



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUIMICA

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

**ESTUDIO DE LA RELACIÓN DEL CONSUMO DE
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FRIJOL
COCIDO CON LA PREVENCIÓN Y DESARROLLO DE
CÁNCER DE COLON**

TESIS

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

PRESENTA

LAQB. MARÍA CRISTINA SERNA GUTIÉRREZ

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., NOVIEMBRE 2007



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

**ESTUDIO DE LA RELACION DEL CONSUMO DE DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE FRIJOL COCIDO CON LA PREVENCIÓN Y
DESARROLLO DE CÁNCER DE COLON**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:

LAQB. María Cristina Serna Gutiérrez

Dirigido por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

SINODALES

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Presidente


Firma

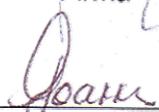
Dr. Irineo Torres Pacheco
Secretario


Firma

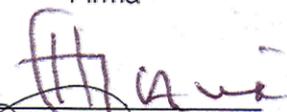
Dra. Minerva Ramos Gómez
Vocal

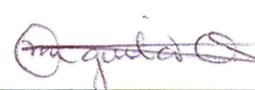

Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Suplente

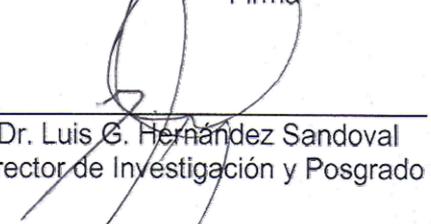

Firma

Dr. S. Horacio Guzmán Maldonado
Suplente


Firma



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



Dr. Luis G. Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

El consumo de frijol cocido se ha relacionado con una disminución en el desarrollo de cáncer de colon en animales de experimentación. Se ha demostrado que algunos de los componentes del frijol, tienen la capacidad de regular algunos de los factores de riesgo relacionados con este tipo de cáncer. Sin embargo, este efecto es dependientes no sólo de componentes, sino también de la concentración de éstos en los alimento. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de dos variedades de frijol cocido (*Phaseolus vulgaris*): Pinto zapata (PZ) y Negro 8025 (N), sobre el desarrollo de cáncer de colon en un modelo animal y determinar su mecanismo de acción. Los frijoles fueron sometidos a un tratamiento térmico y se observó que el frijol N presentó 4 veces más concentración de taninos condensados, 11 veces más de antocianinas y una mayor capacidad antioxidante (39%) comparado con PZ. En la primera etapa las ratas fueron alimentadas con una dieta control o dietas que contenían 12.5, 25 y 50% de frijol PZ y N durante 5 semanas, se evaluaron factores de riesgo para predisposición a cáncer de colon. Se observó una disminución en los niveles de colesterol a las concentraciones de 25% (20-24%) y 50% (45-48%) para ambos frijoles. En cuanto a AGCC se observó un aumento significativo en la concentración de acetato para todas las concentraciones de PZ y de N 50%. En el caso de propionato se presentó un incremento para ambas variedades hasta de 7 veces más comparado con el control. La enzima β -glucuronidasa disminuyo en los grupos de 25 y 50% para ambas variedades hasta en un 50%. En el caso de la enzima glutatión S- transferasa, su actividad se incrementó (49%) solamente en los animales tratados con PZ 50%. En la segunda etapa a las ratas se les administró de manera independiente las dos variedades de frijol cocido PZ y N incorporando a la dieta concentraciones de 0.5, 3, 12.5 y 25%. Los animales fueron tratados con frijol antes (4 semanas), durante (8 semanas) y después (11 semanas) del carcinógeno DMH. La incidencia de adenocarcinomas de colon disminuyó de manera significativa para todos los grupos de frijol desde un 40% hasta un 80%, principalmente para el grupo PZ 3% y N0.5%. No se observó un efecto significativo del frijol sobre los niveles de glucosa, colesterol y HDL. Los tratamientos que mostraron mayor protección están relaciona con una menor concentración de triglicéridos (22 a 41%) y la proteína involucrada en proliferación celular PCNA (22%) e incremento de glutatión S-transferasa (26-40%). Estos resultados sugieren que el consumo de frijol a bajas concentraciones puede disminuir el riesgo del desarrollo del cáncer de colon.

Palabras clave: frijol, cáncer de colon, β -glucuronidasa, glutatión S-transferasa, PCNA.

SUMMARY

Cooked beans intake has been linked to colon cancer development decrease in experimental animals. It has been shown that some bean compounds have the ability to regulate some risk factors associated with this type of cancer. However, this effect is dependent not only on the presence of the compounds in the beans, but in their concentration. The objective of this project was to evaluate the effect to different concentrations of two varieties of cooked beans (*Phaseolus vulgaris*): Pinto Zapata (PZ) and Negro 8025 (N) over colon cancer development in an animal model and to determine its mechanism of action. After both bean varieties were cooked, it was shown that N presented four times more concentrations condensed tannins and eleven times more anthocyanins concentration, respectively, and a greater antioxidant capacity (39%) than PZ. In the first stage, rats were fed a control diet and diets containing 12.5, 25 and 50% of PZ and N beans for 5 weeks. Risk factors for colon cancer predisposition were evaluated and decrease in cholesterol levels at diets with 25% (20-24%) and 50% (45-48%) of both beans was observed. In the case of AGCC, there was a significant increase in acetate concentration for all PZ diets and N 50% diet, while propionate was seven times more than control, in both bean varieties. β -glucuronidase enzyme was lower in 25 and 50% diets for both bean varieties and it showed a 50% decrease. In the case of glutathione S-transferase enzyme activity, only animals fed with PZ 50% diets showed an increase (49%). In the second phase of the experiment, rats were fed independently with the two cooked beans varieties, PZ and N by incorporating them in the diet at 0.5, 3, 12.5 and 25%. Animals were treated with cooked beans four, eight and eleven weeks before, during and after i.p. administration of DMH carcinogen, respectively. Colon adenocarcinoms incidence decreased significantly in all experimental groups from 40% to 80%, mainly in the case of PZ 3% and N 0.5% diet. There was not a significant effect of cooked beans intake on glucose, cholesterol and HDL levels. Those treatments that showed more protection are associated with a low triglycerides concentration (22-41%) and the protein involved in cell proliferation, PCNA (22%) and an increase of glutathione S-transferase (26-40%). these results suggest that cooked beans consumption at low concentrations can reduce the risk of development of colon cancer.

Key words: beans, colon cancer, β -glucuronidase, glutathione S-transferase, PCNA.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Cáncer	4
2.1.1 Definición	4
2.1.2 Proliferación y diferenciación celular	4
2.1.3 Proceso de carcinogénesis	5
2.1.4 Características de las células cancerosas	7
2.1.5 Tumores	8
2.2 Bases moleculares del cáncer	8
2.2.1 Oncogenes	9
2.2.2 Genes supresores de tumor	9
2.2.3 Genes involucrados en la reparación de ADN	9
2.2.4 Genes que regulan la muerte celular programada (apoptosis)	10
2.3 Procesos de destoxificación	11
2.4 Cáncer de colon	12
2.4.1 Colon	12
2.4.2 Epidemiología	13
2.4.3 Desarrollo de cáncer de colon	14
2.4.4 Bases moleculares del cáncer de colon	14
2.5 Bacterias intestinales y cáncer de colon	16
2.6 Alimentos nutraceuticos y prevención de cáncer de colon	17
2.7 Frijol	18
2.7.1 Composición del frijol	19
2.7.2 Frijol y su relación con cáncer de colon	20

2.7.3 Compuestos bioactivos del frijol relacionados con la prevención de cáncer de colon	22
2.7.3.1 Carbohidratos	22
2.7.3.2 Compuestos fenólicos	24
2.7.3.3 Saponinas	24
2.7.3.4 Ácido fítico	25
2.8 Modelo animal de carcinógenesis de colon	25
2.8.1 Metabolismo de la 1,2-dimetilhidrazina	26
3. JUSTIFICACION	28
4. OBJETIVOS	29
4.1. Objetivo general	29
4.2 Objetivos específicos	29
5. MATERIALES Y METODOS	30
5.1 Materiales	30
5.1.1 Material biológico	30
5.1.2 Reactivos	30
5.2 Metodología	31
5.2.1 Preparación de las dietas con frijol	31
5.2.1.1 Taninos condensados	31
5.2.1.2 Antocianinas	32
5.2.1.3 Capacidad antioxidante	32
Estudios <i>in vivo</i>	33
5.2.2 Grupos de estudio	33
5.2.2.1 Primera etapa	34
5.2.2.2 Segunda etapa	34
5.2.3 Preparación de la 1,2-dimetilhidrazina	36
5.2.4 Inducción del cáncer de colon	36
5.2.5 Sacrificio y obtención de muestras	36
5.2.6 Estudio histopatológico	37
5.2.7 Evaluación de la concentración de glucosa en sangre y perfil de lípidos	38
5.2.7.1 Determinación de glucosa	38
5.2.7.2 Determinación de triglicéridos	38

5.2.7.3 Determinación de colesterol total	39
5.2.7.4 Determinación de HDL (lipoproteínas de alta densidad)	39
5.2.8 Determinación de la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST)	40
5.2.9 Determinación de la actividad enzimática de la β -glucuronidasa	41
5.2.10 Evaluación de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)	42
5.2.11 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	42
6. ANALISIS ESTADÍSTICO	44
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	45
7.1 Análisis bromatológico de las harinas de frijol	45
7.2 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las harinas de frijol	46
7.3 Primera etapa	48
7.3.1 Consumo de alimento de ratas alimentadas con harina de frijol	49
7.3.2 Ganancia de peso de ratas alimentadas con harina de frijol	50
7.3.3 Concentración de glucosa, colesterol y HDL en sangre de ratas tratadas con harina frijol	52
7.3.4 Concentración de ácidos grasos de cadena corta en el contenido colónico de ratas alimentadas con harina de frijol	55
7.3.5 Actividad enzimática de β -glucuronidasa en contenido distal colónico de ratas tratadas con harina de frijol	57
7.3.6 Actividad enzimática de glutatión S-transferasa en hígado de ratas alimentadas con harina de frijol	59
7.4 Segunda etapa	61
7.4.1 Evaluación macroscópica del colon de ratas tratadas con DMH y harina de frijol	61
7.4.2 Evaluación microscópica del colon de ratas tratadas con DMH y alimentadas con harina de frijol	62

7.4.3 Consumo de alimento de ratas tratadas con el carcinógeno DMH y alimentadas con harina de frijol	72
7.4.4 Ganancia de peso de ratas tratadas con el carcinógeno DMH y alimentadas con harina de frijol	73
7.4.5 Concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL e índice de Castelli en sangre de ratas tratadas con DMH y alimentadas con harina de frijol	75
7.4.6 Actividad enzimática de β -glucuronidasa en contenido distal colónico de ratas tratadas con DMH y alimentadas con harina de frijol	77
7.4.7 Actividad enzimática de glutatión S-transferasa en hígado de ratas tratadas con DMH y alimentadas con harina de frijol	80
7.4.8 Expresión de la proteína PCNA como marcador de la proliferación celular en colon de ratas alimentadas con harina de frijol e inducidas químicamente con el carcinógeno colónico DMH	82
8. CONCLUSIONES	85
9. BIBLIOGRAFIA	87
10. ANEXOS	99

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Producción de β -glucosidasa y β -glucuronidasa por bacterias intestinales de humano	16
2. Composición nutricional del frijol negro crudo	19
3. Componentes con potencial protector contra cáncer de colon provenientes de las leguminosas	22
4. Clasificación de los carbohidratos del frijol cocido	23
5. Grupos de experimentales primera etapa	34
6. Grupos experimentales segunda etapa	35
7. Análisis bromatológico de las harinas de frijol	45
8. Taninos condensados, antocianinas y capacidad antioxidante de las harinas de frijol cocido	46
9. Contenido de nutrimentos en la dieta control y en las dietas con harina de frijol cocido PZ y N a diferentes concentraciones	49
10. Concentración de glucosa, colesterol, HDL e índice de Castelli en sangre de ratas tratadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones	52
11. Concentración de ácidos grasos de cadena corta en contenido distal colónico de ratas tratadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones	56
12. Influencia del frijol PZ sobre la incidencia en displasias y adenocarcinomas, la multiplicidad y número promedio de tumores	68
13. Influencia del frijol N sobre la incidencia en displasias y adenocarcinomas, la multiplicidad y número promedio de tumores	70
14. Incidencia de displasia por grado en ratas tratadas con DMH y alimentadas con dos variedades de frijol a diferentes concentraciones	70
15. Incidencia de adenocarcinomas por grado de diferenciación en ratas tratadas con DMH y alimentadas con dos variedades de frijol cocido a diferentes concentraciones	71

16. Concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL e índice de Castelli en sangre de ratas tratadas con DMH y alimentadas diferentes concentraciones de frijol cocido 75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Esquema del ciclo celular, puntos de restricción y expresión de PCNA	5
2. Esquema del comportamiento de las células en el proceso de carcinogénesis	6
3. Diferencias entre las células normales y células cancerosas	7
4. Esquema de proteínas involucradas en el proceso de apoptosis	11
5. Anatomía del colon	13
6. Fases del desarrollo de cáncer de colon	15
7. Incidencia de tumores colónicos en ratas F344 macho inducidas con azoximetano alimentadas con dos tipos de cultivares de frijol y el control con caseína	21
8. Efecto protector sobre cáncer de colon de diferentes variedades de frijol cocido en ratas Sprague-Dawley inducidas con 1,2-dimetilhidrazina	21
9. Metabolismo de la 1,2-dimetilhidrazina	27
10. Consumo de alimento de ratas tratadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones	50
11. Ganancia de peso de ratas tratadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones	51
12. Actividad enzimática de β -glucuronidasa en contenido distal de ratas tratadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones	58
13. Actividad enzimática de glutatión S-transferasa (GST) en hígado de ratas tratadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones	59
14. Lesiones encontradas en la zona proximal del colon de ratas inducidas químicamente con DMH	61
15. Lesiones encontradas en la zona distal del colon de ratas inducidas químicamente con DMH	62
16. Histología de colon de rata control, teñido con hematoxilina-eosina	63
17. Morfología de células de colon de ratas sanas y ratas tratadas con el carcinógeno DMH	64

18. Histología de los tipos de displasia observados en colon de ratas tratadas con el carcinógeno DMH	65
19. Histología de los tipos de adenocarcinomas observados en colon de ratas tratadas con el carcinógeno DMH	67
20. Consumo de alimento de ratas tratadas con el carcinógeno DMH y alimentadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones	73
21. Ganancia de peso de ratas tratadas con el carcinógeno DMH y alimentadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones	74
22. Actividad enzimática de β -glucuronidasa en contenido distal de ratas tratadas con DMH y alimentadas con diferentes harinas de frijol cocido	79
23. Actividad enzimática de glutatión S-transferasa (GST) en hígado de ratas tratadas con DMH y alimentadas con frijol	81
24. Niveles de expresión de PCNA evaluada mediante a)western blot y b) la relación de área de pixeles de PCNA entre β -actina	84

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad crónico-degenerativa que se caracteriza por el crecimiento incontrolado y la propagación de células anormales. En México, esta patología es la tercer causa de muerte después de la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (<http://www.inegi.gob.mx>, 2005). Actualmente, el cáncer de colon, que es uno de los cánceres más asociados con la dieta, ha tomado gran importancia debido al cambio en el patrón de la dieta en muchos países a causa de la occidentalización y el desarrollo.

El cáncer comúnmente resulta de mutaciones que ocurren durante el tiempo de vida. Estas mutaciones alteran protooncogenes y genes supresores de tumor, los cuales son importantes reguladores de los procesos biológicos y desempeñan diversas funciones en el control del crecimiento celular, como la proliferación, la apoptosis y la diferenciación (De Vita *et al.*, 1999).

Se ha tratado de identificar los factores de riesgo en los alimentos que incorporados a la dieta estén asociados con cáncer de colon, cabe señalar que la mayoría de los estudios parecen coincidir en el riesgo ligado al peso excesivo, aumento en la ingesta calórica, consumo de carne y grasas animales; lo anterior asociado a incremento en la concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos (Yamada *et al.*, 1998; Díaz, 1999, Jee *et al.*, 2005).

Otro factor de riesgo que puede asociarse al cáncer de colon es la flora bacteriana del propio colon, ya que ésta puede interactuar con el alimento favoreciendo la formación de carcinógenos o promotores (Alexander-Williams y Binder, 1983; Jin *et al.*, 2000, Queiroz-Monici *et al.*, 2005).

Por otro lado se sabe que los alimentos de la dieta tienen componentes importantes que pueden influir en la prevención y/o tratamiento del cáncer de colon, entre dichos alimentos se encuentran las verduras, las frutas y las leguminosas.

Debido a su consumo por ser parte de la dieta típica del mexicano una de las leguminosas más importante en México es el frijol. El frijol es considerado un alimento nutracéutico debido a que contiene componentes que pueden beneficiar al organismo en la prevención de enfermedades o en el tratamiento de las mismas (Cavallé de Moya *et al.*, 2003). Sin embargo, actualmente esta leguminosa se enfrenta a cambios importantes en su consumo debido a las modificaciones en los hábitos alimenticios a consecuencia del urbanismo, la migración y el empleo (www.siap.sagarpa.gob.mx, 2003).

Se tiene evidencia que al incorporar altas concentraciones de frijol a la dieta (60 - 75%), se disminuye la incidencia de tumores colónicos hasta en un 50% en ratas inducidas químicamente (Hughes *et al.*, 1997; Hangen y Bennink, 2002). Así mismo, se ha comprobado que el incorporar únicamente 0.4% de frijol en la dieta disminuye la multiplicidad de cáncer de colon hasta en un 73% (Ríos *et al.*, 2007).

El frijol contiene una serie de compuestos bioactivos a los cuales se les ha relacionado con la prevención de cáncer de colon, entre dichos compuestos se pueden citar a la fibra soluble e insoluble, los oligosacáridos, el almidón resistente, el ácido fítico, los compuestos fenólicos, entre otros (Serrano y Goñi, 2004).

En diversos estudios se ha demostrado que el mecanismo de acción de estos componentes para inhibir el desarrollo de cáncer de colon; inducción de apoptosis, inhibición de la proliferación celular, inducción de enzimas de fase II, las cuales llevan a cabo la destoxificación de carcinógenos activos en el organismo e inhibición de la enzima β -glucuronidasa, enzima que reactiva los carcinógenos eliminados a través de la vía enterohepática. Dichos mecanismos se han evaluado en diversos alimentos no incluido el frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

Debido a los cambios en la ingesta de frijol en México, así como las preferencias de consumo dado por las características propias de esta

leguminosa fue importante determinar el efecto que estas variables pudieran tener sobre algunos de los parámetros de predisposición y la protección del cáncer de colon. Por otro lado, fue importante identificar el o los mecanismos de acción a través del cual el frijol cocido es capaz de inhibir el desarrollo de esta patología.

En base a lo anterior en este estudio se evaluó el efecto quimioprotector del frijol contra el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley inducidas químicamente con el compuesto 1,2-dimetilhidrazina, el cual es un carcinógeno específico para colon. El frijol se incorporó en la dieta a diferentes concentraciones, entre las que se incluyen el consumo rural (12.5%, 25% y 50%) y el urbano (0.5% y 3%) de los mexicanos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

2.1.1 Definición

El cáncer se caracteriza por presentar múltiples mutaciones que provocan daños en los cuales una sola célula o grupo de células provenientes de un tejido particular pierden la habilidad para responder a los mecanismos de control que son muy importantes en el mantenimiento y desarrollo de los tejidos y del organismo completo (Clayson, 2000).

2.1.2 Proliferación y diferenciación celular

Las células de organismos multicelulares tienen como objetivo mantener la integridad del organismo, mediante la proliferación y diferenciación celular. La proliferación es necesaria para crear un nuevo individuo o bien, reemplazar las células perdidas por desgaste, mal funcionamiento o por muerte celular programada (apoptosis). La base para que se lleve a cabo lo anterior es el ciclo celular. La progresión ordenada del ciclo celular se mantiene mediante una serie de mecanismos, rutas independientes análogas a las rutas bioquímicas y, sobre todo por un reloj interno (Biggs *et al.*, 2000; Geoffrey, 2000).

El reloj del ciclo celular se regula mediante puntos de control o de restricción, en donde el ciclo celular puede detenerse temporalmente en respuesta a factores extrínsecos e intrínsecos (Albert *et al.*, 1994) (Figura 1). Sin embargo, se pueden presentar cambios genéticos cada vez que una célula se divide; dichos cambios tienen que ser reparados para evitar alteraciones en la replicación celular. De lo contrario, el cáncer puede surgir de la proliferación anormal de células con mutaciones (De Vita *et al.*, 1999)

Una de las proteínas involucradas con la proliferación celular es el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, por sus siglas en inglés),

sintetizado tempranamente en las fases G1 y S del ciclo celular, el PCNA tiene un rol importante en la replicación y reparación del ADN actuando como cofactor de la ADN polimerasa ϵ y de la ADN polimerasa δ (Kelman, 1997; Lomanto *et al.*, 2003).

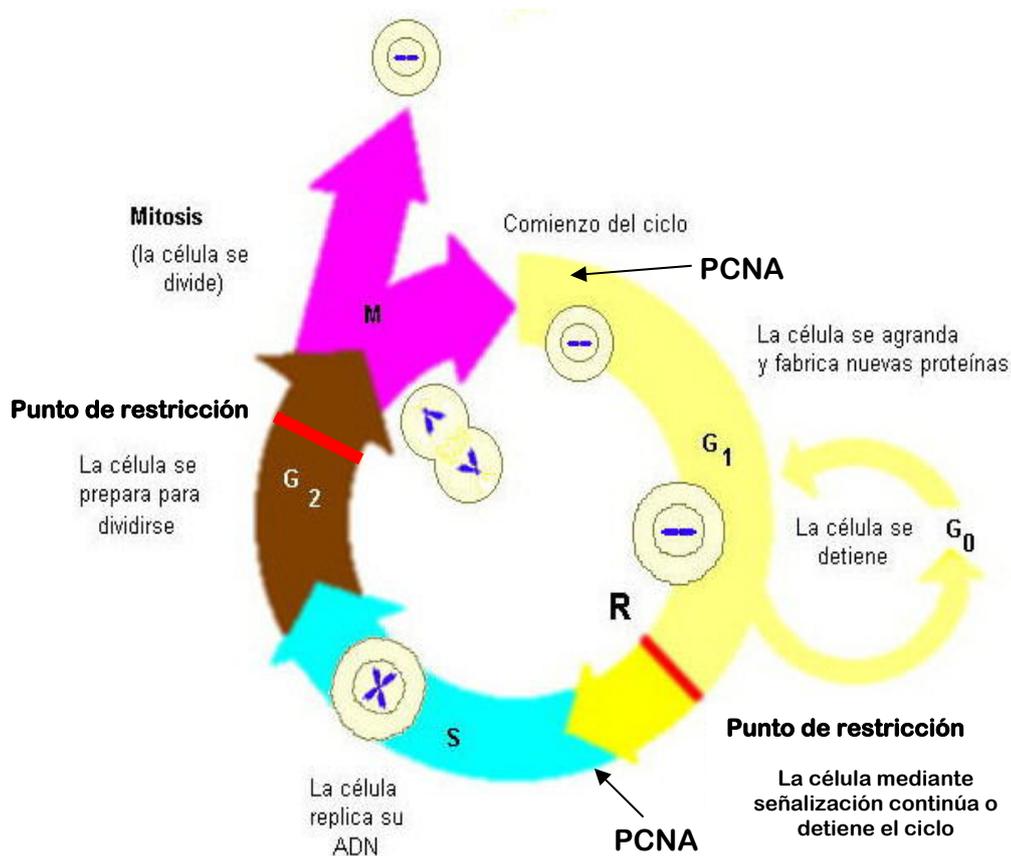


Figura 1. Esquema del ciclo celular, fases que lo conforman, puntos de restricción y expresión del antígeno nuclear de proliferación nuclear (PCNA). (www.en.wikipedia.org, 2007).

