, 2002).

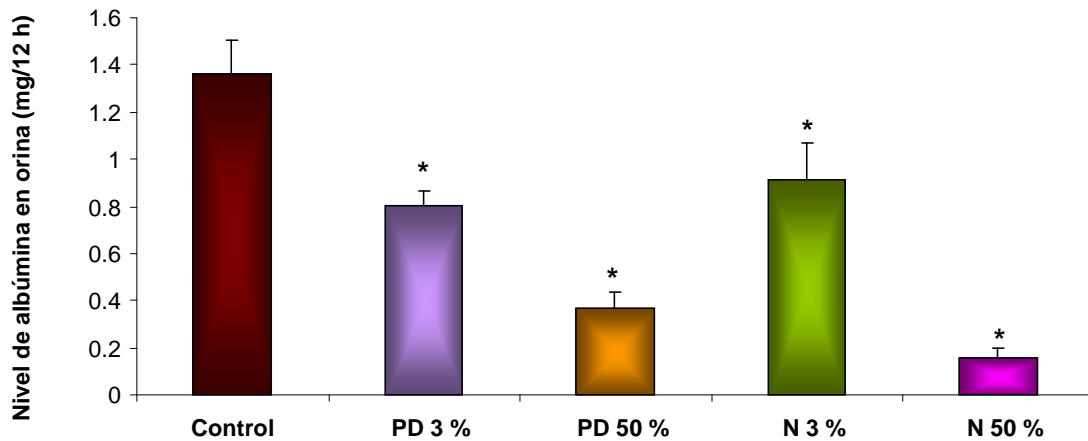
El primer cambio detectable en el curso de una alteración renal a causa de la diabetes es un engrosamiento en el glomérulo y durante esta etapa, el riñón comienza a permitir la salida a través de la orina de cantidades anormales de una proteína plasmática llamada albúmina. Así, los niveles de microalbuminuria en orina son un marcador de daño glomerular y se considera como un marcador de nefropatía progresiva (Wiseman y col, 1985). Por lo cual uno de los parámetros que se tomó en cuenta para evaluar el daño renal fue la presencia de albúmina en la orina.

En este estudio se midieron los niveles de albúmina en orina de 12 h en ratas sanas y diabéticas, encontrándose que para la etapa inicial (Figura 11a), los valores de las ratas diabéticas y sanas no son estadísticamente diferentes; así mismo, no existe diferencia estadística significativa entre los grupos tratados con ambas variedades de frijol y las ratas diabéticas control y sanas control.

A este respecto podemos observar que los niveles de albuminuria de las ratas diabéticas control en la etapa avanzada (1.36 mg/12 h) son mayores comparados con los niveles de la etapa inicial (0.65 mg/12 h); en donde, como ya se mencionó anteriormente, la diabetes de la etapa avanzada fue inducida con una dosis de STZ mayor (55 mg/kg), por lo que en base a los resultados obtenidos, en la etapa inicial no se observa un daño a nivel renal, durante el período de experimentación. Además, esta etapa no mostró niveles detectables de proteína en la orina; no siendo así para los animales de la etapa avanzada. Estos datos concuerdan con lo reportado por Ambriz y col. (2007), quienes evaluaron los niveles de albúmina urinaria de ratas Wistar macho diabéticas después de 45 días de inducidas con 45 mg/kg STZ y encontraron niveles de 0.3-0.7 mg/12 h de albúmina, en ese mismo estudio realizaron análisis histopatológicos, y concluyen que a este dosis de STZ no hubo cambios morfológicos y estructurales del riñón.



(a)



(b)

Figura 11. Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre los niveles de albúmina en orina de ratas sanas y diabéticas en a) etapas iniciales y b) etapas avanzadas

Los valores se presentan como la media de la concentración (mg/12 h) de los niveles de albúmina en orina \pm E.E. *Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control de ratas diabéticas, analizados con la prueba de Dunnett. PD= Pinto Durango, N= Negro 8025.

En la etapa avanzada del experimento (Figura 11b), el consumo diario de frijol incorporado en la dieta de las ratas produce una disminución de los niveles de albúmina urinaria, comparada con grupo control de ratas diabéticas, ofreciendo

mayor protección a altas concentraciones de ambas variedades. Se ha reportado que la albuminuria puede estimular la producción tubular e intersticial de factores de crecimiento y citocinas involucradas con el daño renal (Gómez-Fernández, 2004), por lo que una disminución en este parámetro es importante para evitar la progresión de esta complicación.

La microalbúmina es un poderoso predictor de riesgo renal. Niveles elevados de albúmina en la orina aumenta progresivamente el riesgo de desarrollar a macroalbuminuria y de presentar eventos cardiovasculares. Por lo que la disminución de la albúmina en orina no solamente protege al riñón, si no también al sistema cardiovascular (Userpater y col., 2004).

8.2.9 Efecto del consumo de frijol sobre la concentración de proteína en la orina de ratas Wistar diabéticas

En la etapa inicial no se encontraron niveles detectables de proteína en la orina de ratas diabéticas, sin embargo, para la etapa avanzada, en donde la diabetes es inducida con 55 mg/kg de STZ, se observaron niveles de proteína en la orina, debido a que la severidad de la enfermedad es proporcional a la dosis de diabetógeno empleada, por lo que las ratas se sacrificaron a la tercer semana de tratamiento. En esta etapa a pesar de que la evolución de la enfermedad fue acelerada, si se pudo observar una protección del frijol con respecto a este marcador de daño renal.

La figura 12 muestra la concentración de proteína en orina de 12 h de ratas alimentadas con dos variedades de frijol a diferentes concentraciones, observándose que a pesar de incorporar bajas concentraciones de frijol en la alimentación de las ratas, existe una disminución no estadísticamente significativa de los niveles de proteína. Sin embargo, para las concentraciones de ambas variedades (PD y N) al 50 %, no existen niveles detectables de orina, lo que significa que los compuestos presentes en el frijol evitan que el daño renal

evolucione a proteinuria, lo cual nos indica que aun a etapas a avanzadas de la enfermedad, el consumo de frijol ayuda a evitar el desarrollo de la nefropatía diabética.

El consumo de ambas variedades de frijol también regula los niveles de albúmina en orina, lo cual corrobora que la enfermedad no está evolucionando de albuminuria a proteinuria, esto es muy importante ya que al observar proteinuria en un paciente diabético significa que el daño es más avanzado, por lo que mejorar estos parámetros nos habla de un control de dicha complicación.

En un estudio realizado por Yamabe y col. (2006), demostraron que la administración oral a ratas diabéticas, de un compuesto fenólico extraído del té verde a una dosis de 100 mg/kg de peso corporal, disminuye parámetros de daño renal como la proteína urinaria.