2.1.3 Proceso de Carcinogénesis

La mayoría de los cánceres se originan después de que un gen es alterado por un carcinógeno o por errores en la copia y reparación de genes. Típicamente una serie de mutaciones en múltiples genes crean una rápida y progresiva proliferación de este tipo de células que escapan a las restricciones de crecimiento normal creando una oportunidad para mutaciones adicionales. Eventualmente esta clona de células crece originando un tumor. Las células

tumorales pierden los controles normales de proliferación celular, diferenciación y se vuelven insensibles a señales de muerte apoptótica. Además, para el crecimiento de un tumor sólido se requiere de nuevos vasos sanguíneos para proveer nutrientes y oxígeno y así incrementar la masa. A lo anterior se le conoce como angiogénesis. La metástasis ocurre después de que las células tumorales han sufrido posteriores mutaciones adquiriendo la capacidad de invasión a tejidos cercanos y a otros sitios viajando a distancia vía linfática, sangre o cavidades corporales (Figura 2) (Hodgson y Smart, 2001; Mathers, 2002).

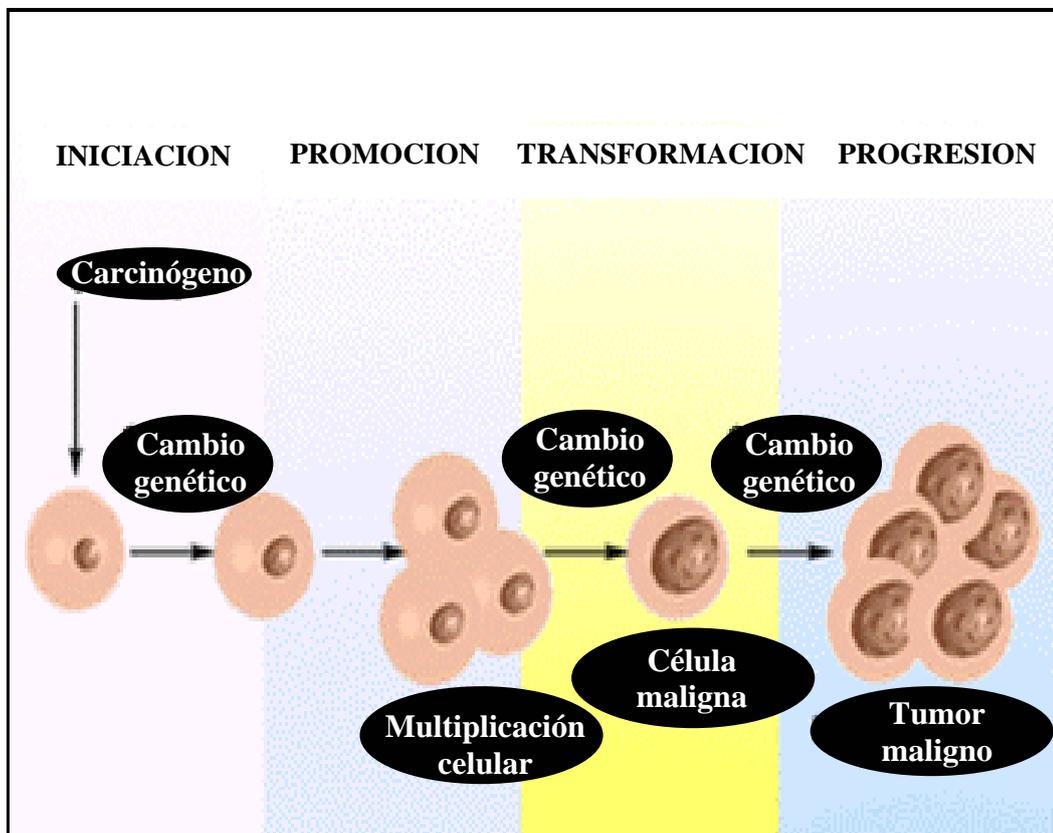


Figura 2. Esquema del comportamiento de las células en el proceso de carcinogénesis (Peralta-Zaragoza *et al.*, 1997)

2.1.4 Características de las células cancerosas

Las células cancerosas difieren de las células normales en varias características, incluyendo la pérdida de la capacidad de diferenciación, el aumento de invasividad y la disminución de la sensibilidad a las drogas citotóxicas. Estas características son el resultado de la proliferación celular descontrolada y del proceso de evolución de la célula normal hacia una célula con potencial tumorigénico. La alta incidencia de cáncer, como una función de la longevidad celular, sugiere que múltiples alteraciones génicas se requieren para el proceso de tumorigénesis (Peralta-Zaragoza *et al.*, 1997). En la Figura 3 se presentan las principales diferencias entre células normales y células cancerosas.

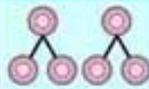
Normal	Cáncer	
		Grandes cantidades de células de forma irregular dividiéndose
		Núcleos grandes de forma variable
		Volumen citoplasmático pequeño en relación a los núcleos
		Variación en el tamaño y forma de las células
		Pérdida de las características de células especializadas normales
		Arreglo desorganizado de células
		Límites del tumor deficientemente definidos

Figura 3. Diferencias entre células normales y células cancerosas (www.cancer.gov, 2006)

2.1.5 Tumores

En algunas ocasiones las células continúan dividiéndose y así crean más células incluso cuando no son necesarias. Cuando esto sucede, se forma una masa de tejido denominada tumor. Los tumores de colon atraviesan por diferentes estadios clínicos e histopatológicos, que van desde la formación de las criptas displásicas hasta la formación de tumores benignos, y carcinomas (Cabrera y López-Nevot, 2005). Los tumores benignos son comunes y se descubren con mayor frecuencia, son llamados adenomas y generalmente pueden removerse, en la mayoría de los casos, no reaparecen, las células de estos tumores no se extienden a otras partes del cuerpo permanecen juntas y a menudo son rodeadas por una membrana de contención. Por el contrario, los tumores malignos o cancerosos generalmente se clasifican en dos categorías: carcinomas, cánceres que se originan en el epitelio; y sarcomas, cánceres que se originan en tejido conectivo, los cuales pueden llegar a invadir tejidos (Alexander-Williams y Binder, 1983).

2.2 Bases moleculares del cáncer

El cáncer se caracteriza por alteraciones heterogéneas en el cariotipo celular, las cuales incluyen la pérdida total o parcial de cromosomas, duplicación y translocaciones (Pretlow *et al.*, 1994). El blanco principal del daño genético lo constituyen cuatro clases de genes reguladores normales (Plancarte y Mayer, 2003):

- a) Protooncogenes, que estimulan el crecimiento.
- b) Genes supresores de tumores, que inhiben el crecimiento de células malignas.
- c) Genes involucrados en la reparación de ADN
- d) Genes que regulan la muerte celular programada (apoptosis).

Lo anterior comúnmente se ha relacionado mayoritariamente a factores ambientales (exógenos) y no a hereditarios (Plancarte y Mayer, 2003).

2.2.1 Oncogenes

Un oncogen surge de la pérdida de la capacidad de los protooncogenes para regular la replicación celular, cuando en un cromosoma se produce una mutación o translocación genética, la mayoría de los oncogenes y genes de supresión tumoral intervienen directamente en la regulación del ciclo celular normal. Los oncogenes pueden participar en la transducción de señales de factores de crecimiento, inhibiendo apoptosis, teniendo una acción específica en los genes supresores de tumor o ambas (OMS, 1995; Mendelsohn *et al.*, 2001).

Los protooncogenes, desempeñan diversas funciones en el control del crecimiento celular, como la proliferación, apoptosis y diferenciación. Estos genes codifican para proteínas que se activan de manera selectiva en presencia de señales reguladoras, entre los que se pueden destacar algunos receptores del factor de crecimiento, proteínas implicadas en la transducción de señales y algunos factores de transcripción (De Vita *et al.*, 1999; Griffiths, *et al.*, 2000).

2.2.2 Genes supresores de tumor

La inactivación de los genes supresores de tumor usualmente se da cuando ambas copias del gen son afectadas por delección o por mutación. Cada mutación adicional provee un mayor crecimiento de las células beneficiando así la aparición de un tumor (Hodgson y Smart, 2001; Mendelsohn *et al.*, 2001).

2.2.3 Genes involucrados en la reparación de ADN

Las células poseen diversos sistemas de reparación del ADN para poder garantizar la integridad de su genoma. La función del sistema de reparación es eliminar errores en el apareamiento entre bases, así como las uniones de inserción-delección que surgen como consecuencia de que la ADN polimerasa comete un error durante la replicación. Las primeras lesiones afectan el ADN no repetitivo y producen sustituciones de bases (por ejemplo, G→T), mientras que

las uniones afectan el ADN repetitivo y traen como consecuencias ganancias o pérdidas de unidades cortas repetitivas (CA) dentro de microsatélites. Esto se conoce como inestabilidad en microsatélites (MSI) (Levitt and Hickson, 2002). La mayoría de los tumores que presentan MSI deben esta característica a la inactivación del gen hMLH1. La inactivación es resultado mayormente de la hipermetilación y no de mutaciones somáticas o pérdida de heterocigosis (Kuismanen, *et al.*, 2000). Sin embargo las mutaciones germinales generalmente se presentan en los genes de reparación hMLH1 y hMSH2 y cuyos productos son indispensables para que se produzca la MSI (Levitt and Hickson, 2002).

2.2.4 Genes que regulan la muerte celular programada (apoptosis)

La eliminación de células, llamada muerte celular programada o apoptosis, se requiere para mantener la homeostasis normal, es decir, un balance entre la proliferación celular y la muerte celular en organismos multicelulares. La apoptosis se caracteriza por pérdida de la viabilidad, condensación de los cromosomas y fragmentación de ADN. Algunos productos de genes son activadores de apoptosis y algunos otros son inhibidores del proceso. La desregulación de la apoptosis juega un papel muy importante en la carcinogénesis, debido a que la inhibición de apoptosis puede ocasionar desórdenes en la proliferación celular favoreciendo la aparición de tumores. En la Figura 4 se muestra un esquema del proceso de apoptosis (Hodgson y Smart, 2001; Mendelsohn *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004).

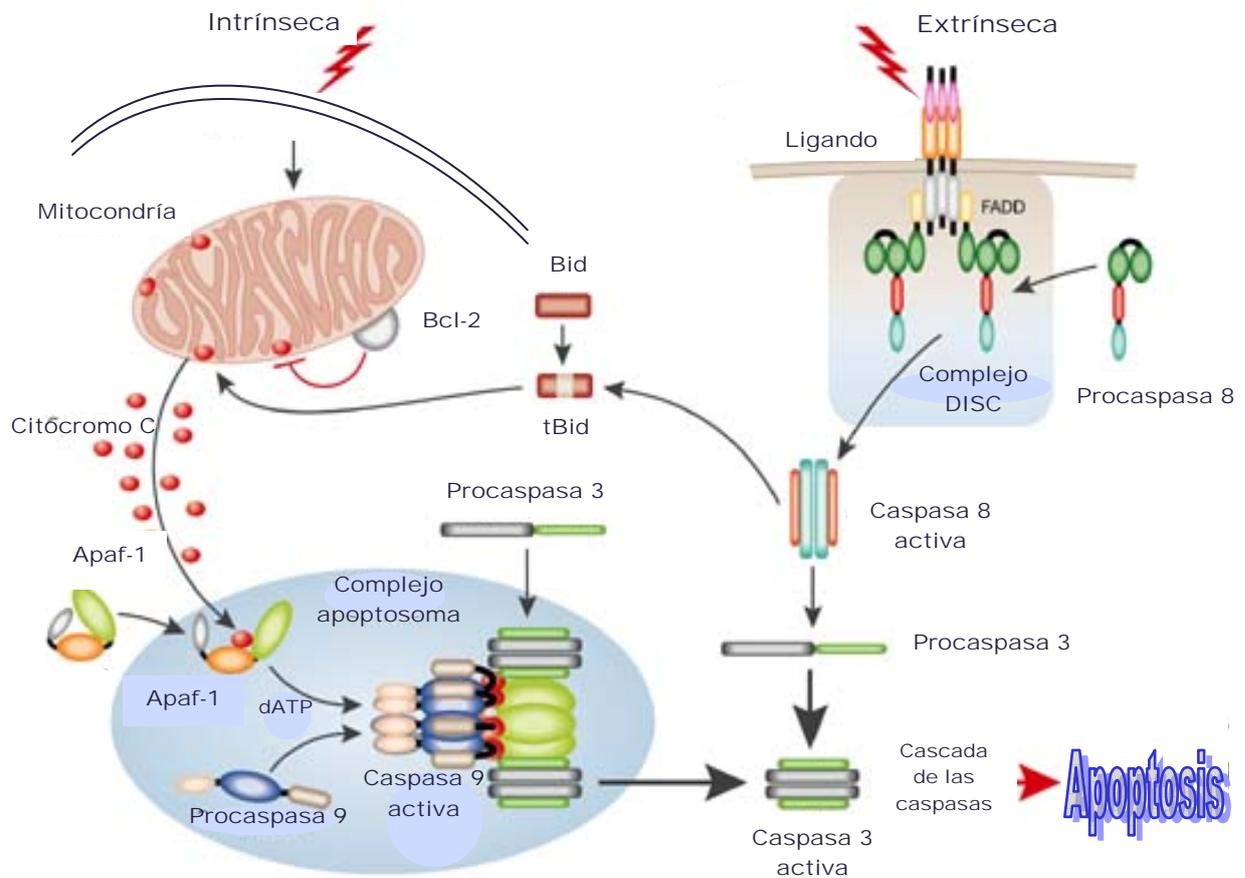


Figura 4. Esquema de proteínas involucradas en el proceso de apoptosis (www.chem.duke.edu, 2007).

2.3 Procesos de detoxificación

Debido a que el cáncer está cercanamente relacionado con la exposición ambiental a carcinógenos, el organismo tiene la capacidad de detoxificarse, por lo que éste es un mecanismo prometedor para la prevención del cáncer. El sistema de detoxificación del organismo comprende dos tipos de familias de enzimas, refiriéndose como enzimas que metabolizan drogas de fase I y de fase II (DNEs). Las enzimas de fase I comprenden a la superfamilia de citocromo P450 (CYPs), las enzimas de fase II comprenden múltiples enzimas de detoxificación y antioxidantes como la glutatión-S-transferasa (GST),

NADP(H):quinona oxidoreductasa (NQO) y UDP:glucuronosil transferasa (UGT), entre otras (Miao, *et al.*, 2003).

La inducción de destoxificación por enzimas de fase II como la GST y la NQO es uno de los mejores mecanismos de protección del organismo contra tóxicos y efectos neoplásicos de carcinógenos. Las GSTs son una familia multigénica compleja de enzimas involucradas en la conjugación para reducir glutatión (GSH) con compuestos electrofílicos. La GST está involucrada en el metabolismo de conjugación de una gran variedad de compuestos electrofílicos que incluyen epóxidos, haloalcanos, nitroalcanos, alquenos, derivados del metil sulfóxido, organofosfatos y compuestos aromáticos halo y nitro. La mayoría de los compuestos conjugados con glutatión son antibióticos, vasodilatadores, herbicidas, insecticidas, analgésicos, agentes anticancerígenos y carcinógenos. La reacción de xenobióticos con el GSH puede ocurrir de manera espontánea o enzimáticamente por medio de las GSTs. Si la conjugación con un electrófilo reactivo es espontánea puede ser la única manera en que el electrófilo pueda ser destoxificado. Sin embargo, la concentración del GSH tiene una importancia crítica en este proceso de destoxificación, y esto puede depender del tipo de célula ya que la concentración de GSH varía dependiendo del tipo celular. (Prester, *et al.*, 1993; Seidegard y Ekström, 1997; Hodgson-Smart, 2001).

2.4 Cáncer de colon

2.4.1 Colon

El colon y recto son partes del sistema digestivo que constituyen al llamado intestino grueso. El colon incluye los primeros 1.2–1.5 m del intestino grueso, y el recto son las 0.10–0.12 m últimos. La parte del colon que conecta al recto es el colon sigmoideo y la que conecta al intestino delgado es el ciego. Los alimentos digeridos parcialmente procedentes del intestino delgado entran al colon, el colon extrae agua y nutrientes de los alimentos y almacena el resto como desechos. Los desechos pasan del colon al recto y luego al exterior del cuerpo por el ano. (Figura 5). La pared del colon esta formada por cuatro capas

que incluyen la mucosa, la submucosa, la muscularis propia y la serosa. Microscópicamente en el interior se aprecia una superficie lisa a simple vista, pero puede observarse de forma irregular microscópicamente mediante cortes histológicos debido a la contracción muscular, a pequeños aumentos se puede ver la abertura de las criptas. Las criptas tienen una longitud aproximada de 0.5 mm y se extienden desde la mucosa hasta la muscularis (Fawcett, 1988; Fenoglio-Preiser *et al.*, 1989).

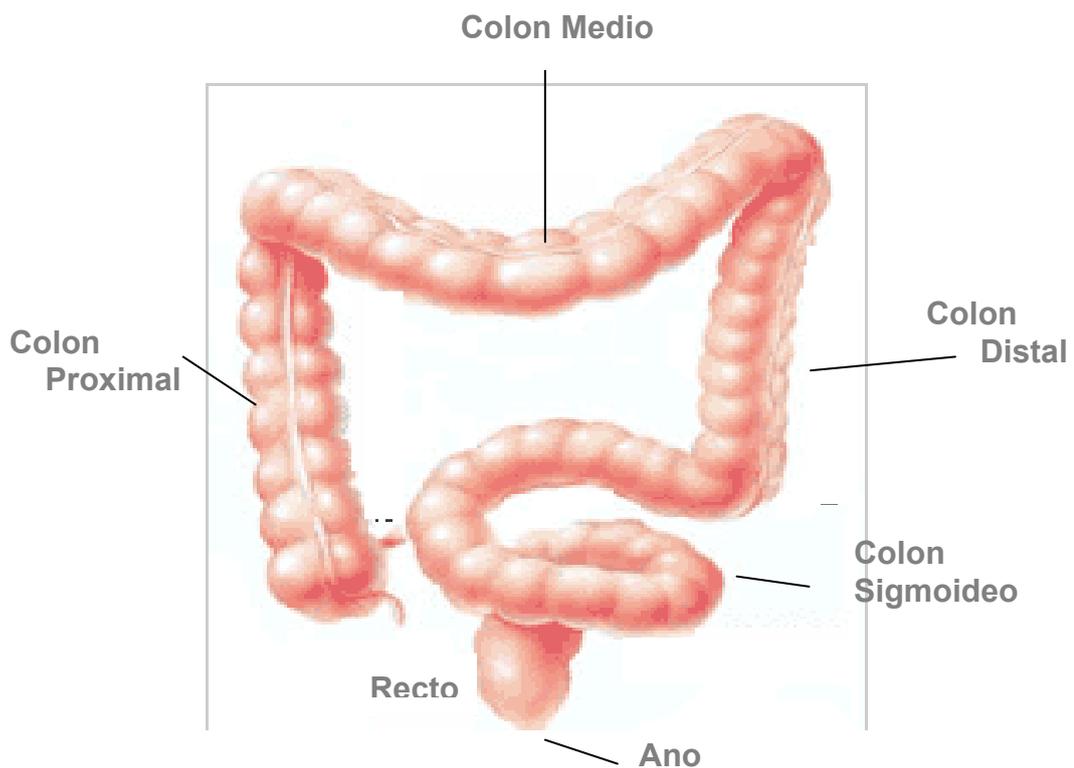


Figura 5. Anatomía del colon (<http://www.cancer.gov>, 2006).

2.4.2 Epidemiología

El cáncer de colon está asociado al nivel de desarrollo socioeconómico y al grado de occidentalización de los estilos de vida. La frecuencia de cáncer de colon varía de un modo notable entre diferentes poblaciones. Las tasas de incidencia son más elevadas en los países desarrollados como los Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda, son intermedias en áreas de Europa y bajas en regiones de Asia, América del Sur y África (Díaz, 1999). Las variaciones internacionales de la incidencia, muestran que los factores de riesgo asociados

con esta enfermedad son fundamentalmente de tipo ambiental y la dieta es el factor de riesgo más consistente. Otros factores incluyen la edad, los antecedentes personales (presencia de un adenoma o carcinoma previo), los antecedentes familiares y enfermedades de predisposición como la colitis ulcerosa (Feldman, *et al.*, 2000).

2.4.3 Desarrollo del cáncer de colon

En el desarrollo de cáncer se pueden distinguir las siguientes fases: displasia, adenoma, carcinoma *in situ* y metástasis. La primera indicación de un posible desarrollo de cáncer es una alteración ligera o moderada de la morfología de las células, denominada displasia. La lesión puede desaparecer espontáneamente en esta fase, e incluso a veces en la siguiente (adenoma). La expresión carcinoma *in situ* se aplica cuando aparecen células con ciertas características como alteraciones en los núcleos y multiplicación celular anormal, pero sin que haya penetración de la membrana subyacente que las mantiene en el tejido de origen. Cuando el crecimiento celular anormal alcanza zonas situadas por debajo del tejido de origen, se considera que el cáncer es invasivo. A menudo el cáncer de colon se extiende a los ganglios linfáticos que drenan la zona y puede difundirse por sangre y propagarse al hígado o a los pulmones (Teague, 1990; OMS, 1995).