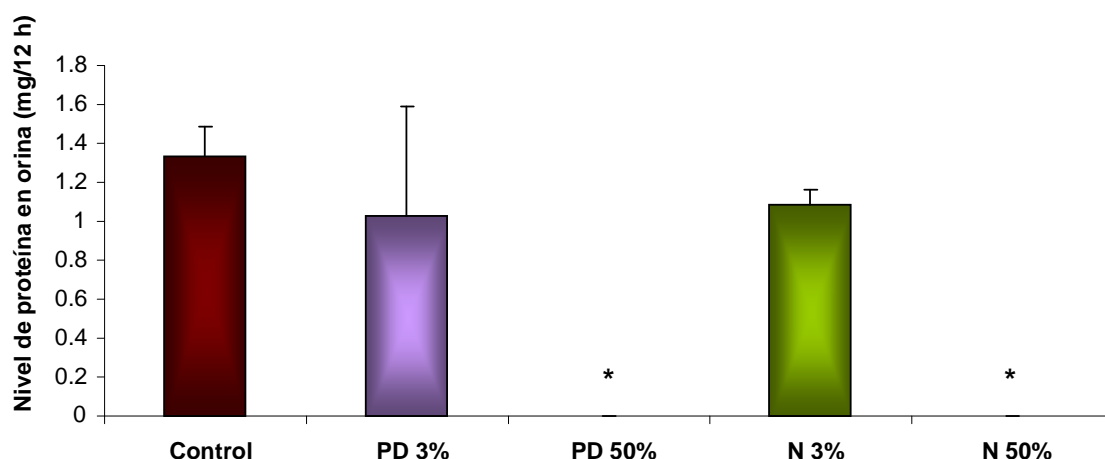


Figura 12. Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre los niveles de proteína en orina de ratas diabéticas en etapa avanzada

Los valores se presentan como la media de la concentración (mg/12 h) de los niveles de proteína en orina \pm E.E. * Indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto al control, analizados con la prueba de Dunnet. PD= Pinto Durango, N= Negro 8025.

8.2.10 Efecto del consumo de frijol sobre los niveles de sodio y potasio en la orina de ratas Wistar diabéticas

Los glomérulos del riñón son los responsables de la producción de orina a partir de la elaboración de ultrafiltrado plasmático. A lo largo de su recorrido por la nefrona, sistemas enzimáticos complejos se encargan de recapturar sodio, agua, glucosa y aminoácidos, en tanto que otros favorecen la secreción a la luz tubular de ácidos orgánicos, potasio y urea en la orina. La aparición anormal de algunas sustancias en la orina es un índice de daño en la estructura de la nefrona (Tortora y col., 1993).

En la diabetes, la concentración de algunos iones puede verse alterada, principalmente de Na^+ y K^+ en la orina, por lo cual, en este estudio se midieron como otro parámetro para evaluar el daño renal. En la etapa inicial de este estudio no se presentó una diferencia estadística significativa entre el grupo de ratas sanas y diabéticas, esto sugiere que no existe una descompensación de los iones sodio y potasio, por lo cual nuevamente se comprueba que en la etapa inicial no se puede observar un daño a nivel renal.

Por otro lado, en la etapa avanzada del experimento (Figura 13), solo se observa un incremento en los niveles de potasio para el grupo alimentado con frijol PD 50 % (2310 ppm/l) comparado con el grupo control (1353 ppm/l), sin embargo en esta etapa no se cuenta con un grupo control de ratas sanas, por lo cual no se pudieron comparar los niveles de estos iones y poder concluir sobre este parámetro.

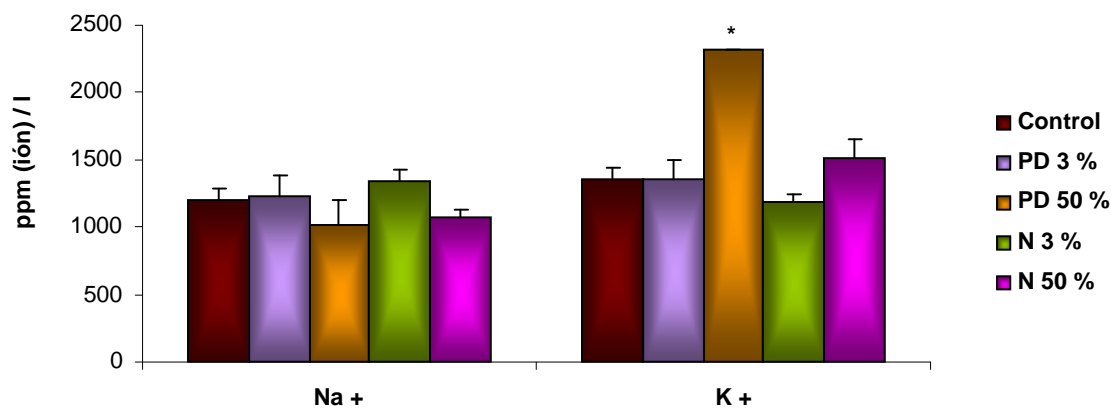


Figura 13. Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre los niveles de sodio y potasio en orina de ratas diabéticas en etapa avanzada

Los valores se presentan como la media de la concentración de iones (ppm/l) de los niveles de sodio y potasio en orina \pm E.E. * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control, analizados con la prueba de Dunnet. PD= Pinto Durango, N= Negro 8025.

8.2.11 Efecto del consumo de frijol sobre los niveles de IL-6 y TNF- α en suero de ratas Wistar diabéticas

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 proinflamatorias IL-6 y TNF- α en el suero de las ratas de la primera y etapa avanzada. Se pudo corroborar que en este modelo animal de diabetes, las citocinas están involucradas en el progreso o evolución del daño renal, ya que en la etapa inicial no se presentaron cambios en los marcadores bioquímicos de daño renal, tales como; albúmina, proteína y iones Na⁺ y K⁺ y tampoco se presentaron incrementos en las concentraciones de las citocinas IL-6 y TNF- α . En la etapa avanzada los valores de las citocinas séricas de los animales diabéticos fueron 100 pg/ml y 110 pg/ml comparados con los animales sanos 60 pg/ml y 12 pg/ml para IL-6 y TNF- α , respectivamente. Con lo anterior, se comprueba que las

citocinas están relacionadas con el daño renal, y que una disminución de estas podría mejorar esta complicación.

En la figura 14 se observa que existe una disminución de los niveles de IL-6 (26 %) para los grupos alimentados solamente con frijol negro a las dos concentraciones, sin embargo, las concentraciones de TNF- α fueron reguladas con ambas variedades, tanto a bajas (69-79 %) como a altas concentraciones (55 %). Esto nos indica que la incorporación de frijol en la dieta de las ratas ayuda a disminuir estas citocinas relacionadas con el daño renal.