2.4.4 Bases moleculares del cáncer de colon

El cáncer de colon proviene de una serie de mutaciones que comúnmente ocurren en una secuencia bien definida. Invariablemente el primer paso en la carcinogénesis de colon involucra la pérdida funcional del gen APC. El APC es un gen supresor de tumores y la pérdida de su función resulta en la formación de adenomas. Si una de las células de un adenoma continúa sufriendo mutaciones, puede activar al gen Ras que codifica proteínas fijadoras de nucleótidos de guanina que regulan vías de transducción de señales. La mayoría de las mutaciones de Ras parecen ocurrir durante estadios intermedios de crecimiento de los adenomas. El gen supresor DCC generalmente presenta

una mutación por delección y esta involucrado en interacciones de la adherencia célula a célula. La pérdida de una región cromosomal por una mutación en particular puede estar precedida por la inactivación del gen p53, el cual normalmente impide que células con un ADN dañado progresen más allá de la fase G1-S del ciclo celular. Los genes denominados hMSH2 y hMLH1 desempeñan un papel en la reparación de errores de apareamiento de pares de bases durante la replicación del ADN. Alteraciones en estos genes llevan a errores de la replicación del ADN y la acumulación de más mutaciones. En la Figura 6 se muestra la secuencia de eventos genéticos en la evolución de cáncer de colon (Pretlow *et al.*, 1994; Feldman *et al.*, 2000).

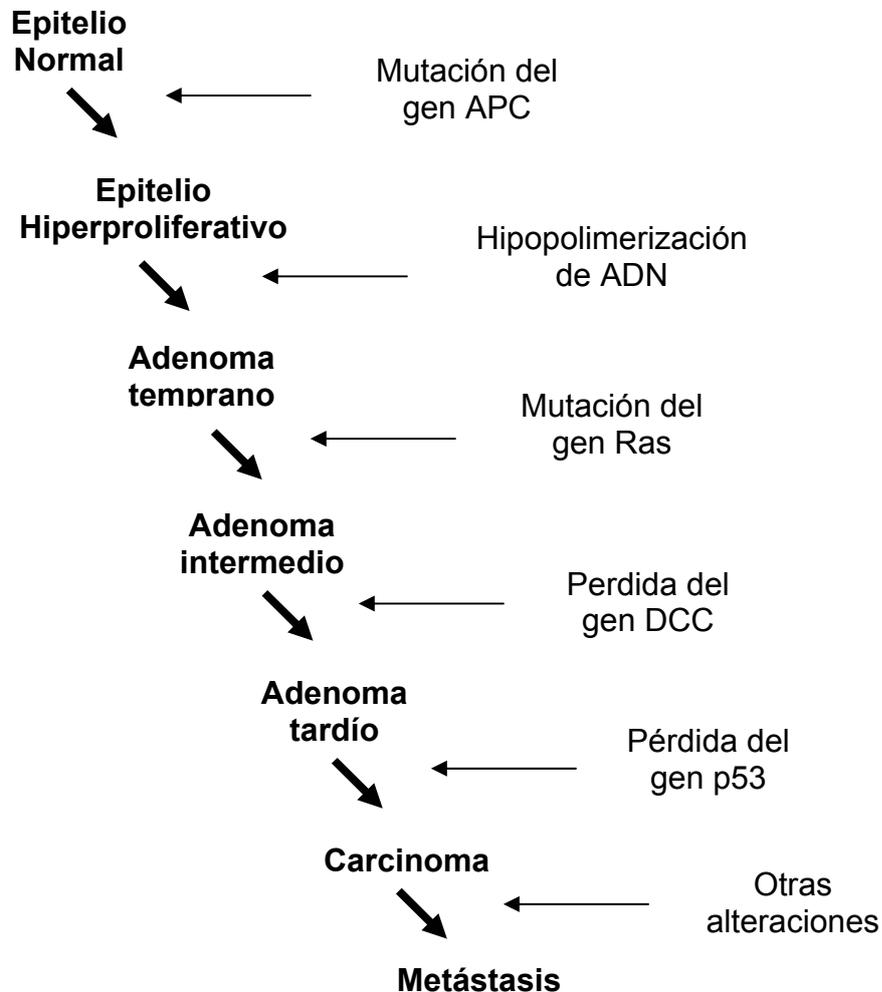


Figura 6. Fases del desarrollo de cáncer de colon y genes involucrados (Hodgson y Smart, 2001).

2.5 Bacterias intestinales y cáncer de colon

Una parte importante del ambiente intestinal es la flora bacteriana. Esta flora se encuentra en una posición favorable para modificar la interacción entre agentes exógenos ya sea del alimento, agua o gases y la superficie corporal en donde forman colonias. Se cree que la flora del colon juega un papel mediador en la carcinogénesis (Jin *et al.*, 2000) ya que las bacterias intestinales pueden formar carcinógenos o promotores a partir de los sustratos que se encuentran en la dieta o las secreciones intestinales. La dieta determina tanto la concentración del sustrato como la flora bacteriana que actúa en el colon, así como la cantidad de carcinógeno/promotor producido y ello explicaría en gran parte la relación entre la dieta y cáncer de colon. Las enzimas producidas por la flora bacteriana son relevantes en el proceso de carcinogénesis ya que hidrolizan conjugados transportados por vía enterohepática reactivando mutágenos inactivados o carcinógenos (Arimochi *et al.*, 1999). La mayor parte de los géneros de bacterias intestinales producen β -glucosidasa, principalmente *Streptococcus faecalis* y en menor proporción β -glucuronidasa siendo *Escherichia coli* la bacteria con mayor producción, no siendo así para especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Cuadro 1), por lo que la población bacteriana es determinante en la concentración de dichas enzimas. (Alexander-Williams *et al.*, 1983; Queiroz-Monici *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Producción de β -glucosidasa y β -glucuronidasa por bacterias intestinales de humano.

	Actividad media de β -glucosidasa*	Actividad media de β -glucuronidasa*
<i>Escherichia coli</i>	5.8	24.7
<i>Streptococcus faecalis</i>	192.7	2.9
Especies de <i>Lactobacillus</i>	26.0	1.6
Especies de <i>Clostridium</i>	22.1	11.3
Especies de <i>Bacteroides</i>	35.1	6.0
Especies de <i>Bifidobacterium</i>	29.3	1.9

* Actividad de enzima expresada como moles de sustrato degradados por hr/10⁸ células

(Alexander-Williams *et al.*, 1983)

2.6 Alimentos nutraceuticos y prevención de cáncer de colon

Un alimento nutraceutico es aquel que contiene el balance apropiado de nutrientes y compuestos bioactivos, los cuales ayudan a funcionar mejor y más efectivamente al organismo de los seres humanos, así como prevenir y ser coadyuvantes el tratamiento de enfermedades (Goldberg *et al.*, 1994). Existen ciertos alimentos denominados nutraceuticos de la dieta que modifican la incidencia y la aparición biológica de tumores, debido a que sus nutrientes y compuestos bioactivos específicos pueden modificar rutas genéticas relacionadas con el cáncer (Lee *et al.*, 2004).

En la literatura hay diversos estudios que tratan de relacionar la ingesta de leguminosas y el riesgo de cáncer, pero resulta difícil dictaminar la contribución cuantitativa dada por las leguminosas para el riesgo de cáncer debido a ciertos factores (Milner, 2002):

- Diversidad de leguminosas: Tienen composición química heterogénea dependiendo de la leguminosa.
- Diversidad de leguminosas contenidas en productos alimenticios.
- Baja ingesta de leguminosas, especialmente en países desarrollados.
- Correlación de ingesta: Pueden ser consumidos con otros vegetales.

Las sustancias con potencial para prevenir cáncer en las leguminosas tienen una o más propiedades (Milner, 2002): 1) previenen daño del DNA, 2) incrementan la reparación del DNA, 3) aumentan apoptosis de células dañadas, 4) promueven la inmunocompetencia, 5) reducen el crecimiento del tumor, 6) previenen metástasis.

2.7 Frijol

El frijol es una leguminosa originaria de Mesoamérica, la cual se ha cultivado desde hace 8 mil años. Se considera que existen alrededor de 150 especies, en México se encuentran cerca de 50, destacando las cuatro especies que el hombre ha domesticado, como son; *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus coccineus* L. (frijol ayocote), *Phaseolus lunatus* L. (frijol comba) y *Phaseolus acutifolius* Gray (frijol tépari). En México, las especies más importantes en cuanto superficie sembrada y producción son las dos primeras. Existen diferentes tipos de frijol como son los: azufrado, mayocoba, negro, peruano, flor de mayo, flor de junio, entre otras (www.siea.sagarpa.gob.mx, 2003).

El frijol se consume en México en una gran variedad de formas, además de ser demandado en varias clases comerciales de diferente color, forma y tamaño. Prácticamente cada localidad tiene preferencias que varían en color, tamaño y brillo del grano. Así, en la región Noreste la principal clase comercial que se consume es Pinto, seguida por la clase Bayo. Las clases Flor de Mayo y Flor de Junio son de menor consumo. En el Noroeste la clase comercial que se consume principalmente es del tipo azufrado (97.5%). Mientras que en región Centro se consumen prácticamente todas las clases comerciales, con excepción del frijol pinto. Sin embargo, sobresale la clase flor de mayo seguida de la clase flor de junio. En la región Sur se prefiere en un 90% el frijol negro seguido por el bayo, este último con muy poca aceptación (Castellanos *et al.*, 1997).

El grano de esta leguminosa, es parte base de la alimentación de este país principalmente por sus raíces culturales e históricas. El frijol es un alimento fundamental sobre todo para las clases más desprotegidas del país, ya que constituye su principal fuente de proteína (Castellanos *et al.*, 1997; www.siea.sagarpa.gob.mx, 2003).

2.7.1 Composición del Frijol

El frijol contiene 16–33% de proteína (Iniestra-González *et al.*, 2005), se caracteriza por ser deficiente en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y triptofano (Serrano y Goñi, 2004). La cantidad de carbohidratos se encuentra en un intervalo del 55 – 65% de peso seco, de esta fracción, el almidón y la fibra son los mayores constituyentes, además contiene oligosacáridos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa) y aporta vitaminas del complejo B y minerales como el hierro y calcio. Sin embargo, la presencia de factores antinutricios como inhibidores de tripsina, ácido fítico, taninos y saponinas reducen su valor biológico (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2005; Díaz-Batalla *et al.*, 2006). En el Cuadro 2 se muestra la composición del frijol.

Cuadro 2. Composición nutricional del frijol negro crudo

		Contribución de la ración diaria de frijol (70.5 g) (%)
Energía	345 kcal	8.3
Humedad	10.6g	
Proteína	21.8g	25.4
Grasa	14g	-
Carbohidratos	63.5g	-
Tiamina	0.99 mg	40.4
Riboflavina	0.201 mg	7.5
Niacina	1.93 mg	4.9
Vitamina B6	0.285 mg	8.8
Acido fólico	0.447 mg	134.4
Fósforo	380.3 mg	28.4
Potasio	1424.3 mg	34.6
Sodio	5.2 mg	0.3
Calcio	92.3 mg	5.6
Magnesio	195.6 mg	35.5
Zinc	3.96 mg	15.9
Cobre	0.77 mg	27.5
Hierro	4.82 mg	19.1

(Serrano y Goñi, 2004)

2.7.2 Frijol y su relación con cáncer de colon

Existe evidencia que sugiere que el consumo de frijol común (*P. vulgaris*) puede ayudar a reducir la mortalidad por cáncer de colon, por ejemplo, Hughes *et al.*, (1997) mencionan que el incorporar a la dieta cerca del 60% de frijol ayuda a disminuir alrededor del 50% de tumores colónicos con respecto al control en un modelo de ratas F344 inducidas químicamente con el carcinógeno azoximetano. Resultados similares fueron confirmados por Hangen y Bennink (2002), ya que al incorporar a la dieta el 75% de frijol de dos cultivares (blanco y negro), el frijol blanco redujó la incidencia de tumores en un 54% y el frijol negro redujó en un 59% con respecto al control (Figura 7). Ríos *et al.*, (2007) demostró que distintas variedades de frijol incorporadas en la dieta en un 0.4% también redujeron significativamente la multiplicidad de tumores colónicos (Figura 8), destacando las variedades pigmentadas, con una disminución de hasta 75%, principalmente una variedad oscura denominada Negro 8025 y una variedad crema moteado denominada Pinto Zapata. Sin embargo, no existen estudios de dosis-respuesta del frijol para la inhibición del cáncer de colon que puedan proporcionar información acerca de la dosis recomendada que ofrezca el mayor efecto inhibitorio.

Los beneficios del frijol contra el cáncer de colon son atribuidos a sus compuestos bioactivos, tales como: los compuestos fenólicos, inhibidores de proteasas, ácido fítico y saponinas, además de la presencia de ambas fibras soluble e insoluble, almidón resistente y oligosacáridos (Hughes *et al.*, 1997; Thiagarajan *et al.*, 1998; Hangen y Bennink, 2002).

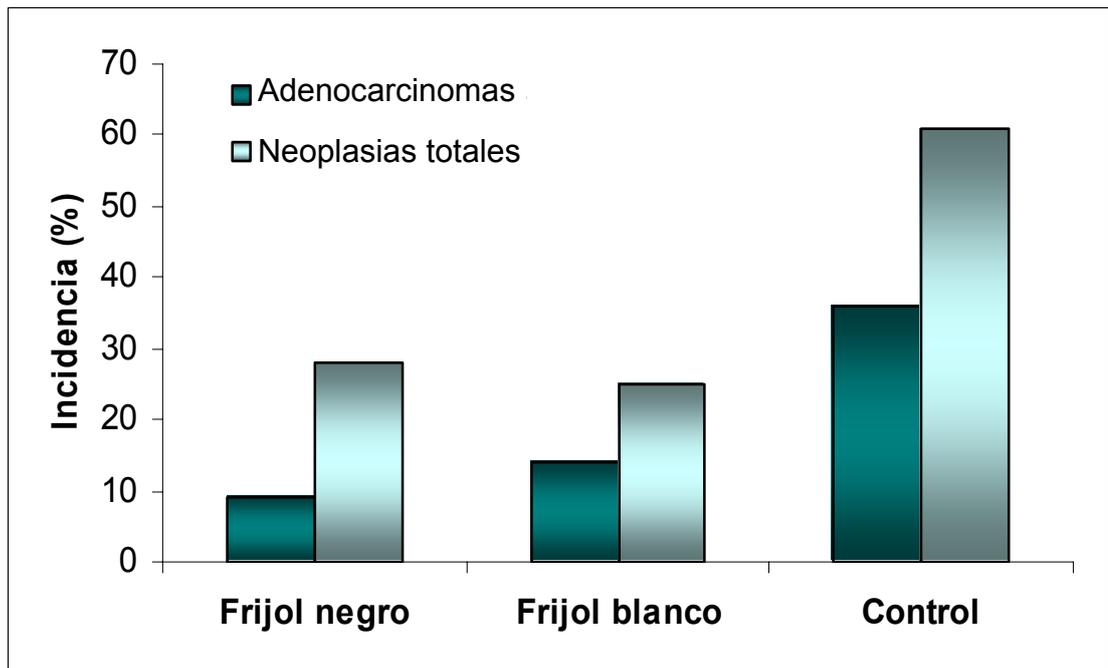


Figura 7. Incidencia de tumores colónicos en ratas macho F344 inducidas con azoximetano y alimentadas con dos tipos de cultivares de frijol y el control con caseína (Hangen y Bennink, 2002).

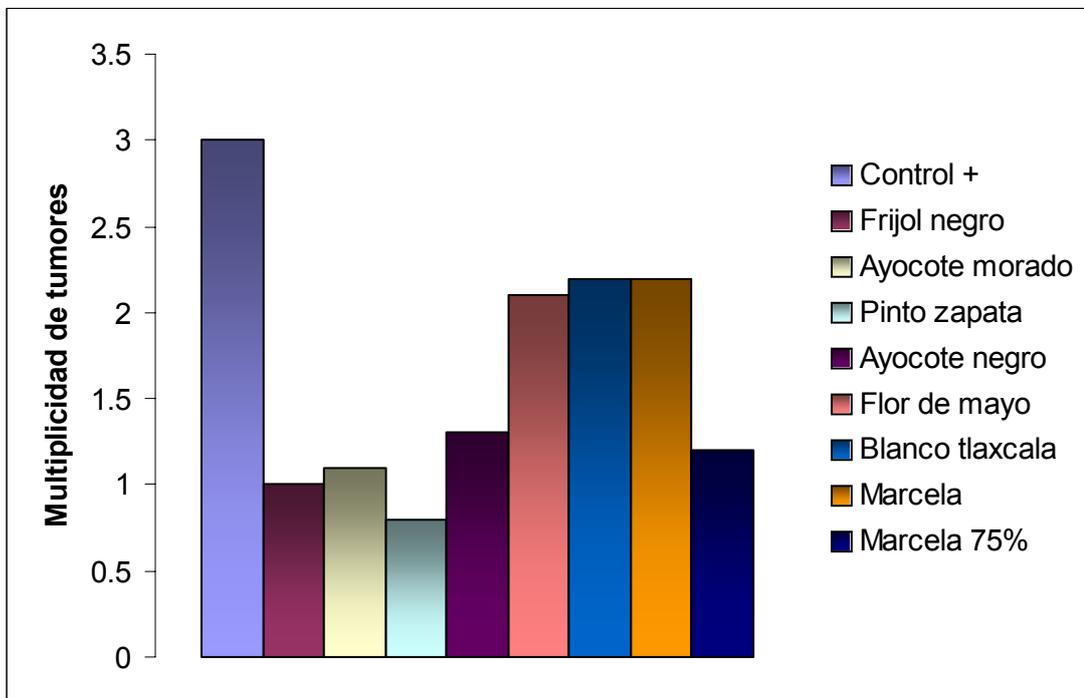


Figura 8. Efecto protector sobre cáncer de colon de diferentes variedades de frijol cocido en ratas Sprague-Dawley inducidas con 1,2-dimetilhidrazina (Ríos et al., 2006).

2.7.3 Compuestos bioactivos del frijol relacionados con la prevención de cáncer de colon

Algunos estudios proveen evidencia de protección de las leguminosas contra el cáncer de colon (Cuadro 3) (Mathers, 2002; Cavallé de Moya *et al.*, 2003).

Cuadro 3. Componentes con potencial protector contra cáncer de colon provenientes de las leguminosas.

Nutrientes	Microconstituyentes Bioactivos
Almidón resistente	Inhibidores de proteasas
Polisacáridos (No almidón)	Saponinas
Oligosacáridos	Fitoesteroles
Folatos	Lectinas
Selenio	Fitatos
Zinc	

(Mathers, 2002)

2.7.3.1 Carbohidratos

Los carbohidratos son el componente mayoritario del frijol. La mayor parte esta conformado por carbohidratos complejos, almidón y fibra dietética, mientras que la fracción de azúcares (mono, di y oligo) es significativamente menor (Serrano y Goñi, 2004). En el Cuadro 4 se muestra la caracterización de los carbohidratos.

La fibra insoluble, junto con el almidón resistente y los oligosacáridos, constituyen la fracción indigestible del alimento, los cuales pueden ser fermentados por la microbiota colónica, dando origen a ácidos grasos de cadena corta (AGCC; acético, propiónico y butírico) (Serrano y Goñi, 2004). Los AGCC ejercen efectos fisiológicos sistémicos sobre el metabolismo de lípidos y locales que repercuten sobre el metabolismo colónico. El ácido propiónico está relacionado con la disminución de colesterol plasmático debido a la inhibición de

la colesterogénesis y el ácido butírico se ha demostrado que induce apoptosis, arresto del ciclo celular y promueve diferenciación en células colónicas tumorales (Rao *et al.*, 1998). Por otra parte, se ha demostrado que el ácido butírico incrementa la actividad de GST en células provenientes de un cáncer de colon humano, la cual es una enzima de fase II encargada de la detoxificación de carcinógenos y sustancias tóxicas del organismo (Ebert *et al.*, 2003; Pool-Zobel, *et al.*, 2005).

Además, existe evidencia de que la fibra disminuye en gran medida la ganancia de peso, así como los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre (Linde *et al.*, 2006; Vitolo *et al.*, 2007) y se ha comprobado que inhibe la actividad de la enzima bacteriana β -glucuronidasa que ha sido propuesta como un marcador de riesgo para cáncer de colon (Manoj *et al.*, 2000; Queiroz-Moncini *et al.*, 2005).

Cuadro 4. Clasificación de los carbohidratos de frijol cocido

Carbohidratos glicémicos	(% materia seca)
Glucosa libre	0.1
Almidón total	42.9
Almidón rápidamente digerible	6.5
Almidón lentamente digerible	8.4
Índice glicémico (pan blanco como referencia)	28
Carbohidratos no glicémicos	
Fibra dietética total	27.0
Fibra soluble	4.5
Fibra insoluble	22.6
Almidón resistente	26.9
Oligosacáridos no digestibles	
Rafinosa	0.4
Estaquiosa	3.2
Verbascosa	0.1

(Serrano y Goñi, 2002)

2.7.3.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos juegan un papel muy importante en el rol de la salud debido a que presentan algunas actividades biológicas como capacidad antioxidante, antimutagénica, anticarcinogénica (Weiguang *et al.*, 2005). De entre los compuestos fenólicos del frijol se ha determinado la presencia de flavonoides (quercetina, camferol, antocianinas), ácidos fenólicos (ácido *p*-hidroxibenzoíco, ácido vanilínico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico), isoflavonas (genisteina, daizeina) y cumestrol (Díaz-Batalla *et al.*, 2006; Espinosa-Alonso *et al.*, 2006). Las isoflavonas se han relacionado con la inhibición de la proliferación celular (McDonald *et al.* 2005). En cuanto a los efectos benéficos de la quercetina y la genisteina, se ha demostrado que promueven apoptosis y reducen las lesiones precancerosas de colon (fosas crípticas aberrantes) (Volate *et al.*, 2005). Las antocianinas se ha propuesto que inducen el arresto del ciclo celular e inducen apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon humano, por mencionar algunos de los beneficios (Zhao *et al.*, 2004).

2.7.3.3 Saponinas

En diversos estudios se ha reportado la presencia de saponinas en el frijol (6.4 a 19 g/Kg de ps) (Kozuharov *et al.*, 1986; Drumm *et al.*, 1990). Las saponinas son estructuras químicas que consisten de agliconas triterpenoides o esteroidales unidas a carbohidratos, pueden inhibir la proliferación de células cancerosas de colon mediante arresto celular, promoviendo apoptosis, incrementando la proliferación de macrófagos e inhibiendo la respuesta inflamatoria, además se ha sugerido que promueven la muerte celular programada no apoptótica (macroautofagia) (Raju *et al.*, 2004; Ellington *et al.*, 2005, 2006).

2.7.3.4 Ácido fítico

El ácido fítico es un carbohidrato polifosforilado que se encuentra en altas concentraciones en cereales y leguminosas. Los grupos fosfato se unen en los carbonos 1, 2, y 3 (ecuatorial-axial, axial y ecuatorial) y promueven una interacción específica con el hierro para inhibir completamente su habilidad de catalizar la formación de radicales hidroxilo (Vucenik y Shamsuddin, 2003).

Existe evidencia de que el ácido fítico promueve apoptosis y diferenciación en células de colon distal, además de que tiene efectos favorables sobre la morfología del colon reduciendo la presencia de fosas crípticas aberrantes (Jenab y Thompson, 2000). Por otra parte, se le ha relacionado con el incremento en la proliferación de células citocida natural (NK), que son encargadas de la destrucción e inhibición del crecimiento tumoral (Zhang *et al.*, 2005).