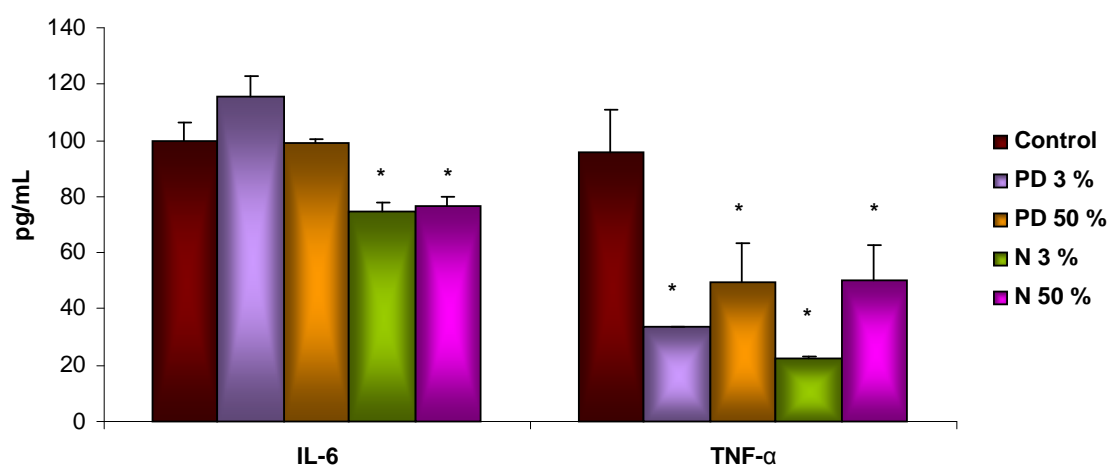


Figura 14. Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre los niveles de IL-6 y TNF- α en suero de ratas diabéticas en etapas avanzadas

Los valores se presentan como la media de la concentración (pg/ml) de los niveles de IL-6 y TNF- α en suero \pm E.E. * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control, analizados con la prueba de Dunnet. PD= Pinto Durango, N= Negro 8025.

Debido a que el frijol no reguló los niveles de glucosa en los animales diabéticos inducidos con 55 mg/kg, pero si ejerció una disminución de las citocinas y de daño renal, los resultados sugieren que el mecanismo de acción del o los componentes de esta leguminosa frijol pudieran estar relacionados con actividades antioxidantes, disminuyendo el estrés oxidativo producido por los altos niveles de glucosa en sangre.

8.2.12 Efecto del consumo de frijol sobre glutatión-S-transferasa y glutatión reducido en riñón de ratas Wistar diabéticas en etapa avanzada

Se ha demostrado que el aumento en el daño oxidativo a biomoléculas, la insuficiente capacidad de reparación de las lesiones producidas y la disminución en el nivel y actividad de enzimas y antioxidantes exógenos, son factores que contribuyen en la etiopatogenia de enfermedades como diabetes y sus complicaciones, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, enfermedades del sistema inmune e inflamación, entre otras (Beristan-Pérez y col., 2006).

El estrés oxidativo es controlado por mecanismos de defensa celular, que consisten en sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Los niveles de estos mecanismos de defensa antioxidante se ven alterados en la diabetes y además de que la ineficiente eliminación de los radicales libres juega un papel importante en el daño a tejidos (Schulz y col., 2005).

La enzima glutatión-S-transferasa (GST) y el cofactor glutatión reducido (GSH) se consideran como unas de las principales defensas del organismo contra el estrés oxidativo; sin embargo, en la diabetes dichos parámetros se ven severamente afectados, ya que disminuyen sus niveles tanto en suero como en órganos (Young y col., 2001). Por lo que, una disminución del estrés oxidativo, a través del tratamiento con antioxidantes, puede ser una estrategia efectiva para reducir las complicaciones de la diabetes (Schultz y col., 2005). Por lo tanto, se midió la actividad de la enzima GST y su cofactor GSH, para evaluar la actividad antioxidante del frijol.

Debido a que únicamente en la etapa avanzada se observó el daño renal y que el frijol produjo una protección sobre este daño, se realizó el estudio de la actividad de GST y su cofactor GSH, para poder determinar si el consumo de frijol produce un efecto antioxidante en el riñón y, por lo tanto, contribuir en la disminución del daño renal.

En la figura 15 se muestran los resultados obtenidos para la actividad de GST en los grupos experimentales correspondientes a la etapa avanzada. En donde se puede observar que existe un incremento significativo de los niveles de esta enzima antioxidante para ambas variedades y a las dos concentraciones (3 y 50 %) comparados con el grupo control de ratas diabéticas, presentando una mayor actividad las ratas alimentadas con frijol N 50 % (1.5 veces) comparado con el diabético. Lo anterior coincide con una mayor protección en los parámetros evaluados para el daño renal y también el frijol PD al 50 % ejerce mayor protección; sin embargo, el frijol N 50 % presenta menor concentración de albúmina que el PD 50 %, e igualmente se puede observar esta tendencia en la actividad enzimática, siendo estadísticamente diferentes PD 50 % y N 50 %. Los resultados sugieren que, los componentes bioactivos del frijol podrían estar ejerciendo actividad antioxidante en el riñón disminuyendo así la evolución del daño renal, evitando que progrese a proteinuria.

Venkateswara y col. (2001), realizaron un estudio con un extracto de la vaina de *Phaseolus vulgaris* y encontraron que existe una disminución del cofactor GSH así como de la enzima GST en ratas diabéticas inducidas con STZ, comparadas con ratas sanas. Por otro lado, observaron que la administración diaria del extracto de frijol produjo un incremento significativo en los niveles de GSH y GST en el riñón de ratas diabéticas. Los resultados sugieren que el incremento de esta enzima antioxidante y su cofactor implican que este potencial de defensa antioxidante es reactivado por los agentes bioactivos presentes en el frijol.

En cuanto a la concentración de GSH, se puede observar en la figura 16 que los niveles del grupo control de ratas diabéticas es significativamente menor comparado con los grupos alimentados con frijol. El consumo de frijol incrementa los niveles de GSH hasta cinco veces más, comparado con el grupo control de ratas diabéticas. Siendo mayor la concentración de los grupos de frijol N, a ambas concentraciones.

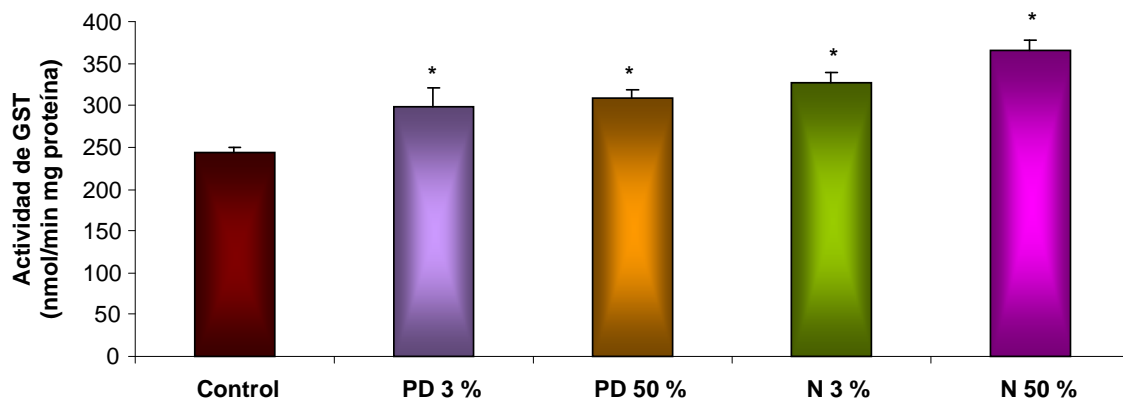


Figura 15. Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre la actividad de GST en riñón de ratas diabéticas en etapas avanzadas

Los valores se presentan como la media de actividad de GST (nmol/min mg proteína) en riñón \pm E.E. * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control, analizados con la prueba de Dunnet. GST= glutatión-S-transferasa, PD=Pinto Durango, N= Negro 8025.