2.8 Modelo animal de carcinogénesis de colon

Los estudios experimentales con animales del laboratorio han permitido corroborar gran parte de los conocimientos obtenidos en las investigaciones epidemiológicas, en un esfuerzo por determinar el origen de cáncer de colon humano y de los factores de riesgo involucrados (Lindström *et al.*, 1978). En este sentido existen varios modelos de cáncer experimental de colon en animales de laboratorio, dichos modelos utilizan ratas, ratones y hámsters, a los cuales se les induce cáncer con diferentes sustancias químicas carcinogénicas como la 1,2-dimetilhidrazina, metilazoximetanol, azoximetano, N-metilnitrosourea, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, siendo la 1,2-dimetilhidrazina la más utilizada, ya que es uno de los carcinógenos químicos más efectivos que inducen cáncer de colon en el 80 al 100% de las ratas, entre 5 y 7 meses posteriores al inicio del tratamiento, debido principalmente a su actividad alquilante en los ácidos nucleicos del epitelio intestinal (Negrette *et al.*, 2000). Este carcinógeno actúa modificando el genoma de las células colónicas

causando alteraciones celulares como pérdida de la diferenciación, invasividad o proliferación anormal (Lodish *et al.*, 2003).

2.8.1 Metabolismo de la 1,2-dimetilhidrazina

Agentes carcinogénicos como la 1,2-dimetilhidrazina se encuentran en el hígado una hora después de la inyección subcutánea y tres horas después en células epiteliales del colon (Jackson y Singletary, 2004). El carcinógeno es metabolizado en el hígado por la acción de enzimas flavín monooxigenasas (FMO) o citocromo P450, también conocidas como enzimas de fase I, que la transforman a azoximetano y posteriormente a metilazoximetanol. Estos metabolitos son glucuronidados por enzimas de fase II y se excretan a través de la bilis hacia el intestino. En el intestino, la enzima β -glucuronidasa provoca nuevamente la liberación del metilazoximetanol del cual se deriva un ión metilcarbonio (CH_3^+). Este ión se cree que es el responsable de la actividad carcinogénica de la DMH, al unirse al ADN de las células del colon. La alquilación en la posición O^6 -metilguanina que ha sido detectada en tejidos en el ADN de tejidos de ratas y ratones que fueron expuestos a la 1,2-dimetilhidrazina. La O^6 -metilguanina puede inducir mutaciones en genes de proliferación celular, genes supresores de tumores, genes involucrados en reparación de ADN o en genes que regulan la apoptosis mediante la transición de GC a AT, responsable de desarrollo de tumores en el tejido del colon de ratas. Por otra parte, este carcinógeno se secreta principalmente por pulmones arrojando en la expiración metabolitos como CO_2 y azoximetano, además de secretarse también en la orina por los riñones, en donde el carcinógeno se encuentra en inalterado (Figura 9) (Jackson *et al.*, 1999; Klaassen, 2001).

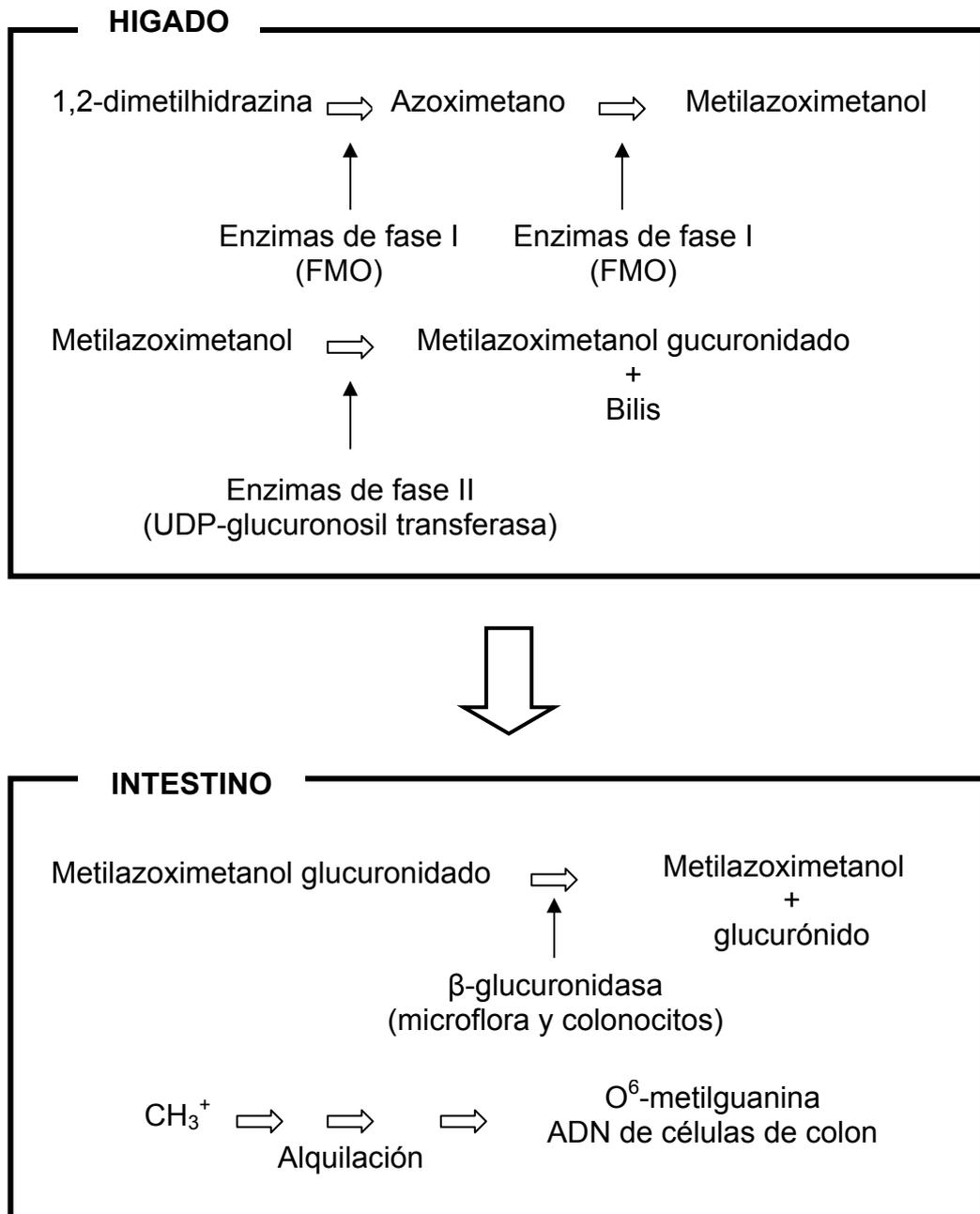


Figura 9. Metabolismo de la 1,2-dimetilhidrazina (Corpet y Tache, 2002).

3. JUSTIFICACIÓN

El consumo de frutas, verduras y leguminosas se ha vinculado con la prevención de cáncer de colon, cuyo beneficio se atribuye a sus compuestos bioactivos. De entre las leguminosas podemos mencionar al frijol, que es uno de los alimentos primordiales en la dieta del mexicano. Sin embargo, el consumo de frijol varía entre la zona rural y la urbana.

Mediante estudios con modelos animales, se ha comprobado que el consumo de frijol, tanto en altas como en bajas concentraciones disminuye la incidencia de cáncer de colon. También se ha informado que los carbohidratos no digeribles de frijol pueden fermentarse en el tracto gastrointestinal produciendo ácidos grasos de cadena corta. Dichos ácidos grasos tienen la capacidad de inducir apoptosis, arresto del ciclo celular, incremento en la actividad de la enzima GST; así como disminuir los niveles de colesterol sérico. Además la fibra se ha relacionado con una disminución en la ganancia de peso, en los niveles de colesterol y glucosa en sangre y con la inhibición de la enzima β -glucuronidasa. Así mismo, el frijol contiene compuestos fenólicos, fitatos y saponinas que también pueden llevar a cabo la inhibición del desarrollo de cáncer por los mecanismos antes citados.

Debido a que las variedades Negro 8025 y Pinta Zapata a bajas concentraciones disminuyeron hasta en un 75% la multiplicidad de tumores en colon de ratas inducidas con 1,2-dimetilhidrazina y de que no existen estudios de dosis-respuesta del frijol para la inhibición del cáncer de colon, en el presente trabajo se determinó el efecto de diferentes concentraciones de consumo de estas dos variedades sobre el desarrollo de cáncer de colon considerando el consumo *per capita* urbano (0.5 y 3%) y el consumo *per capita* rural (12.5, 25 y 50%) y sobre algunos de los parámetros de predisposición; así como los posibles mecanismos de acción evaluando la inhibición de la proliferación celular mediante la expresión de la proteína PCNA, la actividad de la enzima GST y la actividad enzimática de β -glucuronidasa.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del consumo de diferentes concentraciones de frijol cocido (*Phaseolus vulgaris*): Pinto zapata y Negro 8025, sobre el desarrollo de cáncer de colon en un modelo animal y determinar su mecanismo de acción.

4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la composición proximal, taninos condensados, antocianinas y la capacidad antioxidante *in vitro* de las diferentes variedades de frijol cocido en estudio.
- Identificar *in vivo* algunos factores de riesgo de cáncer de colon que pudieran estar regulados por el consumo de diferentes concentraciones de frijol cocido: ganancia de peso, perfil lipídico, ácidos grasos de cadena corta, actividad de las enzimas β -glucuronidasa y glutatión S-transferasa en ratas sanas Sprague-Dawley.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de dos variedades de frijol cocido sobre la incidencia, multiplicidad y número promedio de tumores en colon de ratas Sprague-Dawley tratadas con el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina.
- Determinar el posible mecanismo de protección de diferentes concentraciones de frijol cocido sobre el desarrollo de cáncer de colon; ganancia de peso, perfil lipídico, actividad de las enzimas β -glucuronidasa y glutatión S-transferasa.
- Evaluar el efecto de las dietas de frijol a diferentes concentraciones sobre el proceso de proliferación celular a través de la expresión de la proteína PCNA en muestras de colon de los animales tratados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Material Biológico

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de cuatro semanas de edad del bioterio Rismart S. A. de C. V.

Las variedades de frijol: Pinto Zapata y Negro 8025 cosecha 2005 fueron proporcionadas por el campo experimental bajo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

5.1.2 Reactivos

Los reactivos utilizados para la determinación de taninos condensados, antocianinas y capacidad antioxidante fueron de la marca Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MI). La 1,2-dihidrocloruro de dimetilhidrazina utilizada para la inducción de cáncer de colon fue de la marca Fluka (Parque Industrial Toluca 2000, Edo. de México). Los kits utilizados para la determinación de glucosa y el perfil de lípidos fueron de la marca Randox. Para la determinación de actividad de las enzimas β -glucuronidasa en contenido distal y GST hepática los reactivos fueron de la marca Sigma. Para la determinación de proteínas se utilizó el kit de proteínas BCA de la marca PIERCE (Rockford, IL). Los solventes utilizados para la cuantificación de AGCC fueron de la marca J. T. Baker (Xalostoc, Estado de México, México). Para la evaluación de la proliferación celular se cuantificó la expresión de PCNA empleando reactivos de la marca Sigma, Biorad, Santa Cruz (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) y Kodak. En el estudio histopatológico se utilizaron reactivos de la marca J. T. Baker y de la marca Mallinckrodt Baker.

5.2 Metodología

5.2.1 Preparación de la dietas con frijol

El frijol Pinto Zapata y el Negro 8025 fueron cocidos en una relación 1:1.6 en agua (w/v) a una temperatura de $96 \pm 2^\circ \text{C}$, se trituraron y se secaron a 60°C , posteriormente se molieron en un molino pulvex para poder obtener las harinas que se mantuvieron en refrigeración y protegidas de la luz hasta su uso. Se realizó un análisis bromatológico a las harinas de acuerdo a las técnicas reportadas por la AOAC (proteínas 920.87, carbohidratos 939.03, grasa 920.85, fibra 920.86 y minerales 923.03) que fue considerado para la elaboración de las dietas. Así mismo se determinó la cantidad de taninos condensados, antocianinas y capacidad antioxidante de las mismas.

5.2.1.1 Taninos condensados

La extracción de taninos condensados se realizó por el método de Cardador-Martínez *et al* (2002) de la siguiente manera. Se colocaron 200 mg de harina de frijol en un matraz de 50 ml y se adicionaron 10 ml de metanol, se protegió de la luz y se agitó durante 24 horas. El material obtenido se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue separado y empleado para la cuantificación.

La cuantificación se realizó de acuerdo al método de la vainillina, descrito por Desphande y Cheyran (1987), modificado a microplaca. Del sobrenadante obtenido se tomaron 50 μl y se colocaron en los pozos de la microplaca y después se adicionaron 200 μl de la solución de vainillina al 0.5% recién preparada (vainillina 1% en metanol y HCl 8% en metanol en una relación 1:1). Para ajuste se preparó un blanco al cual se le adicionaron 50 μl de sobrenadante y 200 μl de HCl 4%. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Thermo, Multiskan Ascent) con filtros de 492 y 540 nm. La concentración se obtuvo mediante una curva estándar de (+)-catequina (0-0.2 mg/ml). Los taninos

condensados fueron expresados como mg equivalentes de (+)-catequina/g de harina.

5.2.1.2 Antocianinas

La extracción y cuantificación de antocianinas se llevo a cabo por el método de Abdel-Aal y Hulc (1999). Mediante el cual se pesaron 3 g de harina de frijol a los cuales se les agregó 24 ml de etanol acidificado (etanol en HCl 1N, 85:15 v/v). La solución se mezcló con ayuda de un vortex y se llevo hasta pH 1 con HCl 4N. Posteriormente, la solución fue nuevamente agitada durante 15 minutos y al término de este tiempo se midió el pH para verificar que se mantuviera en 1. La solución se centrifugó a 27200 g durante 15 minutos y el sobrenadante fue recuperado. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-visible a 535 nm. Como estándar se utilizó la cianidina 3-glucósido, de la cual se realizó una curva con concentraciones de 0-27 µg/3 ml. La concentración total de antocianinas (mg/Kg) se determinó mediante una relación lineal en base a la siguiente fórmula:

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

Donde: C es la concentración de antocianinas totales (mg/Kg), A es la lectura de absorbancia, ε es el coeficiente de absortividad molar de la cianidina 3-glucósido ($25\,965\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$), V es el volumen total del extracto y PM es el peso molecular de la cianidina 3-glucósido (449 g/mol).

5.2.1.3 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante *in vitro* se determino por el método de Arts *et al* (2003), se pesó 1 g de harina de frijol y se adicionaron 10 ml de metanol. La solución fue homogenizada con un vortex y dicha solución se mantuvo en agitación constante durante 24 horas. Al transcurrir este tiempo, la solución se centrifugó a 5 000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue recolectado. La capacidad antioxidante se realizó mediante el ensayo CAET (Capacidad

Antioxidante en Equivalentes de Trolox), el cual se basa en la capacidad del antioxidante y de los compuestos para donar electrones al radical ABTS y así hacerlo estable. El radical produce una coloración verde-azul a través de la reacción que ocurre entre el ABTS 7 mM y el persulfato de amonio 2.45 mM. La solución se preparó y se almacenó en completa oscuridad con un tiempo de 12 horas antes de su uso. Cabe mencionar que la solución debe usarse entre las 12-16 horas de su preparación.

La solución de ABTS con persulfato de amonio fue diluida con una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 hasta obtener una absorbancia final de 0.7 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm. Al obtener la absorbancia adecuada, se mezcló la muestra con solución ABTS en una relación 1:100 (1 μ l de muestra en 99 μ l de ABTS) y esta solución se leyó a los 6 minutos a la misma longitud de onda. Para obtener los equivalentes de trolox (μ M eq de trolox/g de harina), se realizó una curva estándar de trolox preparado con etanol, para la cual se adicionaron 10 μ l de trolox a diferentes concentraciones (0-800 μ M) en 990 μ l de ABTS y su absorbancia se midió a los 6 minutos a 734 nm. El blanco se preparó con 10 μ l de etanol en 990 μ l de ABTS. La concentración de equivalentes de trolox se calculó mediante la relación lineal de la disminución de la absorbancia en una relación molar.

Estudios *in vivo*

5.2.2 Grupos de estudio

Se utilizaron un total de 214 ratas macho Sprague-Dawley de cuatro semanas de edad, las cuales se mantuvieron en jaulas a temperatura de 25° C bajo ciclos de luz-oscuridad (12 h), alimentadas con alimento Zeigler (NIH-31 Rismart S. A. de C. V.).

Antes de iniciar el tratamiento, los animales se aclimataron una semana y después se asignaron aleatoriamente para formar los grupos. El experimento se dividió en dos etapas.

5.2.2.1 Primera etapa

Se formaron siete grupos, un grupo control (dieta base) y los grupos tratados con frijol (12.5, 25 y 50%). Estos tratamientos consideran el intervalo de consumo de frijol *per capita* rural (Cuadro 5). El frijol se incorporó en la dieta y los animales fueron alimentados durante 5 semanas y posteriormente sacrificados. Cada semana se registró el consumo de alimento, peso corporal y la ganancia de peso, así como la sobrevivencia de los grupos en estudio. En esta etapa se evaluaron algunos factores asociados con cáncer de colon que pudieran estar regulados por el consumo de frijol como la concentración de glucosa y el perfil de lípidos en sangre, la actividad enzimática de GST en hígado, la actividad enzimática de β -glucuronidasa y la concentración de AGCC en el contenido distal colónico.

Cuadro 5. Grupos experimentales de la primera etapa

Grupo	Pinto Zapata	Negro 8025
1 ^a	X	X
2	12.5%	X
3	25%	X
4	50%	X
5	X	12.5%
6	X	25%
7	X	50%

^a Control
1, n=4
2 a 7 n=5

5.2.2.2 Segunda etapa

En esta etapa se trabajó con 10 grupos, un control negativo (dieta base), un control positivo (1,2-dimetilhidrazina) y los grupos tratados con ambas variedades de frijol, en los cuales se consideró el consumo *per capita* urbano (0.5 y 3%) y el consumo *per capita* rural (12.5 y 25%) (Cuadro 6). El frijol fue

incorporado en la dieta y se administró a los animales antes (4 semanas), durante (8 semanas) y después (11 semanas) del carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina. Cada semana se registró el consumo de alimento, peso corporal y la ganancia de peso de los grupos en estudio, así como la sobrevivencia. Al finalizar el tratamiento se cuantificó la incidencia, multiplicidad y número promedio de adenocarcinomas. En esta etapa también se evaluaron factores asociados con cáncer de colon que pudieran estar regulados por el consumo de frijol como la concentración de glucosa y el perfil de lípidos en sangre, la actividad enzimática de GST en hígado y la actividad enzimática de β -glucuronidasa en el contenido distal colónico.

Cuadro 6. Grupos experimentales de la segunda etapa

Grupo	Pinto Zapata	Negro 8025	DMH	Solución salina
1^a	x	x	x	✓
2^b	x	x	✓	x
3	0.5%	x	✓	x
4	3%	x	✓	x
5	12.5%	x	✓	x
6	25%	x	✓	x
8	x	0.5%	✓	x
9	x	3%	✓	x
10	x	12.5%	✓	x
11	x	25%	✓	x

^a Control negativo

^b Control positivo

1, n=10

2, n=26

3 a 11, n=18

5.2.3 Preparación de la 1,2-dimetilhidrazina

Se preparó una solución de 1,2-dimetilhidrazina 0.07 M en solución fisiológica estéril, la cual contenía 37mg de EDTA por cada 100 ml como agente estabilizador, finalmente se ajustó a un pH de 6.5, empleando NaOH. El compuesto se preparó semanalmente 24 horas antes de la inducción.

5.2.4 Inducción del cáncer de colon

Tanto al control positivo como a los grupos de frijol se les administró por vía subcutánea 1,2-dimetilhidrazina a una dosis de 21 mg/Kg de peso corporal, una vez a la semana durante 8 semanas. De igual manera, al control negativo se le administró solución fisiológica estéril, para mantenerlo bajo las mismas condiciones.

5.2.5 Sacrificio y obtención de muestras

Las ratas de la primera etapa se sacrificaron por medio de anestesia con éter etílico a las 5 semanas de consumir la dieta y los animales de las segunda a las 18 semanas después de la primera inyección del carcinógeno.

A las ratas se les realizó una incisión torácica abdominal media. Se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca y se extrajo el hígado el cual se congeló con nitrógeno líquido. Posteriormente se llevo a cabo una apertura longitudinal del colon por el borde antimesentérico y se tomó una muestra de contenido distal que también fue congelado para su posterior análisis.

Al colon de los animales pertenecientes a la segunda etapa se les realizó una limpieza de la superficie de la mucosa con solución fisiológica fría estéril y posteriormente el colon fue fijado en un trozo de corcho con alfileres a 4° C. Después de fijar el colon, este se dividió en dos zonas en base a su morfología: proximal y distal. Se identificaron las lesiones en base a la morfología

macroscópica descrita por Piñols (1998) y se realizaron cortes de estas lesiones para su posterior análisis.

Estudio histopatológico

Las lesiones se colocaron en una solución amortiguadora de formaldehído al 10%, preparada a partir de formaldehído al 37% y solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (fosfato mono y dibásico de sodio). Posteriormente, estos cortes fueron deshidratados por medio de un gradiente de alcoholes (agua destilada, etanol al 70%, etanol al 90%, etanol absoluto y finalmente xilol) para la conservación de las estructuras del tejido. Después de la deshidratación, el tejido fue embebido en parafina por medio de un histoquinet. Ya parafinado, al tejido se realizaron cortes histológicos por medio de un microtomo con un grosor de 10 μm , los cuales se fijaron en un portaobjetos por medio de un baño termostatzado y posteriormente los cortes fijados se rehidrataron pasándolos nuevamente por un gradiente de alcoholes (xilol, etanol absoluto, etanol al 90%, etanol al 70% y agua destilada); ya hidratados se tiñeron con hematoxilina-eosina, finalmente a la laminilla se le colocó un cubreobjetos fijándolo con la resina eukitt. Se llevo a cabo la observación microscópica a 10x, 40x y 100x en un microscopio Olympus PX40, para así determinar que muestras presentaban tejido normal, con displasia, adenomas o adenocarcinomas. El análisis estuvo a cargo del Dr. Gallegos Corona, profesor investigador encargado del Laboratorio de Histopatología, de la Facultad de Medicina, UAQ. La evaluación se hizo de acuerdo a la escala establecida por Riddell *et al* (1983), en donde se clasifican las lesiones en negativo, displasia positiva de primer grado, segundo grado y tercer grado y a los adenocarcinomas poco, moderadamente y bien diferenciado. En base a lo observado se determinó la incidencia, multiplicidad y el número promedio de tumores.