En la diabetes, el estrés oxidativo se puede atribuir a la combinación de glicoxidación inducida por hiperglicemia, activación de la vía del sorbitol, y disminución de la síntesis de GSH, debido al limitado desfogue a la vía de las pentosas.

En un estudio realizado con ratas diabéticas inducidas con STZ, se evaluó el efecto de proantocianidinas en el estrés oxidativo, y se reportó que los niveles de GSH en riñón es menor en ratas diabéticas comparado con animales sanos y que estas concentraciones se incrementan con el tratamiento con proantocianidinas, disminuyendo así el estrés oxidativo (Lee y col., 2007).

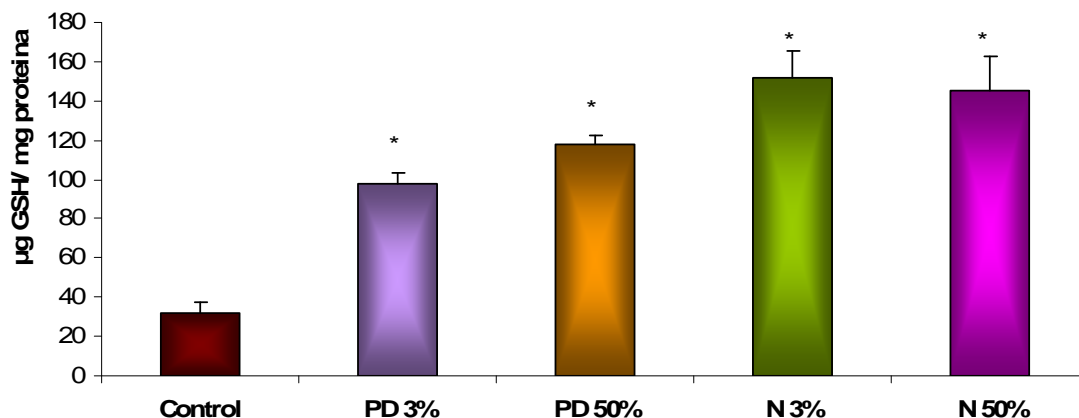


Figura 16. Efecto del consumo de dos variedades y diferentes concentraciones de frijol cocido incorporado a la dieta sobre la concentración de GSH en riñón de ratas diabéticas en etapas avanzadas

Los valores se presentan como la media de la concentración de GSH ($\mu\text{g GSH/mg proteína}$) en riñón \pm E.E. * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control, analizados con la prueba de Dunnet. GSH= glutatión reducido, PD=Pinto Durango, N= Negro 8025.

Debido a que en la etapa avanzada no se observa una regulación de los niveles de glucosa, se sugiere que el consumo de frijol es responsable evitar el progreso del daño renal debido a su capacidad antioxidante lo que a su vez pudo corroborarse con un incremento en el sistema de defensa antioxidante endógeno, medido por la enzima GST y su cofactor GSH.

8.2.13 Efecto del consumo de frijol sobre la expresión de NF- κ B citosólica y nuclear en riñón de ratas Wistar diabéticas

En los últimos años se ha sugerido que el proceso de inflamación crónica, es importante en la patología y las complicaciones de la diabetes. Dentro del proceso de inflamación está involucrada la síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias, responsables de activar factores de transcripción en las células, que su vez aumentan la síntesis de proteínas inflamatorias (Alexandraki y col., 2006).

Uno de los blancos intracelulares de la hiperglicemia y el estrés oxidativo es la activación de NF- κ B. NF- κ B se encuentra inactivo en el citoplasma, ligado a una proteína inhibitoria I κ B. Después de que es activado por citocinas se transloca al núcleo y posteriormente activa genes involucrados con el daño renal, por tal motivo, se determinó la expresión de este factor en ambos compartimentos celulares.

Con el objetivo de conocer el posible mecanismo de acción que llevó a cabo el consumo diario de frijol sobre la disminución del daño renal, se determinó la expresión del factor de transcripción NF- κ B tanto en núcleo como en el citoplasma del riñón de ratas diabéticas de la etapa avanzada (55 mg/kg STZ). En la figura 17 se observa la expresión de NF- κ B en la fracción nuclear del riñón de ratas diabéticas, la cual muestra una tendencia a disminuir siendo significativa para el grupo alimentado con frijol PD 50 % (26 %) respecto al grupo control. Por otro lado, también se presentan los resultados de la expresión de NF- κ B en la fracción del citoplasma de riñón, donde se puede observar que existe un aumento en la expresión de este factor de transcripción, nuevamente significativa para el grupo PD 50 % (1.5 veces) así mismo para el frijol N al 3 y 50 % (1.8 y 2.2 veces, respectivamente), comparados con el grupo control de ratas diabéticas. Estos resultados sugieren que el consumo de frijol PD al 50 % ayuda a disminuir el daño renal de ratas diabéticas a través de mantener a NF- κ B inactivo en el citoplasma, evitando su translocación al núcleo y así mismo se comprueba con una menor expresión en el núcleo.

Por otro lado, el frijol N a pesar de no regular NF- κ B en núcleo, si incrementa la expresión en citoplasma, lo que sugiere, que si bien existe una concentración en el núcleo una mayor parte se encuentra inactivo en el citoplasma. Además NF- κ B se ha correlacionado con el grado de severidad de albuminuria en pacientes diabéticos con complicaciones, por lo que una disminución de este factor y/o incremento en el citoplasma, correlaciona con un menor daño renal (Hofmann y col., 1999). Respecto a esto, recientes

investigaciones sugieren que los polifenoles pueden actuar modificando las vías de transducción de señales, ejerciendo de esta manera sus efectos benéficos, por ejemplo se ha mostrado que los polifenoles ejercen su actividad antiinflamatoria modulando la activación de NF- κ B, actuando en diferentes puntos del proceso de esta activación (inhiben activación de IKK, evitan degradación de I κ B) (Santangelo y col., 2007).