5.2.8 Evaluación de la concentración de glucosa en sangre y perfil de lípidos

Para determinar la concentración de glucosa y el perfil de lípidos, el cual incluye triglicéridos, colesterol total y HDL, la sangre se centrifugó para la obtención del suero.

5.2.8.1 Determinación de glucosa

Se utilizó un kit de la marca Randox, cuyo principio se basa en que la glucosa presente en la muestra, por medio de la glucosa oxidasa forma ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, éste último reacciona con el 4-aminofenazona y el fenol, produciendo un compuesto colorido (quinoneimina) mediante la enzima peroxidasa. La muestra fue leída en un espectrofotómetro SmartSpec™Plus a 500 nm. La intensidad de color fue proporcional a la concentración de glucosa en sangre y ésta se determinó por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{mg/dL} = \frac{\text{Abs de la muestra}}{\text{Abs del estándar}} * 100$$

5.2.8.2 Determinación de triglicéridos

Para medir la concentración de triglicéridos en las muestras se utilizó un kit de la marca Randox. Por medio de este análisis los triglicéridos presentes en la muestra se determinaron a partir de la hidrólisis enzimática con lipasas, dando lugar al glicerol. El glicerol por acción de la enzima glicerol cinasa fue convertido a glicerol-3-fosfato que al estar en presencia de oxígeno y por la enzima glicerol fosfato oxidasa produce el compuesto dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reacciona con el 4-aminofenazona y el 4-clorofenol, y mediante la enzima peroxidasa se produce un compuesto colorido (quinoneimina) que fue leído en un espectrofotómetro SmartSpec™Plus a 500

nm. La intensidad de color es proporcional a la concentración de triglicéridos en sangre y ésta se determinó por medio de la siguiente fórmula:

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

5.2.8.3 Determinación de colesterol total

La concentración de colesterol total en sangre se evaluó mediante un kit de la marca Randox, en donde los ésteres de colesterol de las muestras se hidrolizaron por medio de la colesterol esterasa produciendo colesterol libre, el cual en presencia de oxígeno y con ayuda de la colesterol esterasa formó el colesteno-3-ona y peróxido de hidrógeno. La 4-aminoantipirina y el fenol en presencia del peróxido de hidrógeno formado, mediante la enzima peroxidasa darán lugar a un compuesto colorido (quinoneimina) que fue leído a una longitud de onda de 500 nm en un espectrofotómetro SmartSpec™ Plus. La concentración de colesterol fue proporcional a la coloración producida y se obtuvo por medio de la siguiente fórmula:

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

5.2.8.4 Determinación de HDL (lipoproteínas de alta densidad)

La concentración de colesterol HDL en sangre se cuantificó mediante un kit de la marca Randox, en donde en primera instancia se llevó a cabo una precipitación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL y VLDL) y de las fracciones de quilomicrones presentes por medio del ácido fosfotúngstico en presencia de iones de magnesio. Posteriormente, las muestras se centrifugaron y se colectó el sobrenadante en el cual se encontraba la fracción HDL. El HDL que se encuentra como ésteres de colesterol 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 formada y por acción de la enzima peroxidasa dieron lugar a un compuesto colorido (quinoneimina) que fue leída a una longitud de onda de 500 nm en un espectrofotómetro SmartSpec™Plus. La concentración de colesterol fue proporcional a la coloración producida y se obtuvo por medio de la siguiente fórmula:

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

5.2.9 Determinación de la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST)

Los hígados se pesaron (0.5 g) y se colocaron en tubos cónicos estériles a los cuales se les adiciono 2 ml de solución amortiguadora de Tris-sacarosa. Las muestras fueron homogenizadas con ayuda de un politrón y centrifugadas a 8750 g durante 20 minutos a 4° C. Posteriormente, se colectó el sobrenadante para ultracentrifugarse a 100 000 g durante 60 minutos a 4° C. Nuevamente se recuperó el sobrenadante (citosol) y se almacenó a -70° C para su posterior análisis. El extracto citosólico se diluye con solución amortiguadora de fosfatos 1M pH 6.5 (1:100, 1:80, 1:60). A cada pozo de la microplaca, se le adicionaron 50 µl de citosol ya diluido por triplicado, posteriormente se le adicionó 100 µl de solución amortiguadora de GSH y finalmente 150 µl de solución amortiguadora de cloro-dinitro-benceno (CDNB), para leerse inmediatamente en un lector de ELISA Turnable Versamax. La GST cataliza la formación de CDNB-GSH que se lleva a cabo en una cinética de reacción a una longitud de onda de 340 nm en un tiempo total de 2 minutos, con intervalos de lectura de 20 segundos, posteriormente, se cuantificó la concentración proteínas totales mediante el kit de proteínas BCA-Pierce, empleando una curva estándar de albúmina. La actividad enzimática se expresó como nanomoles por minuto por miligramo de 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 mg de proteína en el citosol, 0.0096 el coeficiente de extinción de CDNB en $\text{mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

5.2.10 Determinación de la actividad enzimática de la β -glucuronidasa

La actividad total de la enzima β -glucuronidasa se determinó empleando el conjugado β -D-glucurónido de fenolftaleína como sustrato, donde la enzima presente en la muestra lo hidroliza y la fenolftaleína se monitorea a una longitud de onda de 450 nm.

A 0.5 g de contenido distal se le adicionaron 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.2M pH 7, esta solución se homogenizó por medio de un politrón y posteriormente se sonicó durante 6 minutos a 4° C. Las muestras se centrifugaron a 500 g por 15 minutos y se colectó el sobrenadante para llevar a cabo el ensayo enzimático. Para la mezcla de reacción se tomaron 0.8 ml de PBS 0.02 M, 0.1 ml de β -D-glucurónido de fenolftaleína 1 mM y 0.1 ml del extracto fecal diluido. Esta mezcla se incubó por 1 hr a 37° C. Al término de la incubación, se adicionaron 2.5 ml de solución de glicina alcalina, 1 ml de ácido tricloroacético al 5% y 1.5 ml de agua HPLC, se mezcló y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lee a 540 nm. La relación de fenolftaleína liberada se determinó en base a una curva estándar de fenolftaleína (0-20 μg) (Jenab *et al.*, 1999). La actividad enzimática total de la β -glucuronidasa se expresó en nanomoles por minuto por gramo de contenido distal empleando la siguiente ecuación:

$$\text{nmol/min g de contenido} = \frac{\mu\text{g fenolftaleína} * 100}{(\text{PM})(\text{g muestra})}$$

Donde: μg fenolftaleína son los μg de fenolftaleína liberada, 100 es el factor de dilución, PM es el peso molecular de fenolftaleína y g muestra son los g de contenido distal colónico.

5.2.11 Evaluación de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

La evaluación de la expresión de la proteína PCNA se realizó mediante Western blot. La lesión proveniente del colon se homogenizó con 300 μ l de solución amortiguadora de extracción, manteniéndose en agitación durante 45 minutos a 4° C. Después se centrifugó a 100,000 *g* durante 60 minutos a 4° C. El sobrenadante se colectó y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (1951). Posteriormente, a las muestras se les realizó una digestión y se llevo a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida para la separación de las proteínas presentes en las muestras. Al terminar la electroforesis, se realizó una transferencia semi-seca, empleando una membrana de nitrocelulosa. Finalmente fue llevado a cabo el inmuno blot. Las membranas se incubaron con el primer anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCNA (1:1000) por tres horas para evaluar proliferación celular. El segundo anticuerpo fue cabra anti-ratón (1:1000) y se éste se incubó durante 1 hora. La membrana se incubo con una solución de quimioluminiscencia y el revelado se realizó en películas fotográficas Kodak empleando una solución reveladora y una solución fijadora (Kodak). La película con bandas se escaneó y se obtuvo el área de píxeles por banda mediante el programa ImageJ 1.39d. Para verificar la cantidad de proteína cargada en el gel se realizó un reblotting para la proteína actina con lo cual fue posible normalizar la cantidad de proteína cargado en el gel.

5.2.12 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

La cuantificación de los AGCC (acetato, propionato, butirato) se realizó mediante el método reportado por Guohua *et al* (2005). Se pesaron alrededor de 0.5 g de contenido distal y se suspendieron en 6 ml de agua, posteriormente se llevo a cabo una homogenización por 3 minutos con ayuda de un vortex y posteriormente se ajustó el pH a 2 adicionando ácido clorhídrico 5 M. EL extracto se mantuvo a temperatura ambiente por 10 minutos con agitación ocasional. La suspensión se centrifugó por 20 minutos a 5000 rpm, a 4° C, y se

colectó el sobrenadante. El estándar interno que fue utilizado constaba de una solución de ácido 2-etilbutírico, la cual se adicionó al sobrenadante obteniendo una concentración final de 2 mM. Después de esto, el sobrenadante se inyectó a un cromatógrafo de gases HP 6890 equipado con un detector de ionización de flama (FID) y un automuestreador Agilent 7683. Para el análisis se utilizó una columna capilar Carbowax 20M de 25 m X 200 μm con un grosor de la fase estacionaria de 0.20 μm . Los AGCC fueron identificados en los cromatogramas por sus tiempos de retención específicos. La concentración de cada ácido se obtuvo mediante una curva estándar para cada ácido, calculando el área bajo la curva del pico de retención y fue expresada en moles/g de contenido distal. El manejo de datos se realizó con un software ChemStation.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Taninos condensados, antocianinas y capacidad antioxidante se reportaron como la media \pm DE. Se determinó el análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.05$, seguido de una comparación de medias por el método de Tukey-Kramer.

Los resultados de consumo de alimento, ganancia de peso, concentración de glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL, AGCC, actividad enzimática de β -glucuronidasa y GST, así como la proliferación celular fueron expresados como la media \pm DE o EEM. Para determinar las diferencias estadísticas de los parámetros evaluados se realizó un ANOVA ($p < 0.05$), seguido de una comparación de medias por el método de Dunnet.

Los resultados de incidencia se reportaron mediante tablas de contingencia utilizando la prueba de χ^2 con un nivel de confianza del 95%. Para la multiplicidad y el número promedio de tumores los resultados se expresaron como la media \pm DE. Se realizó un ANOVA con un 95% nivel de confianza. La diferencia entre los tratamientos se realizó mediante la comparación de medias por el método de Dunnet.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Análisis bromatológico de las harinas de frijol

Se realizó un análisis bromatológico a las harinas de frijol cocido tanto para la variedad PZ como para la variedad N, para así determinar la concentración de nutrientes presentes en cada una de las dietas. Dichas variedades mejoradas fueron cultivadas en el año 2005 en el estado de Guanajuato por el INIFAP. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 7; observándose que existen variaciones en cuanto al contenido nutrimental dependiendo de la variedad, ya que en el caso de PZ se obtuvo una mayor cantidad de proteínas (25.25%). Por el contrario, el N presentó mayor cantidad de carbohidratos (59.26%), fibra (6.41%) y grasa (2.59%).

Cuadro 7. Análisis bromatológico de las harinas de frijol

Parámetro	Pinto Zapata	Negro 8025
Proteína	25.1%	19.4%
Carbohidratos	56.5%	59.2%
Fibra	3.4%	6.4%
Grasa	1.4%	2.5%
Minerales	5.1%	4.4%

Los parámetros fueron evaluados en 100 g de harina de frijol cocido. PZ, Pinto Zapata; N, Negro 8025. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes.

Diversos autores han reportado la composición química del frijol común y coinciden que ésta puede presentar variaciones dependiendo del tipo de variedad, tal es el caso de las proteínas en donde se han reportado intervalos que van de 16 a 33% (Reyes-Moreno y Paredes-López, 1993), así como de carbohidratos en donde existen rangos desde 52.4% (Brezan y Blanco, 1991) hasta 63.5% (Matthews, 1989). También se ha reportado un contenido de grasa de 2.4 a 2.6% y de fibra de 5.3 a 6.7% (Queiroz-Moncini *et al.*, 2005),

observando que las cantidades obtenidas de los nutrientes presentes en PZ y N se encuentran dentro de los intervalos anteriormente mencionados.

7.2 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las harinas de frijol

La cuantificación de taninos condensados y antocianinas, así como la determinación de la capacidad antioxidante de las harinas de frijol, se realizó debido a que se ha demostrado que los compuestos fenólicos pudieran estar asociados con la disminución en el riesgo de padecer enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, en base a su actividad antimutagénica, antiproliferativa, pueden inducir apoptosis, atrapamiento de radicales libres, modulación enzimática, entre otros (Volate *et al.*, 2005).

Las concentraciones de taninos condensados y de antocianinas presentes en las variedades de frijol se determinaron obteniendo que el frijol N presento 4 y 11 veces más concentración de compuestos fenólicos y antocianinas, respectivamente, con respecto al frijol PZ (Cuadro 8).

Cuadro 8. Taninos condensados, antocianinas y capacidad antioxidante de las harinas de frijol cocido

Variedad	Taninos condensados ¹	Antocianinas ²	Capacidad antioxidante ³
PZ	2.9 ± 0.03 ^a	14.02 ± 0.44 ^a	257.1 ± 5.89 ^a
N	12.1 ± 0.05 ^b	160.53 ± 0.28 ^b	357.4 ± 17.34 ^b

Los valores representan la media ± DE. a y b indican diferencia estadística significativa entre las variedades (p < 0.05).

¹ Taninos condensados expresados en mg eq. (+)catequina/g de harina

² Antocianinas expresadas en mg eq. cianidina 3-glucósido /Kg de harina

³ Capacidad antioxidante expresada en µM eq Trolox/g de harina

Estudios previos realizados en diversas variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) han reportado que la concentración de antocianinas y taninos condensados en variedades de frijol negro, gris moteado, cafeto,

amarillo pálido, mestizo y crema moteado varía en un intervalo de 10-1850 mg eq. cianidina 3-glucósido/kg de harina y 10.0-35.7 mg eq (+)catequina/g de harina, respectivamente (Espinoza-Alonso *et al.*, 2006).

El contenido de antocianinas y taninos condensados es bajo en las variedades evaluadas (PZ y N), principalmente en el caso de taninos condensados. Es importante resaltar que las concentraciones reportadas por otros autores fueron evaluadas en frijol crudo. Sin embargo, en este caso el frijol se sometió a un tratamiento térmico antes del secado y la molienda. Aparico-Fernández *et al* (2005) evaluó el contenido de taninos condensados en la variedad Negro Jamapa con y sin tratamiento térmico observando una disminución de hasta un 10% en dichos parámetros al llevar a cabo la cocción del frijol, ya que muchos de los compuestos fenólicos presentes puede degradarse al recibir este tratamiento, explicando así la menor concentración de estos compuestos en las harinas de frijol obtenidas en este experimento comparadas con las reportadas por otros autores.

El ensayo CAET (capacidad antioxidante en equivalentes de trolox) es método *in vitro* que permite evaluar la capacidad que presenta un alimento o un compuesto para donar electrones al radical ABTS formado en la reacción y así dar lugar a una molécula más estable, evitando que se lleve a cabo la oxidación.

En cuanto a la capacidad antioxidante de las harinas de frijol se observó para PZ en un intervalo de 257.1 ± 5.9 μM eq. Trolox/g de harina y para N un valor de 357.4 ± 17.3 μM eq. Trolox/g de harina, por lo tanto, el frijol N mostró 28% mayor capacidad antioxidante que el PZ (Cuadro 8).

La capacidad antioxidante está dada principalmente por la naturaleza de los compuestos fenólicos presentes en el alimento (Agostini *et al.*, 2004). El frijol N mostró mayor contenido de antocianinas y de taninos condensados que el frijol PZ, esto pudiera estar relacionado con su mayor efecto antioxidante. Además, estudios previos determinaron el contenido de ácidos fenólicos presentes en un extracto metanólico de las variedades PZ y N sometidas a un

tratamiento térmico, encontrándose una mayor concentración de estos compuestos en el frijol N; entre dichos ácidos se puede citar al gálico, protocatecoico, catequina, vanílico, siringico, cumárico, salicílico, entre otros (Ríos *et al.*, 2007).

7.3 Primera etapa

En el Cuadro 9 se muestra el contenido de nutrimentos de todas las dietas evaluadas y se observa que las dietas adicionadas con frijol PZ incrementa el porcentaje de proteína a partir de una concentración del 12.5% (19-21%) y para N al 50% (19%) con respecto a la concentración de la dieta basal (18%). De manera inversa se observó un incremento de carbohidratos en el frijol N a partir de una concentración del 12.5% (55-56%) y para PZ a partir del 25% (55%) comparado con la dieta control (54%). La cantidad de fibra disminuyó para el grupo PZ 50% (4%), por el contrario se incremento para el grupo N 50% (6%), comparado con la dieta basal (5%). El porcentaje de grasa proporcionado por las dietas disminuyó en el caso de PZ a una concentración de 25% (3%) y en N hasta el 50% (3%). Finalmente, la concentración de minerales se incrementó para ambas variedades a una concentración del 12.5% (4%) con respecto a la dieta control (3.5%).

Aún existiendo variaciones en el porcentaje de algunos de los parámetros en las dietas, éstas se mantienen con un contenido energético similar, ya que al incrementar la cantidad de proteínas en la variedad PZ en estos los grupos se ve disminuido el porcentaje de grasa equilibrando el contenido energético, por lo que no se esperaría un efecto en los animales en tratamiento. En el Cuadro 9 se muestran los porcentajes de los nutrimentos presentes en las diferentes dietas por cada variedad.

Cuadro 9. Contenido de nutrimentos en la dieta control y en las dietas con harina de frijol cocido PZ y N a diferentes concentraciones.

	Proteína	Carbohidratos	Fibra	Grasa	Minerales
Control	18	54	5	4	3.5
PZ 0.5%	18	54	5	4	3.5
PZ 3%	18	54	5	4	3.5
PZ 12.5%	19	54	5	4	4
PZ 25%	20	55	5	3	4
PZ 50%	21	55	4	3	4
N 0.5%	18	54	5	4	3.5
N 3%	18	54	5	4	3.5
N 12.5%	18	55	5	4	4
N 25%	18	55	5	4	4
N 50%	19	56	6	3	4

Los valores representan el porcentaje (%) de nutrimentos presentes en la dieta base y en las dietas elaboradas con diferentes concentraciones de dos variedades de frijol cocido.

7.3.1 Consumo de alimento de ratas alimentadas con harina de frijol

Semanalmente se registró el consumo de alimento del grupo control, así como de los grupos que fueron alimentados con harina de frijol cocido. El consumo de alimento de la primera semana oscilaba entre 11.7 y 17.6 g, conforme fueron transcurriendo las semanas, se observó un incremento obteniendo un mayor consumo a la quinta semana por parte del grupo PZ 50% con 36.6 g, seguido del PZ 25% con 33.6 g; los demás grupos se mantuvieron en un intervalo de 22.7-38.7 g (Figura 10).

Estos datos sugieren que los animales no mostraron saciedad con las dietas consumidas, aún cuando se ha reportado que el frijol por su alto contenido de fibra produce este efecto. Sin embargo, la recomendación diaria del consumo de estos carbohidratos es alrededor de 35-40 g para una persona adulta, lo que equivale a un 3.5-4% de fibra en la dieta total diaria. En este caso,

los animales a la cuarta semana consumieron alrededor de 30 g de alimento y para la dieta más alta de frijol (50%) en el caso de N, que es la leguminosa con más contenido de fibra, sólo se aportó el 1.8% de fibra en la dieta total diaria.

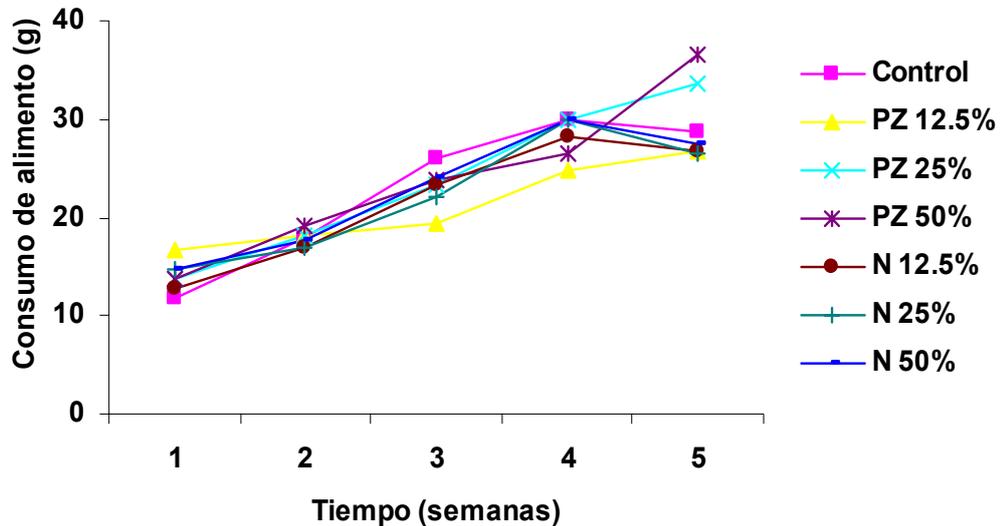


Figura 10. Consumo de alimento de ratas tratadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones. Cada punto representa la media del consumo de alimento por rata en cada una de las dietas evaluadas.

7.3.2 Ganancia de peso de ratas alimentadas con harina de frijol

La ganancia de peso también se registró cada semana (Figura 11), el peso inicial se encontraba en un intervalo de 60.3 ± 5.3 , al terminar el experimento (5 semanas) se observó un incremento en la ganancia de peso en los grupos PZ 12.5% (149.2 ± 7.7 g), PZ 50% (138.9 ± 8.5 g), N 12.5% (150.9 ± 2.1 g), N 25% (143.9 ± 5.0 g) y N 50% (151.6 ± 2.0 g), cabe mencionar que los grupos control (114.1 ± 3.7 g) y PZ 25% (109.2 ± 7.7 g) fueron los que obtuvieron una menor ganancia de peso, aún cuando los animales tratados con PZ 25% consumieron ligeramente mayor cantidad de alimento.