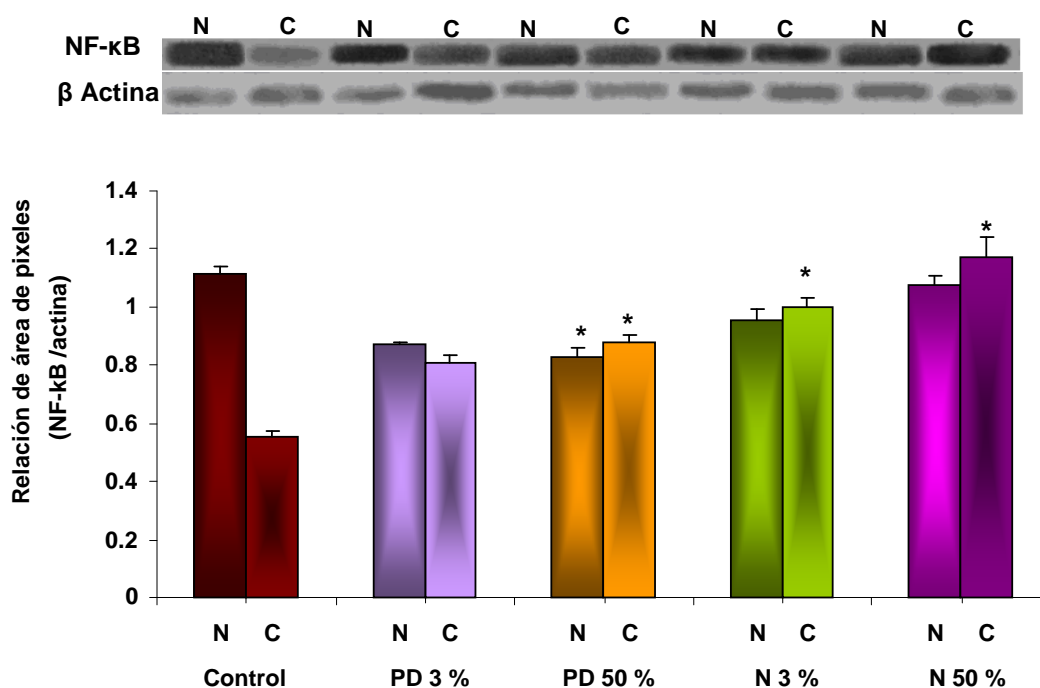


Figura 17. Efecto del consumo de dos variedades frijol cocido a diferentes concentraciones incorporado a la dieta sobre la expresión de NF- κ B en el núcleo y citoplasma de riñón de ratas diabéticas en etapas avanzadas

Los valores se presentan como la media de la relación del área de pixeles \pm E.E. * Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control, analizados con la prueba de Dunnet. PD= Pinto Durango, N= Negro 8025. N) NF- κ B nuclear C) NF- κ B citosólica.

8.2.14 Efecto del consumo de frijol sobre la expresión de I κ B- β en riñón de ratas Wistar diabéticas en etapas avanzadas

Como ya se mencionó, la activación de NF- κ B requiere la disociación de su inhibidor I κ B en citoplasma y su posterior translocación al núcleo. I κ B presenta varias isoformas como I κ B α y la isoforma I κ B β , que se encargan de regular la activación de NF- κ B. Para que NF- κ B se separe de su inhibidor y se dirija al núcleo, es necesario que los I κ B's sean fosforilados por cinasas de I κ B, conocidas como IKKs. Por lo que se sabe que el principal inhibidor de NF κ B es I κ B α , el cual al ser fosforilado se separa de NF- κ B y posteriormente es degradado (Xioa, 2003). NF- κ B una vez en el núcleo, además de unirse a sitios específicos para la transcripción de proteínas inflamatorias, también favorece la resíntesis de I κ B- α , el cual se vuelve a unir a NF- κ B y el complejo se transporta de nuevo al citoplasma donde NF- κ B se encuentra de nuevo inactivo. I κ -B β también se une a NF- κ B en el citoplasma; sin embargo, a diferencia de I κ B α , éste no se separa de NF- κ B al ser fosforilado y éste complejo se transloca al núcleo donde se une al ADN (Hertlein, 2005). Por lo cual en este estudio se midió la expresión de IK- κ β y los resultados se presentan en la figura 18, observándose que existe una disminución en la expresión de IK- κ β para el frijol PD 50 % y con ambas concentraciones de frijol N; así mismo, esta variedad disminuyó los niveles de IL-6 en sangre, lo cual nos sugiere que la disminución de la expresión de IK- κ β y NF- κ B en núcleo así como el incremento en la expresión de NF- κ B en citoplasma puede ser un mecanismo por el cual el frijol disminuya el estado inflamatorio en los pacientes diabéticos. Se ha reportado que los polifenoles inhiben o suprimen la activación de IK- κ β .

Retomando el dato del frijol PD 3 %, en esta concentración no se observa ninguna regulación de NF- κ B tanto nuclear y citosólico, por lo que tampoco una regulación de IK- κ β , lo cual nos puede sugerir que el mecanismo por el cual el frijol disminuye los parámetro de daño renal pudiera ser por la regulación de ambos factores tanto el factor de transcripción como IK- κ β , debido a que si no se ven regulados tampoco disminuyen los parámetros de daño renal como en el caso del grupo PD 3 %.

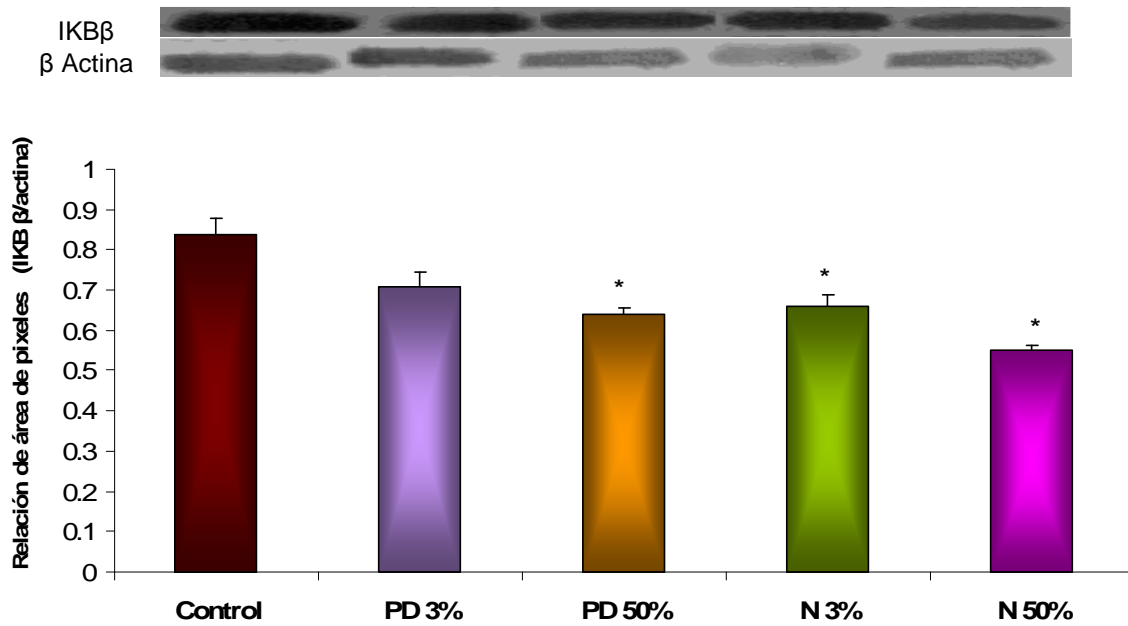


Figura 18. Efecto del consumo de dos variedades frijol cocido a diferentes concentraciones incorporado a la dieta sobre la expresión de IK-k β en riñón de ratas diabéticas en etapas avanzadas

Los valores se presentan como la media de la relación del área de pixeles \pm E.E. *Indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con respecto al control, analizados con la prueba de Dunnet. PD= Pinto Durango, N= Negro 8025.

9. CONCLUSIONES

La disminución de triglicéridos observada únicamente en la etapa inicial de la diabetes puede ser atribuida al efecto hipoglucémico producido por el frijol N y PD. La regulación de estos parámetros está en función de la evolución de la enfermedad.

La incorporación de frijol PD y N a la dieta de ratas diabéticas, a partir del 25 %, disminuye los niveles de colesterol séricos en ambas etapas de la enfermedad, independientemente del control de los niveles de glucosa. Por lo que el consumo de frijol puede ser una alternativa para disminuir el riesgo cardiovascular asociado a diabetes.

Los parámetros empleados para la evaluación de daño renal fueron significativos solamente para la etapa avanzada (55 mg/kg STZ). En esta etapa se observó que el consumo de frijol de ambas variedades incorporado a la dieta al 3 y 50 % disminuye los niveles de microalbúmina en orina. Este efecto está relacionado con una menor concentración sérica de TNF- α , adicionalmente, la dieta con frijol N también disminuye IL-6.

La incorporación de frijol a la dieta podría disminuir el estrés oxidativo del riñón al incrementar la concentración de GSH y la actividad de la enzima GST, principalmente en aquellos animales que fueron tratados con N.

La menor concentración de TNF- α en suero está relacionada con una menor actividad de NF-kB y menor expresión de IKB β en el riñón de los animales alimentados con ambas variedades de frijol.

Ambas variedades de frijol son capaces de regular el daño renal relacionado con inflamación en animales diabéticos, presentando mayor protección los animales alimentados con frijol N.

El consumo de frijol a bajas y altas concentraciones produce efectos hipoglucemiantes, hipolipidémicos y antiinflamatorios en un modelo de diabetes.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aal, E. S. M., Hucl, P. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem.* 76:350-354.
- Adams, S. M., Standridge, J. B. 2006. What should we eat? Evidence from observational studies. *South Med. J.* 99(7):744-748.
- Agostini, L. R., Morón, M. J., Ramón, A. N., Ayala, A. 2004. Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente. *ALAN.* 54:89-92.
- Aguilar, A., Rull, J. A., García, E., Zúñiga, S., Vázquez, C., Palacios, A., Frati, A., Altamirano, E., Herrera, M., Rosas, J. 2000. Concenso mexicano para la prevención de las complicaciones crónicas de la diabetes tipo 2. *Res. Invest. Clin.* 52:325-363.
- Aguilar-Salinas, C. A., Velazquez Monroy, O., Gómez-Pérez, F. J., González Chávez, A. G., Esqueda, A. L., Molina Cuevas, V. 2003. Characteristics of patients with type 2 diabetes in México: Results from a large population-based nationwide survey. *Diabetes Care.* 26:2021-2026.
- Aguilar Raymundo, V. G. 2008. Efecto de los extractos acuosos de diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) sobre células normales intestinales tratadas con TNF- α . Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.

- Alexandraki, K., Piperi, C., Kalofoutis, C., Singh, J., Alaveras, A., Kalofoutis, A. 2006. Inflammatory process in type 2 diabetes the role of cytokines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1084:89-117.
- 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 México. *Public Health.* 119:711-20.
- Arreola Ortiz, J. F., Partida Hernández, G. 2005. Diabetes Mellitus. "Etiopatogenia, cuadro clínico y diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 1". Tercera Edición. Edit. McGraw-Hill. Sección II. Cap. 5. p. p. 109-119.
- Arts, M., Haenen, G., Voss, H. P., Bast, A. 2003. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chem. Tox.* 42:45-49.
- Atlas de la diabetes. Ian, N. Scobie, M. D. 2002. Medway maritime hospital. 2a. edición. The encyclopedia. 7-31.
- Avila-Curiel, A., Shamah-Levy, T., Galindo-Gómez, C., Cuevas-Nasu, L., Moreno-Macías, H. Chávez-Villasana, A. 2007. Diabetes mellitus within low socioeconomic strata in México City: a relevant problem. *Rev. Invest. Clin.* 59:246-55.

- Bennett, P. H., Knowler, W. C. 2001. Joslin's Diabetes Mellitus. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and glucose metabolism. 13th edition. C. Ronald Kahn and Gordon C. Weir; eds. Lea & Febiger. Philadelphia. 19:331-339.
- 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. Nature. 414:813-819.
- Cavallé de Moya, C., Grant, G., Frühbeck, G., Urdaneta, E., García, M., Marzo, F., Santirdrián, S. 2003. Local (gut) and systemic metabolism of rats is altered by consumption of raw bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *athropurpurea*). British J. Nutr. 89:311-318.
- Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G. 2005. Actividad antioxidante en seis cultivares de frijol común. Participación de la mujer en la ciencia.
- Castellanos, J. Z., Guzmán, H., Jiménez, A., Mejía, C., Muñoz, J. J, Acosta, J. A., Hoyos, G., López, E., González, D., Salinas, R., González, J., Muñoz, J. A., Fernández, P., Cáceres, B. 1997. Hábitos preferenciales de los consumidores de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. ALAN. 47:163-167.
- 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.

- Desphande, 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. Jr., Castaño-Tostado, E., Paredes-López, O. 2006. Chemical components and health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54:2045-2052.
- DiPetrillo, K., Coutermarsh, B., Gesek, F. A. 2003. Urinary tumor necrosis factor contributes to sodium retention and renal hypertrophy during diabetes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 284:113-121.
- Egido, J., Hernández-Presa, M. A., Tuñón, J., Blancocolio, L. M., Ortego, M., Susuki, Y., Plaza, J. J., Guijarro, C. 2000. Cardiovascular risk factors. 9:92-102.
- Eknoyan, G. 2007. Obesity, diabetes and chronic kidney disease. *Curr. Diab. Rep.* 7:449-53.
- Escobedo de la Peña, J. 2005. Diabetes Mellitus. "Epidemiología de la diabetes mellitus". Tercera Edición. Edit. McGraw-Hill. Sección I. Cap. 2. p. p. 21-31.
- Escobedo de la Peña, J., Rico Verdín, B. 1996. Incidencia y letalidad de las complicaciones agudas y crónicas de la diabetes mellitus en México. *Salud Pública Mex.* 38:236-242.
- Espinoza-Alonso, L. G., Lygin, A., Widholm, J. M., Valverde, M. E., Paredes-Lopez, O. 2006. Polyphenols in wild and weedy 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.

Federación Mexicana de Diabetes. 2003. Control total de la diabetes para el médico tratante. Editorial Intersistemas, S. A. de C. V. México, D. F.

Fernández, J. M., Ricart, W. 2003. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr. Rev.* 24:278-301.

Flores Martínez, S. E., Machorro Lozano, M. V., García Zapién, A. G., López Cardona, M. G., Morán Moguel, M. C., Sánchez Corona, J. 2005. Diabetes Mellitus. "Epidemiología molecular en la diabetes mellitus y sus complicaciones". Tercera Edición. Edit. McGraw-Hill. Sección I. Cap. 3. p. p. 35-69.