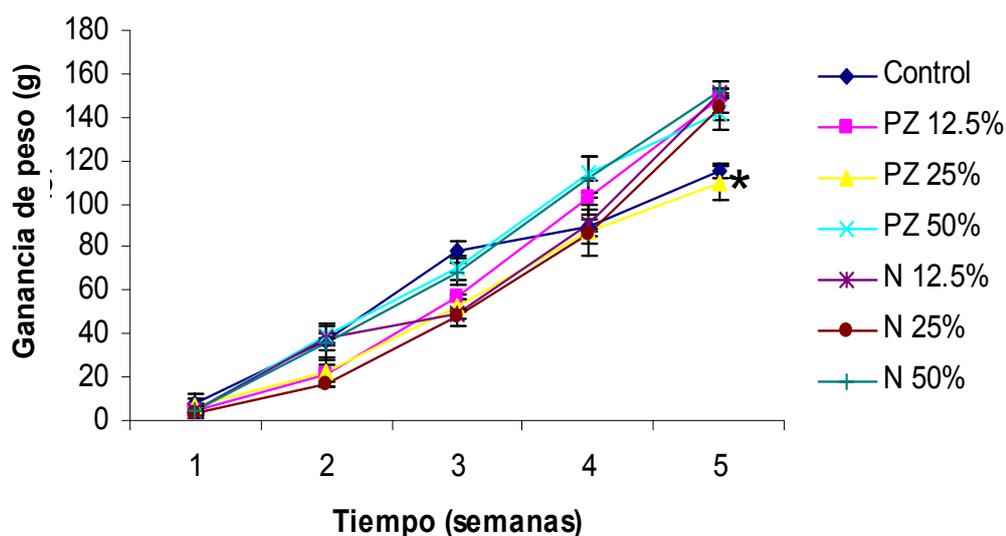


Figura 11. Ganancia de peso de ratas tratadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones. Cada punto representa la media \pm DE de la ganancia de peso por rata. * indica diferencia estadística significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

Cavallé de Moya *et al* (2003) administraron a animales sanos una dieta que contenía *Phaseolus vulgaris* L. var. *Arthropurpurea* (PhAr) a una concentración de 2.5% y observaron que la ganancia de peso de estos animales con respecto a su grupo control fue menor, atribuyéndoselo a una ingesta reducida o bien a que la proteína de cada especie de frijol presenta una deficiencia de aminoácidos esenciales.

Por el contrario, en este experimento se obtuvo una ingesta adecuada de alimento por parte de los animales a pesar de tener concentraciones altas de frijol. Aunado a esto, la ganancia de peso en la quinta semana también fue mayor en los grupos de frijol, a excepción de PZ 25%. Esto pudiera deberse a que los frijoles PZ y N pueden contener aminoácidos de fácil asimilación o de mayor absorción y fijación de nitrógeno, lo cual pueda contribuir a una mayor masa muscular.

7.3.3 Concentración de glucosa, colesterol y HDL en sangre de ratas tratadas con harina frijol

Las concentraciones de glucosa, colesterol y HDL, así como el índice de Castelli, fueron evaluados debido a la relación positiva de estos parámetros con el riesgo de padecer cáncer de colon. En el Cuadro 10 se muestran los valores de los parámetros evaluados en ratas alimentadas con harina de frijol cocido durante 5 semanas.

Cuadro 10. Concentración de glucosa, colesterol, HDL e índice de Castelli en sangre de ratas tratadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones.

Tratamiento	Glucosa	Colesterol	HDL	Índice de Castelli
Control	95.12 ± 1.48	103.40 ± 4.58	75.05 ± 2.16	1.38 ± 0.09
PZ 12.5%	104.48 ± 0.43 *	90.07 ± 1.77 *	34.28 ± 0.47 *	2.62 ± 0.08 *
PZ 25%	100.55 ± 0.08 *	72.73 ± 2.31 *	38.94 ± 2.47 *	1.87 ± 0.06 *
PZ 50%	83.51 ± 2.00 *	53.17 ± 1.83 *	34.26 ± 1.09 *	1.55 ± 0.06
N 12.5%	117.55 ± 2.65 *	94.99 ± 2.17 *	66.86 ± 0.88 *	1.42 ± 0.04
N 25%	100.67 ± 0.43 *	83.52 ± 1.23 *	64.11 ± 2.76 *	1.30 ± 0.07
N 50%	83.10 ± 1.87 *	56.77 ± 1.68 *	36.28 ± 2.28 *	1.56 ± 0.13

Los valores están expresados en mg/dL para la concentración de glucosa, colesterol y HDL. Los valores representan la media ± DE. * indica diferencia estadística significativa comparado con el grupo control (p < 0.05).

En cuanto a la concentración de glucosa sérica es importante mencionar que el consumo de concentraciones elevadas de frijol si disminuye este parámetro ya que se observó una disminución a las concentraciones de 50% tanto para PZ (83.5 ± 2.0 mg/dL) como para N (83.1 ± 1.8 mg/dL) con respecto al control (95.1 ± 1.4) siendo estadísticamente significativo (Cuadro 10). En cuanto a las concentraciones del 12.5 y 25% para ambas variedades se observó un incremento con respecto al control. En el caso de la variedad PZ de 10 y 6%, respectivamente, y en la variedad N de 24 y 6%, respectivamente.

Los carbohidratos son la parte mayoritaria del frijol y se encuentran estrechamente relacionados con el cambio en los niveles de glucosa sérica. Los carbohidratos glicémicos son los que son digeridos y absorbidos por el intestino delgado, por lo que estos modifican los niveles de glucosa en sangre en el organismo. En el caso del frijol se ha reportado un bajo índice glicémico debido a que solo el 37.3% del total del almidón disponible puede repercutir directamente en la respuesta glucémica. Además, de que la mitad de este valor corresponde a carbohidratos de digestión lenta, por lo que son absorbidos más lentamente (Foster-Powel *et al.*, 2002).

Por otra parte se sabe que los mecanismos que determinan este comportamiento están relacionados directamente con la naturaleza del propio almidón. Además, también puede ser atribuido un bajo índice glicémico a la presencia de fitohemaglutininas como las lectinas presentes en el frijol, así como a la presencia de algunos compuestos fenólicos que pueden tener actividad sobre la enzima α -amilasa, dificultando la digestión de los carbohidratos glicémicos e incrementando el porcentaje de carbohidratos resistentes a la digestión. Sin dejar a un lado que el gran aporte de fibra por parte produce una mayor saciedad debido a un mayor volumen en los alimentos, lo que conlleva a una mayor sensación de plenitud intestinal, además de elevados niveles de colecistocina, absorción y arrastre grasas, lo cual se ha relacionado con disminución en los niveles de glucosa y colesterol (Serrano y Goñi, 2004).

Debido a lo anterior es posible que la disminución de glucosa en sangre por parte de las variedades de frijol evaluadas (PZ y N) se deba a que en su composición química se presente un almidón con estructura y composición diferente (relación amilasa/amilopectina) que le permita ser de absorción lenta, otra explicación pudiera ser que se deba a la presencia de algunos compuestos fenólicos como los taninos que pudieran estar inhibiendo enzimas digestivas como la tripsina y/o la α -amilasa.

Al realizar la evaluación de colesterol total en sangre se observó un comportamiento dosis-respuesta, ya que al incrementar la concentración de frijol

en la dieta, los niveles de colesterol disminuyeron de manera significativa con respecto al control tanto para PZ (13, 30 y 49%, respectivamente) como para N (8, 19 y 45%, respectivamente) (Cuadro 10).

Lo anterior pudiera estar relacionado con la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) ya que los carbohidratos indigestibles tales como la fibra soluble e insoluble, almidón resistente y los oligosacáridos, 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 colesterologénesis, inhibiendo la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA) (Serrano y Goñi, 2004).

Otro de los parámetros evaluados fueron las lipoproteínas de alta densidad (HDL) también denominado colesterol-HDL, el cual se encargan de transportar el colesterol de los tejidos al hígado para su excreción, por esta razón, es importante que se encuentren elevadas. En los resultados obtenidos al evaluar las HDL observamos que éstas disminuyeron en los grupos de frijol para ambas variedades desde un 15% hasta un 54% con respecto al control (Cuadro 10).

Estudios epidemiológicos muestran que concentraciones superiores a 60 mg/dL de HDL confieren protección al organismo contra enfermedades. La disminución de HDL pudiera estar directamente influenciada por el decremento del colesterol total. La relación colesterol total/HDL, conocido como índice de Castelli o índice aterogénico, muestra si los niveles de HDL son suficientes para llevar a cabo el transporte adecuado de colesterol total en el organismo para su excreción. Este índice es muy útil cuando la concentración de HDL es la adecuada, pero el colesterol total es muy elevado, se ha reportado que índices de Castelli mayores a 3.4 representan un riesgo elevado de padecer enfermedades (Quezada, 2003).

El índice de Castelli obtenido para los grupos evaluados fue mayor significativamente solo para la variedad PZ a las concentraciones de 12.5 (90%) y 25% (35%), con respecto al control (Cuadro 10). Cabe mencionar que ninguno de los grupos incluyendo al control, obtuvo un índice mayor de 3.4, lo cual refleja que los animales en tratamiento presentaban concentraciones adecuadas de HDL.

7.3.6 Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el contenido distal colónico de ratas alimentadas con harina de frijol

La cuantificación de AGCC se realizó en el contenido distal del colon de los animales alimentados con frijol, así como del control, mediante cromatografía de gases (Cuadro 11).

Los AGCC pueden actuar de manera indirecta mediante la modificación del pH colónico inhibiendo la colonización de bacterias patógenas como *E. coli*. Además, es importante destacar que el mantener bajo el pH colónico promueve el desarrollo de especies de bacterias benéficas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Marti del Moral, 2003). Por lo que se evaluó el pH del contenido distal, observando que este disminuye conforme se incrementa la concentración de frijol en ambas variedades siendo significativa esta disminución a una concentración del 50%, lo cual correlaciona con el incremento en la producción de AGCC principalmente para esta concentración tanto en PZ como en N. Presser *et al* (1997), demostraron que el crecimiento de *E. coli* disminuía conforme se aminoraba el pH en el medio de cultivo por medio de la incorporación de ácidos orgánicos, lo cual sugiere que en el contenido colónico pudiera encontrarse una menor concentración de ésta bacteria, destacando que es una de las bacterias con mayor producción de la enzima β -glucuronidasa, enzima encargada de reactivar carcinógenos en el colon.

Cuadro 11. Concentración de ácidos grasos de cadena corta en contenido distal colónico de ratas tratadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones.

Tratamiento	pH	Acético (mmol/g)	Propiónico (mmol/g)	Butírico (mmol/g)
Control	6.47 ± 0.10	14.91 ± 1.14	3.71 ± 0.18	1.22 ± 0.12
PZ 12.5%	6.55 ± 0.29	25.94 ± 2.40 *	13.17 ± 1.35 *	1.13 ± 0.12
PZ 25%	6.00 ± 0.18	27.63 ± 2.90 *	15.36 ± 0.36 *	2.07 ± 0.20 *
PZ 50%	5.38 ± 0.18 *	26.44 ± 0.89 *	15.74 ± 0.23 *	1.22 ± 0.03
N 12.5%	6.15 ± 0.09	19.13 ± 2.30	11.18 ± 1.23 *	1.99 ± 0.16 *
N 25%	5.91 ± 0.04	17.52 ± 0.39	9.94 ± 0.72 *	1.68 ± 0.09 *
N 50%	5.75 ± 0.50 *	31.47 ± 2.50 *	24.90 ± 0.28 *	1.64 ± 0.14 *

Los valores representan la media ± DE. * indica diferencia estadística significativa comparado con el grupo control (p< 0.05).

La producción de ácido acético cuando las ratas consumieron frijol PZ y N en todas las proporciones fue mayor (p<0.05) que el control. Para PZ oscilando en un intervalo de 25.94 ± 2.40 y 27.63 ± 2.90 mmol/g. Sin embargo, cuando las ratas consumieron una dieta que contenía 50% de frijol N se observó el mayor incremento significativo (31.47 ± 2.50 mmol/g) con respecto al control. Aún cuando el contenido de fibra del frijol N fue ligeramente mayor que el PZ, este parámetro no es suficiente para predecir el comportamiento de estas leguminosa para la producción de ácido acético, ya que la cantidad de almidón resistente, oligosacáridos y fibra, así como su composición, es un factor determinante en la fermentación llevada a cabo por las bacterias colónicas y como resultado en la concentración de dichos ácidos.

El ácido propiónico presentó un incremento para todos los grupos de frijol de ambas variedades, principalmente para el N 50% (24.90 ± 0.28 mmol/g) con un incremento de alrededor de 7 veces mayor que el control (3.71 ± 0.18 mmol/g). Este incremento se relaciona con la disminución de colesterol sérico, corroborando que uno de los posibles mecanismos de este compuesto es la inhibición de la colesterogénesis.

En cuanto al ácido butírico también se ha sugerido que presenta actividad biológica sobre todo relacionada con cáncer de colon, ya que puede promover apoptosis, diferenciación y arresto del ciclo celular (Hangen y Bennink, 2002). Se observó un incremento significativo con respecto al control en la variedad PZ a una concentración del 25% (70%), para la variedad N se observó un incremento significativo en todas las concentraciones evaluadas desde 34 a 63%.

7.3.4 Actividad enzimática de β -glucuronidasa en el contenido distal colónico de ratas tratadas con harina de frijol

En el contenido distal de colon de ratas alimentadas con frijol también fue evaluada la actividad de la enzima β -glucuronidasa. Esta enzima es relevante en el proceso de carcinogénesis de colon, ya que se encarga de hidrolizar los conjugados glucuronidados transportados por vía enterohepática, reactivando así los mutágenos inactivados o carcinógenos. Cabe mencionar que una cantidad considerable de esta enzima es secretada por la microflora colónica y que la población de la microflora intestinal es un ecosistema muy complejo que muchas de las veces depende del tipo de dieta que se consuma (Arimochi *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos de la actividad enzimática mostraron que concentraciones del 25% de frijol disminuyeron de manera significativa la actividad enzimática (Figura 12). Para ambas variedades se observó una disminución de 40-50% en las dietas de frijol con más del 25% y 50% con respecto al control (18.5 ± 1.4) (Figura 12).

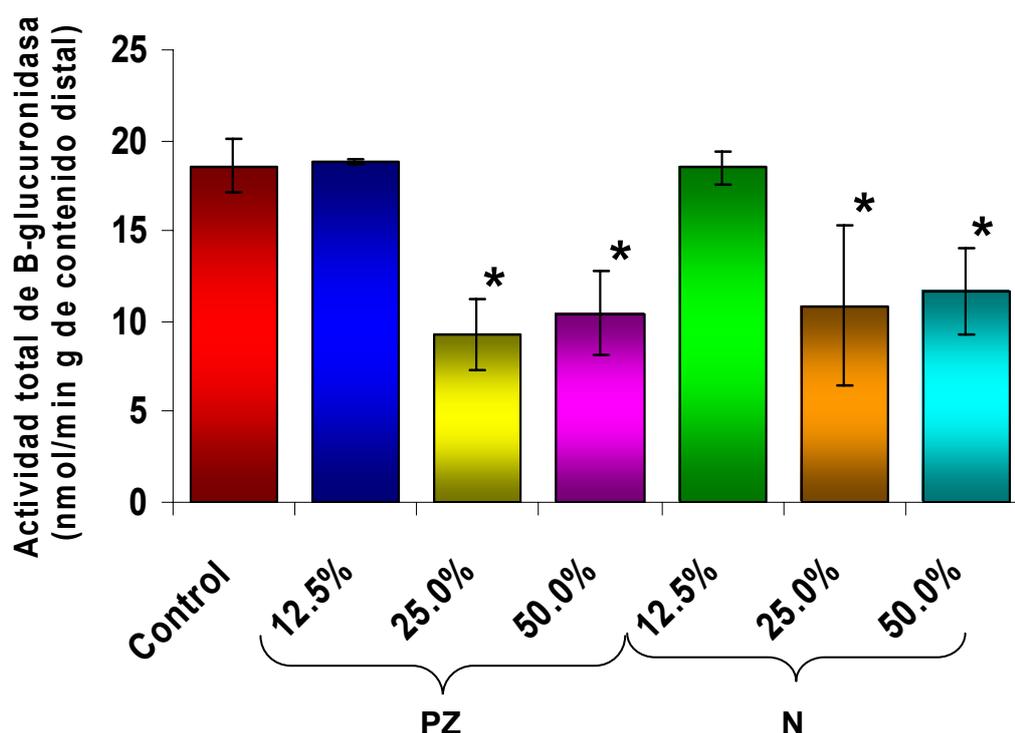


Figura 12. Actividad enzimática de β -glucuronidasa en el contenido distal de ratas tratadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones. * Indica diferencia estadística significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

Diversos estudios han sugerido que dietas suplementadas con diversos tipos de fibras pueden actuar directa y/o indirectamente en la inhibición de cáncer. Los efectos benéficos de la fibra en la supresión de cáncer en el tracto gastrointestinal se han atribuido a la ingesta de carbohidratos complejos (dietas altas en fibra), los cuales pueden presentar diversos mecanismos entre los que se encuentran el incremento en la selectividad de bacterias no patógenas y la fermentación de sus productos (Rao *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que la composición de la dieta influye sobre el crecimiento bacteriano; por ejemplo, se sabe que *E. coli* es la bacteria que presenta mayor actividad enzimática de β -glucuronidasa, mientras que especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las de menor actividad.

Teniendo conocimiento de lo anterior es posible que la fibra proporcionada por las dietas que contenían frijol, aún cuando es similar en concentración a la fibra consumida por los animales control, la composición de estos carbohidratos podría influir en su acción. La presencia de otros compuestos como almidón resistente generado durante el tratamiento térmico y el enfriado de las harinas de frijol, así como los oligosacáridos podrían mejorar el crecimiento de ciertas bacterias benéficas, y por tanto presentar menor actividad de la β -glucuronidasa.

7.3.5 Actividad enzimática de glutatión S-transferasa en hígado de ratas alimentadas con harina de frijol

En esta primera etapa también se evaluó la capacidad del frijol (PZ y N) para inducir a la enzima GST en hígado de ratas. La mayoría de los tratamientos no mostraron ningún incremento en la actividad de GST, sólo se presentó un aumento del 49% con respecto al control para PZ 50% (Figura 13).

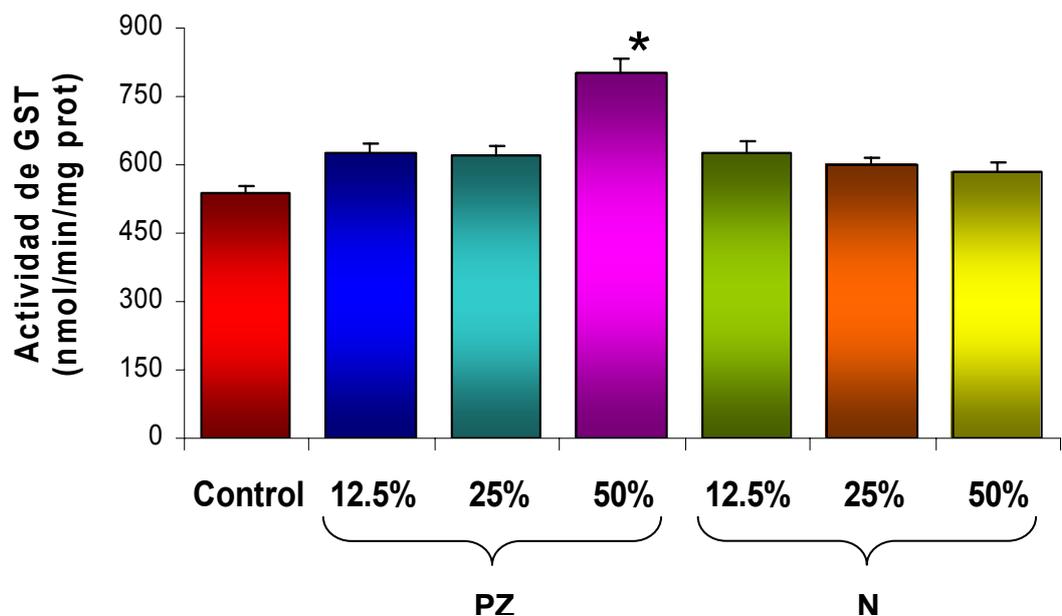


Figura 13. Actividad enzimática de glutatión S-transferasa (GST) en hígado de ratas tratadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones. * Indica diferencia estadística significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

Se ha sugerido que las enzimas de fase II o detoxificadoras pueden ser inducidas por antioxidantes (Seidegard y Ekström, 1997). Se tienen reportes que los polifenoles, curcumina, ácido cafeíco, entre otros, son inductores de enzimas de fase II. Por lo tanto, los niveles de inducción pueden atribuirse a la concentración de ciertos compuestos fenólicos presentes en la variedad PZ. Se ha reportado que ésta variedad contiene 41.3 mg/100 g de ácido cafeíco comparado con N que presenta sólo 19.06 mg/100 g. Con respecto a los esteres de estos ácidos fenólicos activan las cascadas de señalización de las proteínas involucradas en la activación del complejo Nrf2/Keap1 y su unión a elementos de respuesta a antioxidantes o electrófilos (ARE/EpRE) que codifican para enzimas de fase II, Así mismo la inducción a nivel transcripcional de GST depende principalmente del factor de transcripción Nrf2 y de los diversos factores moleculares presentes en cada órgano (Surh, 2003).

Por otra parte estudios realizados por Ebert *et al.* (2001) demuestran que células de colon humano incrementan la actividad de GST por efecto del tratamiento con butirato y este efecto es dependiente de la concentración. En los grupos que se trataron con harina de frijol, como ya se mencionó, no se observó una diferencia significativa con respecto al control en la concentración de butirato, por lo tanto, este compuesto no pudo influir sobre la actividad de GST en los animales tratados con PZ al 50%.

7.4 Segunda etapa

7.4.1 Evaluación macroscópica del colon de ratas tratadas con DMH y harina de frijol

En cuanto a la visualización macroscópica de lesiones, el colon se dividió en dos zonas en base a su morfología, proximal y distal, y las lesiones producidas por la DMH se observaron en ambas zonas. Las lesiones se clasificaron utilizando la descripción macroscópica propuesta por Piñols (1998) (Figura 14 y 15).

En la zona proximal se observaron tumores sésiles (no presentan un tallo de unión con la mucosa) que se caracterizan por una masa que protruye sobre la superficie mucosal con un diámetro máximo mayor que el de su unión con la mucosa y muy cercanos a la misma (Figura 14A). Los tumores endofíticos se presentan en forma de meseta o ulcerativos con tendencia ligera o nula a abultar hacia la luz y a menudo son tumores constrictivos, también se han denominado fungoides (Figura 14B, C y D).

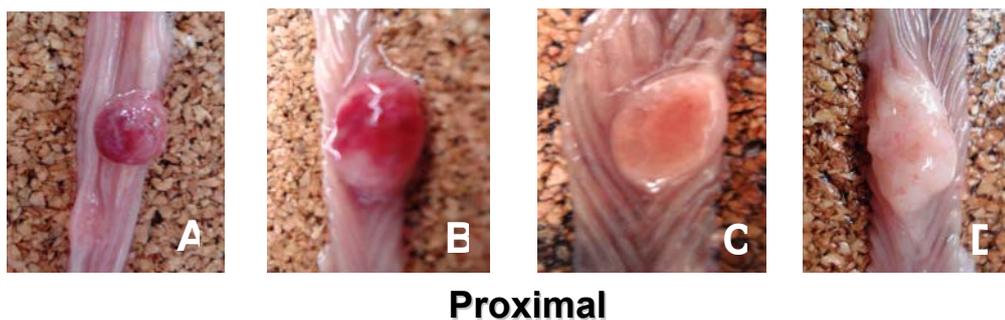


Figura 14. Lesiones encontradas en la zona proximal del colon de ratas inducidas químicamente con DMH. A tumor sésil; B, C y D tumores endofíticos.