Foster-Powel, K., Holt, S., Brand-Miller, J. 2002. International table of glycemic index and glycemic load values. *Am. J. Clin. Nutr.* 76:5-56.

Ginsberg, H. N. 2000. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* 106:453-458.

Goldberg, I. 1994. Functional Food: designer food. Phermafoods, nutraceuticals. Editorial Chapman and hall. p. p. 3-18.

Guía Mexicana de Diabetes. Dr. Joel Rodríguez Saldaña. 2005.

Guyton, A. 1999. Tratado de fisiología médica. "Insulina, glucagón y diabetes mellitus.", 8ª edición. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. 78:1063-1077.

- Guzmán M., S. H., Paredes L., O. 1998. Functional products of plant indigenous to Latin America, quinoa, common beans and botanicals. *Functional Foods. Biochemical and processing Aspects*. G. Mazza, Technomic, Lancaster. 239-328.
- Hayes, M. G., Pluzhnikov, A., Miyake, K., Sun, Y., Ng, M. C., Roe, C. A., Below, J. E., Nicolae, R. I., Konkashbaev, A., Bell, G. I., Cox, N. J., Hanis, C. L. 2007. Identification of type 2 diabetes genes in Mexican Americans through genome-wide association studies. *Diabetes*. 56:3033-3044
- Hoffman, B. B., Sharma, K., Zhu, Y., Ziyadeh, F. N. 1999. Transcriptional activation of transforming growth factor-beta1 in mesangial cell culture by high glucose concentration. *Kidney Int*. 54:1107-1116.
- Hwang, J. S., Wu, T. L., Chou, S. C., Ho, C., Chang, P. Y., Tsao, K. C., Huang, J. Y., Sun, C. F. Wu, J. T. 2008. Development of multiple complications in type 2 diabetes is associated with the increase of multiple markers of chronic inflammation. *J. Clin. Lab. Anal*. 22:6-13.
- Illnait, P. J. 1997. La dislipidemia en el paciente diabético. Parte I: Bioquímica patológica. *Rev. Cubana Med. Gen. Integr*. 13:372-377.
- Iniestra-González, J. J., Ibarra-Pérez, F. J., Gallegos-infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo R. F. 2005. Factores antinutricios y actividad antioxidante en variedades mejoradas del frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia*. 39:603-610.
- Islas Andrade, S., Revilla Monsalve, M. C. 2005. Diabetes Mellitus. "Diabetes Mellitus: concepto y nueva clasificación". Tercera Edición. Edit. McGraw-Hill. Sección I. Cap. 1. p.p. 3-20.

- Islas Andrade, S., Revilla Monsalve, M. C. 2005. Diabetes Mellitus. "Patogenia, cuadro clínico y diagnóstico de la diabetes tipo 2". Tercera Edición. Edit. McGraw-Hill. Sección II. Cap. 6. p. p. 124-133.
- King, S. S. 1991. Líquidos corporales y análisis de orina. Función y enfermedades del riñón. Ed. El manual moderno. México, D.F. 23-25.
- Klimes, I., Haffner, S. M., Seböková, E., Howard, B. V., Storlien, L. H. 1997. Lipids and syndromes of insulin resistance. Regulation of lipolysis. Ed. Staff. New York, NY. 204, 205.
- Lee, Y. A., Kim, Y. J., Cho, E. J., Yokozawa, T. 2007. Ameliorative effects of proanthocyanidin on oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Agric. Food Chem.*
- Ludwig, D., Pereira, M., Kroenke, C., Hilner, J., Van-Hom, L., Slattery, M. 1999. Dietary fiber, weight gain, and cardiovascular disease risk factors in young adults. *J. Am. Med. Assoc.* 282:1539-1546.
- Martínez-González, J., Llorente-Cortes, V., Badimon, L. 2001. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. *Rev. Esp. Cardiol.* 54:218-231
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. 2002. Bioquímica. "Metabolismo de los compuestos nitrogenados: principios de biosíntesis, la utilización y el recambio". 2ª edición. Edit. McGraw-Hill. Interamericana. 20:772-811.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. 2002. Bioquímica. "Metabolismo de lípidos I". 2ª edición. Edit. McGraw-Hill. Interamericana. 18:685-715.

- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. 2002. Bioquímica. "Coordinación metabólica, control metabólico y transducción de señal". 2ª edición. Edit. McGraw-Hill. Interamericana. 23:916-917.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. 2002. Bioquímica, "Metabolismo de los hidratos de carbono II: Biosíntesis". 2ª edición. Edit, McGraw-Hill. Interamericana. 16:615-617, 626.
- Milagro, F., Marques-Lopes, I. 2002. Sistema nervioso y obesidad. An. Sist. Sanit. Navar. 1:41-52.
- Muntaner, J. A., Luciardi, H. E., Altman, R. 1999. Aterosclerosis: ¿por qué una enfermedad inflamatoria?. Parte I. Fundamentos, marcadores, biología molecular. Rev. Fed. Arg. Cardiol. 28:201-216.
- Monteiro, C. A., Moura, E. C., Conde, W. L., Popkin, B. M. 2004. Socioeconomic status and obesity in adult populations of developing countries: a review. Bull World Health Organ. 82:940-946.
- Paredes López, O., Valverde, M. E. 2006. Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. CINVESTAV. 65-73.
- 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.
- Petlevski, R., Hadzija, M., Slijepsevic, M. 2001. Effect of "antidiabetics" herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. J. Ethnopharmacol. 75:181.
- Popa, C., Netea, M. G., Van Riel, P. L. C. M., Van der Meer, J. W. M., Stalenhoef, A. F. H. 2007. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions,

- intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J. Lipid Research*. 48:751-761.
- Ramos Rodríguez, H. G., Domingo Méndez, J. 1994. Diabetes Mellitus Experimental. *Ciencia Vet.* p. p. 347-360.
- Ramesh, B., Saravanan, R., Pugalendi, K. V. 2006. Effect of dietary substitution of ground oil on blood glucose, lipid profile, and redox status in streptozotocin-diabetic rats. *Pharmacol. Rep.* 3:339-348.
- Reusch, J. E. B. 2003. Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: what is it about glucose?. *J. Clin. Invest.* 112:986-988.
- Rivera, J. A., Barquera, S., González-Cossio, T., Olaiz, G., Sepúlveda, J. 2004. Nutrition transition in México and in other Latin American countries. *Nutr. Rev.* 62:149-157.
- Rodríguez, C. L., Fernández, R. X. 2003. Los frijoles (*Phaseolus vulgaris*): su aporte a la dieta del costarricense. *Acta Med. Costarric.* 45:3.
- Rodríguez Morán, M., Guerrero Romero, J. F. 2005. Diabetes Mellitus. "Inflamación y diabetes". Tercera Edición. Edit. McGraw-Hill. Sección IV. Cap. 11. p. p. 215-217.
- Román-Ramos, R., Flores-Saenz, J. L., Alarcón-aguilar, F. J. 1995. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. *J. Ethnopharmacol.* 48:25-32.
- Rull, J. A., Aguilar-Salinas, C. A., Rojas, R., Ríos-Torres, J. M., Gómez-Pérez, F. J., Olaiz, G. 2005. Epidemiology of type 2 diabetes in México. *Arch. Med. Res.* 36:188-196.

- Sánchez Recalde, A., Kaski, J. C. 2001. Diabetes mellitus, inflamación y aterosclerosis coronaria: perspectiva actual y futura. *Rev. Esp. Cardiol.* 54:751-763.
- Santangelo, C., Vari, R., Schazzocchio, B., Benedetto, R., Filesi, C., Masella, R. 2007. Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. *Ann. Ist. Super Sanità.* 43:394-405.
- Savickiene, N., Dagilyte, A., Lukosius, A., Zitkevicius, V. 2002. Importance of biologically active components and plants in the prevention of complications of diabetes mellitus. *Medicina (Kaunas).* 10:970-975.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Tovar, J., Osorio-Diaz, L., Paredes-López, O., Bello-Perez, A. 2005. In vitro starch digestibility and predicted glycemic index of corn tortilla, black beans, and tortilla-bean mixture: effect of cold storage. *J. Agric. Food Chem.* 53:1281-1285.
- Scarbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:287-306.
- 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.
- Schulz, L., Bennett, P., Ravussin, E., Kidd, J., Kidd, K., Esparza, J., Valencia, M. 2006. Effects of traditional and western environments on prevalence of type 2 diabetes in Pima Indians in México and the U.S. *Diabetes care.* 29:1866-1871.

- Secretaría de Salud, Dirección General de Evaluación del Desempeño, Dirección General de Información en Salud, Subsecretaría de Innovación y Calidad. 2004. Salud: México 2003. p. p. 46-47.
- 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.
- Serrano, J., Goñi, I. 2004. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. ALAN 54:1.
- 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.
- 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
- The expert committee. 2002. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diab. Care. 25:S5-S20.
- Tsimidou, M. 1998. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. Ital. J. Food Sci. 2:99-116.

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

Vázquez Vega, B., Meza Molina, L. M., Islas Andrade, S. 2005. Diabetes Mellitus. "Nefropatía diabética". Tercera Edición. Edit. McGraw-Hill. Sección VII. Cap. 19. p. p. 330-347.

Wahle, K. W., Caruso, D., Ochoa, J. J., Quiles, J. L. 2004. Olive oil and modulation of cell signaling in disease prevention. *Lipids.* 39:1223-1231

Wei, M., Gaskill, S. P., Haffner, S. M., Stern, M. P. 1998. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diab. Care.* 7:1167-1172.

Willcox, J. K., Ash, S. L., Catignani, G. L. 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44:275-295.

Williams, M. D., Nadler, J. L. 2007. Inflammatory mechanism of diabetes complications. *Curr. Diab. Rep.* 7:242-248.

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.

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 England Journal of Medicine.* 617-621.

www.siap.sagarpa.gob.mx/cadenas/frijol/demanda.pdf, 2003

Xiao, W. 2003. Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell. Mol. Immunol.* 1:6 425-35.

Yamabe, N., Yokozawa, T., Oya, T., Kim, M. 2006. Therapeutic potential of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 9(1):228-236.

Yamagishi, S., Fukami, K., Ueda, S., Okuda, S. 2007. Molecular mechanism of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention. *Curr. Drug. Targets.* 8:952-959.

Yeh, C., Yeh, G. 2003. Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 51:1474-1479.

Young, I. S., Woodside, J. V. 2001. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 54(3):176-86.

11. ANEXOS

11.1 Determinación de triglicéridos

Los triglicéridos se determinaron a partir de la hidrólisis enzimática con lipasas mediante un kit enzimático marca Randox, el cual emplea un método colorimétrico. Este análisis se basa las siguientes reacciones. Los triglicéridos presentes en la muestra dan lugar a glicerol por medio de hidrólisis enzimática con lipasas. El glicerol formado se convierte a glicerol-3-fosfato por acción de la enzima glicerol cinasa, éste, al estar en presencia de oxígeno y por la enzima glicerol fosfato oxidasa produce el compuesto dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con el 4-aminofenazona y el 4-clorofenol, y mediante la enzima peroxidasa se produce el compuesto colorido quinoneimina (indicador) el cual, finalmente, se lee en un lector de ELISA Turnable Versamax a 546 nm. En

donde la intensidad de color es proporcional a la concentración de triglicéridos en suero sanguíneo, ésta se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de triglicéridos (mg/dL)} = \frac{\text{Abs de la muestra}}{\text{Abs del estándar}} * 200$$

11.2 Determinación de colesterol total

La concentración de colesterol total en sangre se evaluó mediante un kit de la marca Randox, en donde los esteres de colesterol de las muestras se hidrolizaron por medio de la colesterol esterasa, produciendo colesterol libre el cual en presencia de oxígeno y por acción de la colesterol esterasa formó el colesteno-3-ona y peróxido de hidrógeno, este último en presencia de 4-aminoantipirina y fenol, mediante la enzima peroxidasa, dieron lugar al compuesto colorido quinoneimina, que fue leído en un lector de ELISA Turnable Versamax a una longitud de onda de 546 nm. En donde la intensidad de color es proporcional a la concentración de colesterol en suero sanguíneo, la cual se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Abs de la muestra}}{\text{Abs del estándar}} * 200$$

11.3 Determinación de HDL (lipoproteína de alta densidad)

La concentración de colesterol HDL en suero sanguíneo se cuantificó mediante un kit de la marca Randox. Donde se siguió la siguiente metodología. Primero se llevó a cabo una precipitación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL y VLDL) y de las fracciones de quilomicrones presentes en la muestra, por medio del ácido fosfotúngstico en presencia de iones de magnesio. Posteriormente las muestras se centrifugaron y se obtuvo el sobrenadante, donde se encuentra la fracción HDL, éste, se hidrolizó por medio de la enzima colesterol

esterasa, produciendo colesterol libre el cual en presencia de oxígeno y con la enzima colesterol esterasa produce el colesteno-3-ona y peróxido de hidrógeno. La 4-aminoantipirina y el fenol en presencia del peróxido de hidrógeno formado y por acción de la enzima peroxidasa dieron lugar a un compuesto colorido (quinoneimina) que fue leído a una longitud de onda de 546 nm en un lector de ELISA Turnable Versamax. La concentración de colesterol es proporcional a la coloración producida y se obtuvo empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de HDL (mg/dL)} = \frac{\text{Abs de la muestra}}{\text{Abs del estándar}} * 150$$

11.4 Determinación de LDL y VLDL (lipoproteínas de baja densidad)

La concentración de las proteínas de baja densidad LDL, no son valores analíticos si no que se determinan matemáticamente mediante la fórmula de Friedewald.

$$\text{Concentración de LDL (mg/dL)} = \text{colesterol total} - \text{VLDL} - \text{HDL}$$

A su vez, la concentración de VLDL, se determina empleando la siguiente fórmula, solo si la concentración de triglicéridos tiene un valor igual o inferior a 400 mg/dL.

$$\text{Concentración de VLDL (mg/dL)} = \frac{\text{concentración de triglicéridos (mg/dL)}}{5}$$

5