En la zona distal se observaron tumores exofíticos, usualmente polipoides que protruyen hacia la luz; presentan un margen elevado con cavitación central y una masa subyacente lobulada que, generalmente distiende la serosa

subyacente (Figura 15A y C). Se presentaron tumores endofíticos, similares a los de la zona proximal (Figura 15B). También se observaron tumores pedunculados, los cuales se caracterizan por ser pólipos con tallo claramente visible (Figura 15E). Además, se visualizaron lesiones con superficie relativamente plana, ligeramente por encima del nivel de la mucosa, denominadas placas (Figura 15D).

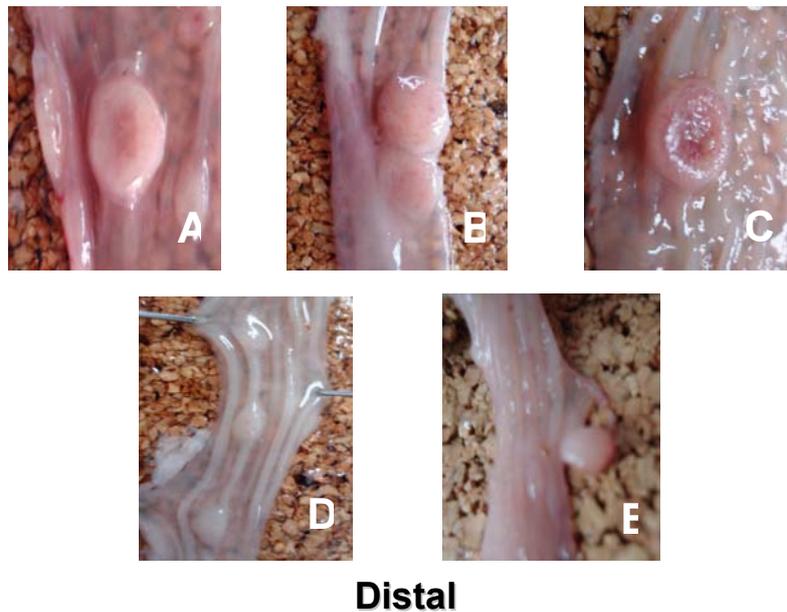


Figura 15. Lesiones encontradas en la zona distal del colon de ratas inducidas químicamente con DMH. A y C tumores exofíticos; B tumor endofítico; D placas y E tumor pedunculado.

7.4.7 Evaluación microscópica del colon de ratas tratadas con DMH y alimentadas con harina de frijol

En la Figura 16A se muestra la histología de un colon normal, perteneciente a una rata control en donde se aprecia la mucosa, submucosa, muscularis y serosa, así como las criptas que van desde la mucosa hasta la muscularis, además del acomodo de las criptas de Lieberkühn que van desde la mucosa hasta la muscularis. Además, se puede observar el acomodo de las

criptas, las cuales se agrupan de cinco a seis separadas por surcos profundos (Figura 16B).

El estudio microscópico consistió en evaluar la presencia de displasia y de adenocarcinomas; sin embargo, cabe mencionar que no se observaron adenomas en los tejidos evaluados para ningún grupo. La clasificación en cuanto al grado de displasia (I, II y III), así como de los adenocarcinomas (poco, moderadamente y bien diferenciado), se llevo a cabo en base al criterio del patólogo (Dr. Gallegos Corona) basándose en la escala establecida por Riddell *et al.* (1983) aunado a su experiencia.



Figura 16. Histología de colon de rata control, teñido con hematoxilina-eosina. A) corte histológico transversal donde se aprecia a un objetivo de 40x la mucosa (M), submucosa (SM), muscularis (MC) y serosa (S), así como las criptas que van desde la mucosa hasta la muscularis. B) corte histológico longitudinal donde se observa a un objetivo de 100x el acomodo de las criptas en el colon.

La morfología celular propia del colon sufre diversos cambios conforme se van presentando las atípicas (cambios celulares) propias del cáncer de colon (Figura 17). En un tejido normal, la lámina propia es laxa; las células presentes en la cripta son uniformes con núcleos orientados a la base de la cripta que llevan a cabo la producción de mucina; existe células de infiltración o inflamación como los eosinófilos, neutrófilos, macrófagos y monocitos (A). La morfología de células displásicas se caracteriza por células con núcleos estratificados y grandes en relación núcleo-citoplasma, alta actividad mitótica,

pérdida de diferenciación, alteraciones en tamaño y orientación celular (**B**). En el caso de adenocarcinomas, los cánceres gástricos, particularmente el de colon, se caracterizan por presentar células en forma de *anillo de sello*. Estas células son globosas ya que producen grandes cantidades de moco, el cual se encuentra en su interior, presentan núcleos pequeños orientados a la periferia de la célula, lo cual les da la apariencia de anillo (**C**).

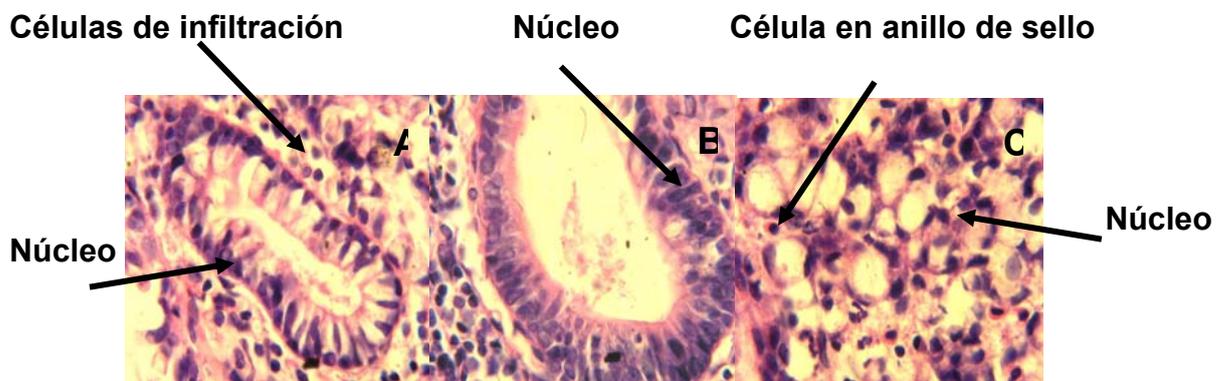


Figura 17. Morfología de células de colon de ratas sanas y ratas tratadas con el carcinógeno DMH. A) cripta de colon normal; B) cripta displásica; C) células en anillo de sello.

Se denomina displasia (del latín ‘mala forma’, malformación) a una alteración del desarrollo de las células epiteliales y mesenquimatosas, que han experimentado proliferación y alteraciones citológicas atípicas que afectan a la orientación celular dentro de un epitelio, al tamaño, forma y organización de las células. Esto puede ser el indicativo de un paso temprano hacia la transformación en una neoplasia, es por lo tanto un cambio pre-neoplásico o precanceroso; también es llamada hiperplasia atípica.

En la Figura 18 se muestra los cambios histológicos representativos de los diferentes grados de displasia (I, II y III) que fueron visualizados en cortes de colon de ratas inducidas químicamente con DMH y alimentadas con dos variedades de frijol, cabe señalar que para la observación de displasia es más conveniente utilizar cortes longitudinales del colon.

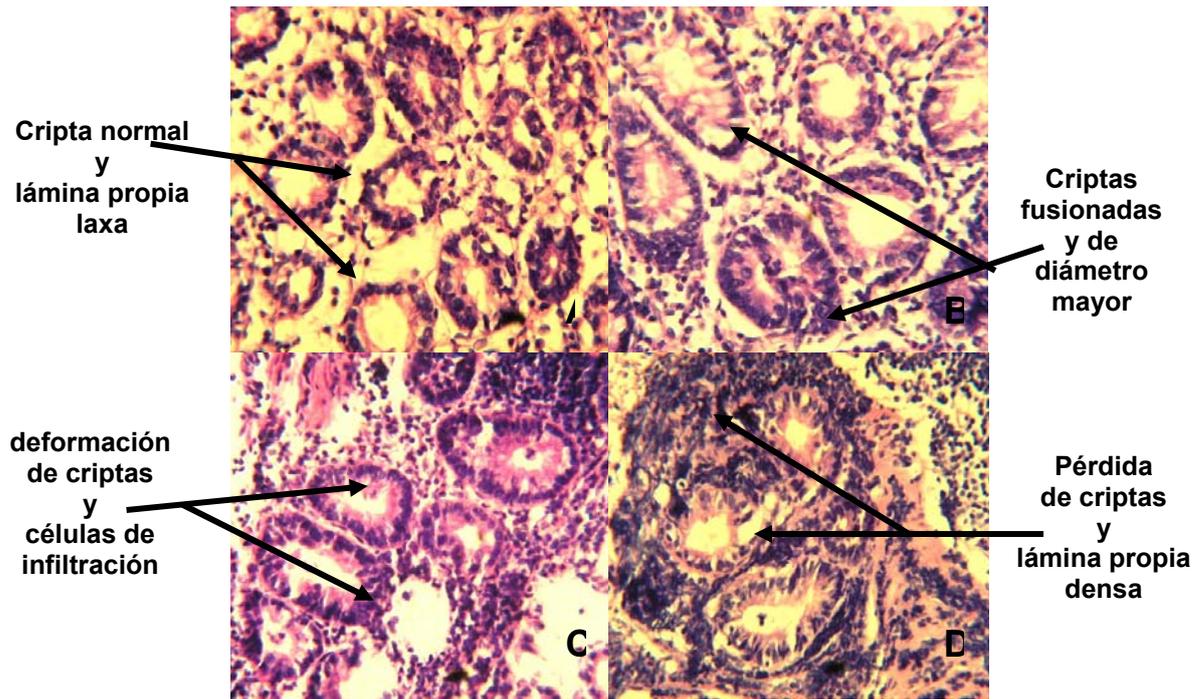


Figura 18. Histología de los tipos de displasia observados en colon de ratas tratadas con el carcinógeno DMH. A) colon normal; B) displasia grado I; C) displasia grado II; D) displasia grado III. Objetivo 100x.

En la micrografía **A** se muestra el corte de un colon normal en donde se observan las criptas con un diámetro uniforme y agrupadas entre cinco a seis criptas conservando una distancia entre cripta y cripta; los núcleos se encuentran rodeando la línea basal de la cripta, además la lámina propia es laxa con pocas células de infiltración (neutrófilos, macrófagos, entre otros). La micrografía **B** se refiere a una displasia grado I en donde se presentó un incremento en el diámetro de algunas criptas o fusión de éstas; también se observan núcleos estratificados orientados hacia el lumen; la lámina propia era poco más densa debido a la presencia de células de infiltración, como consecuencia de la inflamación. La displasia grado II se muestra en la micrografía **C**, en donde las criptas presentan diámetros mayores e incluso deformación, con núcleos estratificados orientados hacia el lumen; además, la lámina propia incrementó su densidad a causa de una cantidad mayor de células de infiltración. Finalmente, la displasia grado III se caracteriza por una lámina propia muy densa, pérdida y/o fusión de criptas dando lugar a cripta con

un diámetro considerablemente grande (micrografía **D**). Todos estos cambios se deben al daño genético causado por la exposición al carcinógeno DMH, lo que trae como consecuencia una alteración en la orientación celular dentro del epitelio, al tamaño, forma y organización de las células.

La palabra adenocarcinoma proviene del prefijo “adeno” que significa glándula; por lo que un adenocarcinoma es un tumor canceroso que aparece en células glandulares de revestimiento en algunos tejidos, tal es el caso del colon. Los adenocarcinomas se clasifican según su grado de diferenciación. **Adenocarcinoma bien diferenciado** es aquel que presenta estructuras organoides bien diferenciadas de tipo acínico o tubular y una atípia celular moderada y mitosis en el epitelio, y con núcleos basales y de tamaño regular. El **adenocarcinoma moderadamente diferenciado** se caracteriza por presentar estructuras organoides no muy bien desarrolladas, presenta criptas epiteliales o tubulos con ramificación y dilatación compleja e irregular; se asocia a atípia epitelial más marcada y alta frecuencia mitótica. **Adenocarcinoma poco diferenciado** se caracteriza por la presencia de células epiteliales que carecen de una disposición uniforme; presentan una estructura adenomatosa ligera o nula, pero con producción de mucosa y se caracterizan por la presencia de células en *anillo de sello*.

En base a lo anterior, en la Figura 19 se muestran los cambios histológicos representativos de los adenocarcinomas bien, moderadamente y poco diferenciados que se observaron en los cortes de colon de ratas inducidas químicamente con DMH y alimentadas con frijol PZ y N, para el análisis histológico de adenocarcinomas se obtuvo una mejor definición en los cortes transversales del colon.

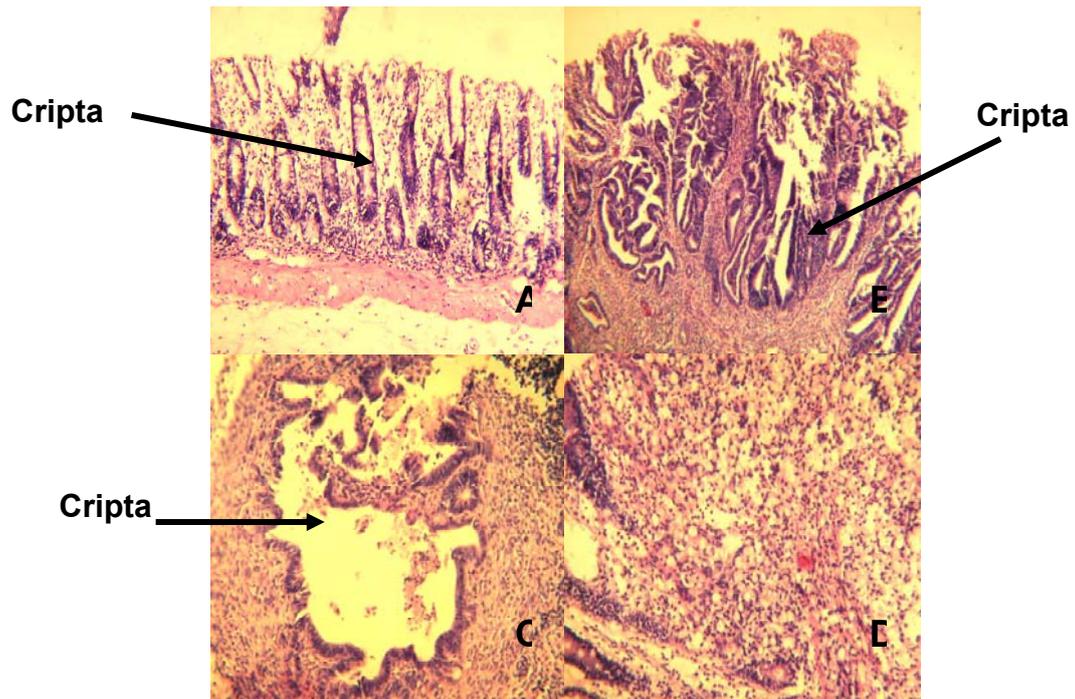


Figura 19. Histología de los tipos de adenocarcinomas observados en colon de ratas tratadas con el carcinógeno DMH. A) colon normal; B) adenocarcinoma bien diferenciado; C) adenocarcinoma moderadamente diferenciado; D) adenocarcinoma poco diferenciado.

Un colon normal se caracteriza histológicamente por sus cuatro capas, la mucosa, submucosa, muscularis y serosa, así como las criptas que van desde la mucosa hasta la muscularis, como se muestra en la micrografía **A**. En el caso de un adenocarcinoma bien diferenciado (micrografía **B**) se observaron estructuras tubulares bien diferenciadas mostrando una tendencia a formar criptas, se observaron células con actividad mitótica y núcleos estratificados, además de lámina propia densa. El adenocarcinoma moderadamente diferenciado se presenta en la micrografía **C**, en el cual se visualizaron estructuras tubulares con ramificación y dilatación irregular, con lámina propia densa, núcleos totalmente estratificados y alta frecuencia mitótica. En la micrografía **D** se muestra un adenocarcinoma poco diferenciado, se observaron células carentes de una disposición uniforme, y células en *anillo de sello*, las cuales se encargan de producir mucina (Figura 19).

Con respecto al tratamiento con frijol PZ, la incidencia de displasia solamente disminuye en los grupos tratados con esta leguminosa a partir de la concentración de 12.5% (40%), con respecto al grupo DMH (60%), el mayor porcentaje de displasias fueron del grado II, a excepción del grupo de DMH que mostró un 40% de incidencia de displasias de grado III y PZ 25% con un 20%. En cuanto a la incidencia de adenocarcinomas todos los tratamientos con frijol PZ presentaron un efecto significativo con un decremento de hasta 40%; el número promedio de adenocarcinomas disminuyó con respecto al aumento de la concentración de frijol en la dieta. El frijol PZ 3% produjo solamente 20% de sus adenocarcinomas y estos fueron clasificados como bien diferenciados, mientras que el resto de los grupos aún cuando tuvieron menos adenocarcinomas estos fueron moderadamente o poco diferenciados (Cuadro 12, 14 y 15).

La presencia de adenocarcinomas poco diferenciados nos habla de una posible invasión o metástasis, debido a esto es importante en los estudios de protección encontrar adenocarcinomas bien o moderadamente diferenciados.

Cuadro 12. Influencia del frijol PZ sobre la incidencia en displasias y adenocarcinomas, la multiplicidad y el número promedio de tumores

Tratamiento	Incidencia		Multiplicidad	No. promedio de adenocarcinoma
	displasia, <i>n</i>	adenocarcinoma, %		
Control	10	0	0	0 *
DMH	10	60	1.0	0.60 ± 0.16
PZ 0.5%	10	60	1.0	0.40 ± 0.16
PZ 3%	10	80	1.0	0.28 ± 0.12
PZ 12.5%	14	40	1.0	0.20 ± 0.13
PZ 25%	10	40	1.0	0.20 ± 0.13

Los valores representan la media ± DE. * indica diferencia estadística significativa comparado con el grupo DMH (p < 0.05).

En un estudio realizado por Hughes *et al.* (1997), la administración de una dieta con frijol pinto al 59.1% a ratas con cáncer de colon inducidas con azoximetano (AOM) observaron a las 38 semanas una incidencia de adenocarcinomas del 24% y la multiplicidad de 1.0, en cuanto al grupo AOM la incidencia de lesiones displásicas fue de 25%, de adenocarcinomas 45% y la multiplicidad de 1.0. La multiplicidad que presentaron los diferentes grupos de PZ, así como el control DMH, coincide con lo reportado por Hughes *et al.* (1997), sin embargo, en cuanto a displasia y adenocarcinomas no, ya que para la variedad PZ el grupo que mayor incidencia de displasia presentó fue el PZ 3% con un 80% comparado con el grupo DMH (60%), cabe recordar que fue en el que menos incidencia de adenocarcinomas se observó con un 20%, el grupo DMH presentó una incidencia del 60%. Esto nos sugiere que no todas las displasias presentes en el colon de estos animales evolucionaron a adenocarcinomas. Un efecto similar fue observado para PZ 0.5% y PZ 25%, en donde la incidencia de displasia fue de 60 y 40%, respectivamente; y en cuanto a la incidencia de adenocarcinomas fue de 40 y 20%, respectivamente. Para el grupo de PZ 12.5% tanto la incidencia de displasia como de adenocarcinomas fue del 40% (Cuadro 12).

Los adenocarcinomas en los grupos de N fue mayor en gran medida a los reportados por Hagen y Bennink (2002) ya que se obtuvo una incidencia hasta del 80% que corresponde al grupo de N 25%, cabe resaltar que la incidencia de displasia fue del 20% lo que nos sugiere que a esta concentración la mayoría de las lesiones displásicas evolucionan a adenocarcinomas. Por el contrario en el grupo N 3% se observó una incidencia de displasia mayor (60%) que la de adenocarcinomas (40%). En contraste el grupo que menor incidencia de adenocarcinomas y displasia presentó fue el N 0.5% ya que para ambas fue de 20%, con un comportamiento similar para el N 12.5% se observó una incidencia de displasias y adenocarcinomas de 60% (Cuadro 13). En cuanto a la multiplicidad que presentaron los grupos de N se obtuvo una mayor multiplicidad comparada con la de PZ, incluso en algunos grupos mayor que la del grupo DMH, tal es el caso de N 3% (2.0) y N 25% (1.33).

Cuadro 13. Influencia del frijol N sobre la incidencia en displasias y adenocarcinomas, la multiplicidad y el número promedio de tumores

Tratamiento	Incidencia				No. promedio de adenocarcinoma
	<i>n</i>	displasia, %	adenocarcinoma, %	Multiplicidad	
Control	10	0	0	0	0 *
DMH	10	60	60	1.0	0.60 ± 0.16
N 0.5%	10	20	20	1.0	0.20 ± 0.13
N 3%	10	60	40	2.0	0.40 ± 0.26
N 12.5%	10	60	60	1.0	0.40 ± 0.16
N 25%	10	20	80	1.33	0.80 ± 0.24

Los valores representan la media ± DE. * indica diferencia estadística significativa comparado con el grupo DMH ($p < 0.05$).

Cuadro 14. Incidencia de displasia por grado en ratas tratadas con DMH y alimentadas con dos variedades de frijol a diferentes concentraciones

Tratamiento	Incidencia de displasia (%)			Total
	Grado			
	I	II	III	
Control	0	0	0	0
DMH	0	20	40	60
PZ 0.5%	20	40	0	60
PZ 3%	20	60	0	80
PZ 12.5%	20	20	0	40
PZ 25%	0	20	20	40
N 0.5%	0	20	0	20
N 3%	40	20	0	60
N 12.5%	20	40	0	60
N 25%	0	20	0	20

Cuadro 15. Incidencia de adenocarcinomas por grado de diferenciación en ratas tratadas con DMH y alimentadas con dos variedades de frijol cocido a diferentes concentraciones

Tratamiento	Incidencia de adenocarcinomas (%)			Total
	Grado de diferenciación			
	bien	moderadamente	Poco	
Control	0	0	0	0
DMH	20	20	20	60
PZ 0.5%	20	0	20	40
PZ 3%	20	0	0	20
PZ 12.5%	0	20	20	40
PZ 25%	0	20	0	20
N 0.5%	0	0	20	20
N 3%	20	0	20	40
N 12.5%	40	0	20	60
N 25%	40	20	20	80

Los animales tratados con frijol N solamente presentaron menor incidencia de displasia a las concentraciones de 0.5 (20%) y de 25% (20%) y el grado de displasia de ambos grupos fue de II, mientras que para el resto de los tratamientos mostraron incidencia de displasia grado I (20-40%) y II (20-40%), el grupo DMH fue del 20% y 40% grado II y III respectivamente (Cuadro 14 y 15). Con respecto a los adenocarcinomas todas las dosis disminuyeron la incidencia a excepción del frijol al 25%, el cual además presentó mayor multiplicidad (1.33 vs 1.0) y número promedio de adenocarcinomas (0.80 vs 0.60) comparado con DMH, además, con un grado de diferenciación similar a DMH (Cuadro 12 y 14).

Por lo anterior se puede concluir que si existe un efecto del consumo de frijol sobre la incidencia de cáncer de colon. Sin embargo, se debe de tomar en cuenta el carcinógeno utilizado y el tiempo de inducción, así como la concentración de frijol empleada, el tiempo de consumo y la variedad, ya que la

protección conferida por el frijol depende en gran medida de la cantidad y naturaleza química de los compuestos bioactivos presentes.

7.4.1 Consumo de alimento de ratas tratadas con el carcinógeno DMH y alimentadas con harina de frijol

Para esta etapa, semanalmente se registró el consumo de alimento de los grupos control (sanas) y DMH (inducidas), así como de los grupos que fueron alimentados con las dos variedades de harina de frijol cocido (DMH + frijol).

El consumo de alimento durante la primer semana osciló entre 11.33 ± 3.01 g, conforme fueron transcurriendo las semanas se incrementó, obteniendo para la cuarta semana un consumo de 27.18 ± 1.67 g. Después de esta semana se llevo a acabo la inducción del cáncer (5^a semana), en donde se registró un consumo de 31.24 ± 4.62 g. De tal forma que el estrés causado por la inducción se vió reflejado en la sexta semana en donde el consumo de alimento disminuyó oscilando entre 23.79 ± 4.26 g. A partir de esta semana el consumo se estabilizó manteniendo una tendencia similar para todos los grupos, registrándose para la semana 12 (última inyección con DMH) un consumo de 28.66 ± 0.91 g, finalmente antes de llevar a cabo el sacrificio (semana 23) el consumo oscilaba entre 28.24 ± 1.59 g. De manera similar que en las ratas sanas, este parámetro no mostró cambios por efecto del tratamiento, solo por el estrés de la inducción siendo significativo solo en las primeras dos inyecciones (Figura 20).

Varios estudios han demostrado que el consumo de energía es una variable que influye en el cáncer inducido químicamente (Hughes *et al.*, 1997). Sin embargo, en este estudio la ingesta de energía no es una variable que influya en los resultados generados, ya que las dietas incorporadas con frijol aportan similar contenido calórico que la dieta control (Cuadro 9).

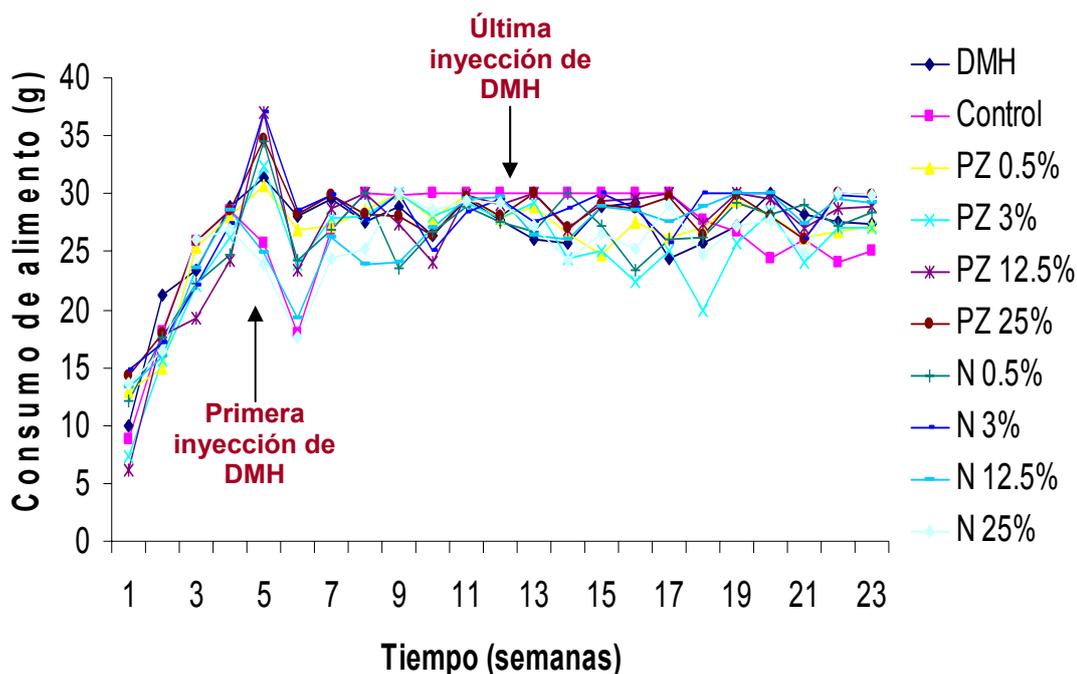


Figura 20. Consumo de alimento de ratas tratadas con el carcinógeno DMH y alimentadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones. Cada punto representa la media del consumo de alimento por rata de los animales en tratamiento.

7.4.2 Ganancia de peso de ratas tratadas con el carcinógeno DMH y alimentadas con harina de frijol

La ganancia de peso también se registró semanalmente observándose una tendencia en el incremento de peso con respecto al tiempo, donde durante la inducción de cáncer de colon (semana 5-12), no se presentó una disminución significativa en la ganancia de peso. Al término, del experimento (semana 23) el grupo DMH mostró la mayor ganancia de peso (458.96 ± 17.34), mientras que los grupos de frijol y el grupo control presentaron una ganancia de peso alrededor de 437.75 ± 24.47 y 373.44 ± 42.40 , respectivamente (Figura 21). El grupo tratado con frijol N 12.5% presentó una menor ganancia de peso con respecto al resto de los grupos; sin embargo, esta disminución no fue estadísticamente significativa.

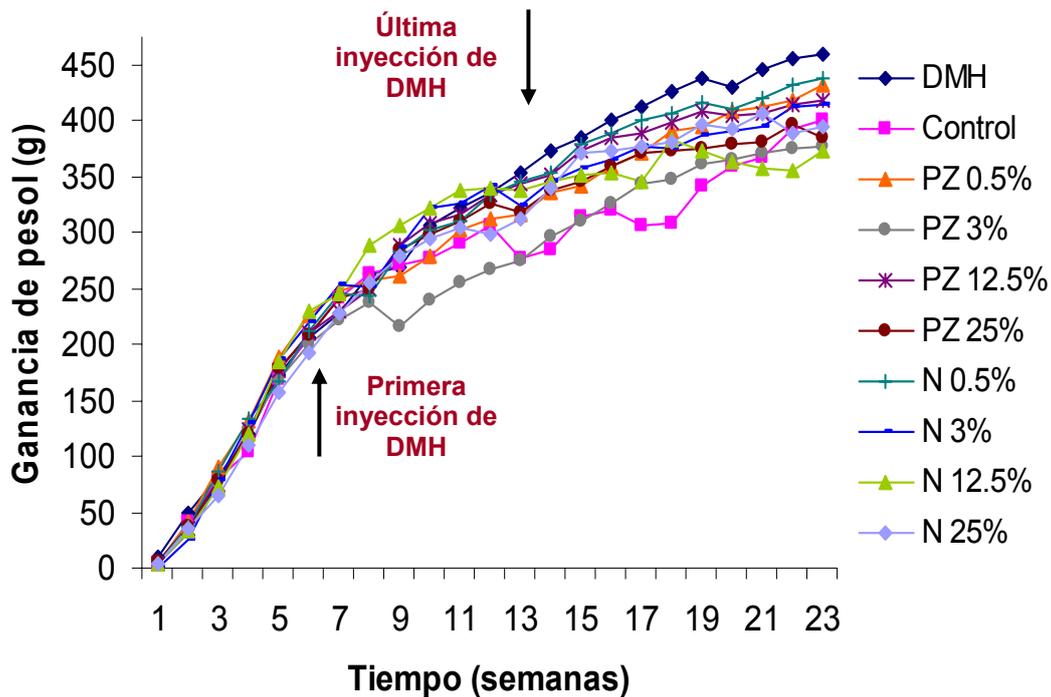


Figura 21. Ganancia de peso de ratas tratadas con el carcinógeno DMH y alimentadas con dos variedades de frijol cocido incorporado a la dieta a diferentes concentraciones. Cada punto representa la media de la ganancia de peso por rata de los animales en tratamiento.

Hangen y Bennink (2002) reportaron que ratas tratadas con dos variedades de frijol Negro y Blanco, incorporando a la dieta 75% ganan significativamente menos peso con respecto al control (13% y 14%, respectivamente) y esto lo atribuyeron a un menor consumo de alimento (8% y 20%, respectivamente).

La disminución de la ganancia de peso de los grupos alimentados con frijol con respecto al grupo DMH no puede atribuirse a un menor consumo de alimento, por el contrario, se ha sugerido que la DMH altera el metabolismo de lípidos, incrementando su concentración en suero (Piñols, 1998), por lo que el grupo DMH pudiera encontrarse con un mayor índice de obesidad.

Estos resultados sugieren que el frijol pudiera contener compuestos que regulan el metabolismo de lípidos. Para demostrar este efecto, se determinó la concentración de lípidos presentes en el suero de los animales en tratamiento.

7.4.3 Concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL e índice de Castelli en sangre de ratas tratadas con DMH y alimentadas con harina de frijol

En el Cuadro 16 se muestran la concentración de glucosa para el grupo control el cual fue menor (38.5%) comparado con el grupo DMH, de manera inversa las dietas con ambas variedades de frijol mostraron un efecto contrario, elevando la concentración de glucosa de manera significativa en un 150% con respecto al grupo DMH. Lo cual nos sugiere que el frijol, en presencia del carcinógeno, provoca hiperglicemia obteniéndose un rango de 346.41 ± 15.15 mg/dL.

Cuadro 16. Concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol y HDL en sangre de ratas tratadas con DMH y alimentadas diferentes concentraciones de frijol cocido.

Tratamiento	Glucosa	Triglicéridos	Colesterol	HDL	Índice de Castelli
Control	94.49 ± 4.38 *	86.79 ± 5.03 *	54.45 ± 0.75	42.83 ± 1.64	1.31 ± 0.06
DMH	153.74 ± 2.98	215.61 ± 11.02	60.35 ± 4.88	44.00 ± 3.97	1.36 ± 0.01
PZ 0.5%	370.86 ± 16.41 *	245.38 ± 8.30 *	50.10 ± 2.92	33.73 ± 2.73 *	1.67 ± 0.06
PZ 3%	365.23 ± 14.23 *	167.61 ± 8.40 *	56.57 ± 0.41	31.95 ± 1.99 *	1.78 ± 0.11 *
PZ 12.5 %	362.57 ± 9.36 *	204.71 ± 4.09	55.75 ± 3.42	36.39 ± 1.67	1.40 ± 0.07
PZ 25%	353.34 ± 17.74 *	247.27 ± 8.61 *	53.17 ± 2.42	39.55 ± 2.64	1.35 ± 0.06
N 0.5%	394.57 ± 6.55 *	127.04 ± 1.84 *	56.12 ± 2.49	39.01 ± 1.77	1.43 ± 0.07
N 3%	302.28 ± 14.91 *	108.90 ± 5.49 *	49.88 ± 3.61	39.86 ± 2.33	1.33 ± 0.03
N 12.5%	315.04 ± 16.16 *	95.38 ± 1.37 *	57.20 ± 3.33	35.26 ± 1.04	1.62 ± 0.12
N 25%	307.38 ± 16.53 *	95.49 ± 3.34 *	54.62 ± 2.76	37.76 ± 1.29	1.44 ± 0.11

Los valores se expresan en mg/dL para glucosa, triglicéridos, colesterol y HDL. Los valores representan la media ± EEM. * indica diferencia estadística significativa comparado con el grupo DMH ($p < 0.05$).

La hiperglicemia se ha asociado con altos niveles de insulina en sangre y dicha hormona es un factor de crecimiento importante para las células de la mucosa colónica y es un mitógeno de las células de carcinomas colónicos *in vitro* (Tran *et al.*, 1996); lo anterior pudiera explicar que en algunos grupos de frijol, principalmente en la variedad N a la concentración de 12.5 y 25% la incidencia de adenocarcinomas sea similar o significativamente mayor (60 y 80%, respectivamente) que el grupo DMH.

Por otra parte, los triglicéridos también se incrementaron hasta en un 60% en el grupo tratado con DMH con respecto al grupo control. En cuanto a los grupos alimentados con frijol PZ, no existe una relación de la disminución de triglicéridos con respecto a la concentración. El grupo PZ 0.5 y 25% obtuvieron valores significativamente superiores a DMH (245.38 ± 8.30 y 247.27 ± 8.61 mg/dL, respectivamente), PZ 12.5% mantuvo los niveles similares al grupo DMH (204.71 ± 4.09 mg/dL), mientras que PZ 3% presentó valores significativamente menores a DMH (167.61 ± 8.40 mg/dL). En este último grupo este efecto pudiera estar relacionado con una menor ganancia de peso y, a su vez, con una mayor protección contra el cáncer de colon.

Con respecto al frijol N, en esta variedad si se observó una relación entre el incremento de la concentración de frijol y la disminución de la concentración de triglicéridos, mostrando desde la concentración de 0.5% niveles significativamente menores hasta en un 41% con respecto al grupo DMH, para N 3% en un 49% y para los grupos N 12.5 y 25% hasta en un 56%.

Los triglicéridos en suero se han relacionado fuertemente con un incremento en el riesgo de cáncer de colon; dicho efecto se ha atribuido a un incremento en la secreción de ácidos biliares fecales, lo cual promueve una mayor absorción de triglicéridos hacia torrente sanguíneo (McKeown-Eyseen, 1994), por lo que es importante que éstos no se encuentren elevados. Debido a que las diferentes concentraciones de frijol N no mostraron un efecto protector

contra el cáncer, este parámetro no puede directamente relacionarse con la disminución de adenocarcinomas observadas en la concentración de N 0.5%.

En cuanto a los niveles de colesterol en sangre no se observó una diferencia estadística significativa, tanto del grupo control como de los grupos alimentados con frijol, con respecto al grupo DMH. Sin embargo, es importante mencionar que los valores obtenidos, incluso para el grupo DMH, son menores que los presentados en la primera etapa con los animales sanos alimentados con frijol hasta en un 25% para ambas variedades. Lo anterior sugiere que el tiempo de consumo de la dieta (base o harina de frijol) y la edad son factores determinantes en algunos parámetros (Alvarado-Osuna *et al.*, 2001).

La concentración de HDL fue ligeramente mayor en los animales tratados con DMH comparado con el control. El tratamiento con frijol disminuyó significativamente en los grupos de PZ 0.5 y 3% (23 y 27%, respectivamente).

El índice de Castelli, el cual refleja si los niveles de HDL son los adecuados para llevar a cabo el transporte de colesterol en el organismo no debe ser mayor a 3.4 (Quezada, 2003). En el Cuadro 16 se muestra que todos los grupos experimentales (control, DMH y los de frijol) presentaron un índice menor requerido normalmente, lo cual sugiere que todos los animales en experimentación presentaban concentraciones adecuadas de HDL.

7.4.4 Actividad enzimática de β -glucuronidasa en el contenido distal colónico de ratas tratadas con DMH y alimentadas con harina de frijol

La enzima β -glucuronidasa también fue evaluada en el contenido distal de colon de ratas tratadas con DMH y alimentadas con frijol a diferentes concentraciones (0.5, 3, 12.5 y 25%). Esta enzima como ya se mencionó es relevante en el proceso de carcinogénesis de colon, ya que se encarga de hidrolizar al conjugado metilazoximetanol-glucuronidado transportado por vía enterohepática, reactivándolo como metilazoximetanol y dando paso posteriormente a la transformación en metildiazonio, el cual es denominado el carcinógeno final. Dicha enzima puede ser secretada por la microflora colónica y

ésta depende de la dieta que se consuma (Arimochi *et al.*, 1999), por lo que es de suma importancia determinar como se encuentra la actividad enzimática de β -glucuronidasa en ratas después de consumir una dieta que incluyera frijol a diferentes concentraciones antes, durante y después de ser inducidas con el carcinógeno DMH (Figura 22).

A partir de la determinación de la actividad enzimática se observa que el grupo control (3.74 ± 0.70) presentó menor actividad (36%) con respecto al grupo DMH, lo cual indica que el carcinógeno DMH presente en estos animales promueve una mayor actividad enzimática debido a la presencia de una mayor concentración de conjugados glucuronidados excretados (metilazoximetanol-glucuronidado).

En los grupos de frijol no se presentó un comportamiento dosis-respuesta, ya que el incremento en la actividad no depende de la concentración de frijol. Además, se observó una disminución significativa de la actividad de β -glucuronidasa (expresada en nmol/min g de contenido distal) en las concentraciones de PZ 12.5% (4.11 ± 0.53) y N 3% (4.34 ± 0.38), manteniéndose alrededor de los niveles basales obtenidos por el grupo control.

Por otra parte, se presentaron grupos de frijol con niveles de actividad semejantes al grupo DMH (5.82 ± 0.33) como PZ 25% (5.52 ± 0.63) y N 0.5% (5.38 ± 0.59), además de que también se observaron grupos que incrementaron la actividad de β -glucuronidasa como el PZ 0.5% (8.20 ± 0.99), PZ 3% (8.92 ± 0.91), N 12.5% (8.31 ± 0.64) y N 25% (7.42 ± 0.84) con respecto a DMH.

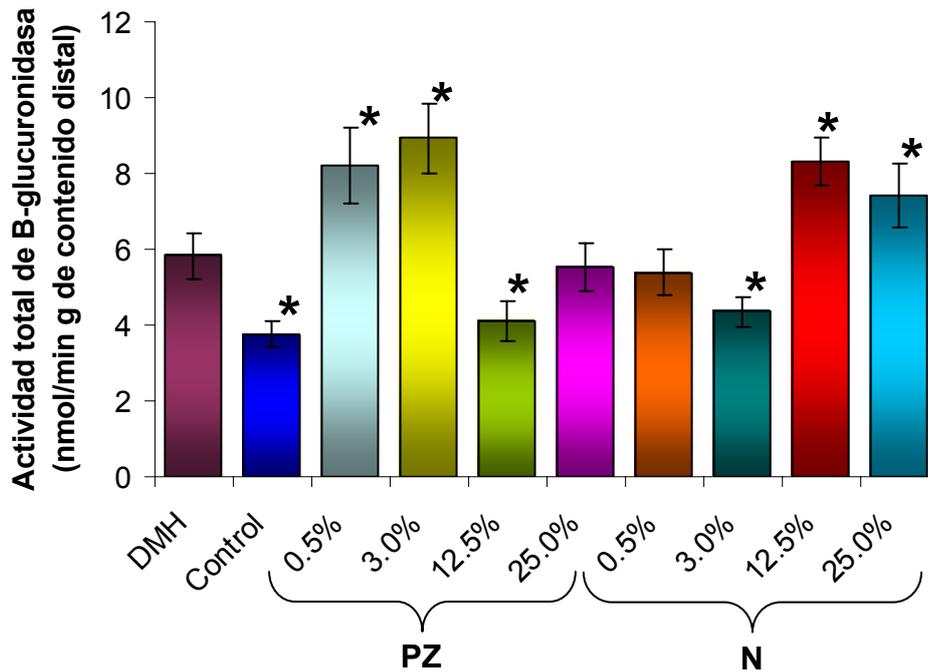


Figura 22. Actividad enzimática de β -glucuronidasa en contenido distal de ratas tratadas con DMH y alimentadas con diferentes harinas de frijol cocido. * indica diferencia estadística significativa con respecto al grupo DMH ($p < 0.05$).

Uno de los efectos benéficos en la supresión de cáncer de colon se le ha atribuido a la ingesta de carbohidratos complejos como la fibra, los cuales pueden presentar diversos mecanismos como la selectividad de bacterias (Rao *et al.*, 1998). Por lo que el tipo de fibra aportada por cada variedad podría ser un factor determinante en la selección bacteriana y como consecuencia en la actividad enzimática de β -glucuronidasa, ya que se observó un incremento en la actividad para concentraciones bajas en la variedad PZ, No siendo así para la variedad N.

Debido a que los grupos que mostraron mayor protección para el desarrollo de cáncer de colon (N 0.5% y PZ 3%), no muestran un efecto sobre esta enzima (PZ 12.5 y N 3%), se puede sugerir que este mecanismo no es importante para el control del cáncer de colon por estas leguminosas.

Manoj *et al.* (2001) realizaron un estudio en donde evaluaron la actividad de β -glucuronidasa en el contenido distal de ratas inducidas químicamente con DMH y alimentadas con *Phaseolus mungo*, observando que la actividad fue significativamente menor con respecto al control positivo (DMH) y sugiriendo que la fibra proporcionada por el frijol era la que posiblemente causaba ese efecto. Lo anterior tal vez a que la fibra presente en este frijol estaba compuesta de carbohidratos complejos, los cuales pueden presentar diversos mecanismos de modulación como influir en el tiempo de tránsito intestinal incrementando el peristaltismo, absorción del carcinógeno, incremento en la selectividad de bacterias y la fermentación de sus productos.

Lo anterior hace inferir que la cantidad fibra no es el componente más importante para regular a la enzima β -glucuronidasa, ya que las dietas de PZ presentaban menor concentración comparadas con las de N. Por lo que, el factor determinante podría ser el tipo de carbohidratos complejos presentes en la fibra.

Cabe señalar que la actividad de diversas enzimas depende de la edad del animal, así como de la dieta y el tiempo de consumo de dicha dieta, ya que la enzima evaluada en el contenido distal de las ratas sanas de la primera etapa presentó una actividad basal de 18.55 ± 1.48 nmol/min g de contenido distal. En cambio en las ratas control de la segunda etapa se presentó una actividad basal de 5.82 ± 0.33 nmol/min g de contenido distal.

7.4.5 Actividad enzimática de glutatión S-transferasa en hígado de ratas tratadas con DMH y alimentadas con harina de frijol

En esta etapa también se cuantificó la actividad de la enzima GST en extractos citosólicos de hígado de ratas tratadas con DMH y alimentadas con harina de frijol cocido a diferentes concentraciones (0.5, 3, 12.5 y 25%). Los resultados obtenidos fueron expresados en nmol/min mg de proteína (Figura 23). De manera similar que en la primera etapa, no se observó alguna tendencia

en cuanto al aumento de la actividad enzimática de GST con respecto a la concentración de frijol para ambas variedades (PZ y N).

Se observó un incremento significativo en la actividad de GST en el grupo control (22%) comparado con el grupo DMH (535.62 ± 21.60) y de grupos de frijol en los que se incluyen PZ 0.5% (619.02 ± 55.19), PZ 3% (650.53 ± 57.69), N 0.5% (711.31 ± 53.64), N 3% (779.15 ± 69.94) y N 25% (718.34 ± 62.15). Además, algunos grupos mostraron actividad enzimática similar al grupo DMH, tales como PZ 12.5% (594.61 ± 56.59), PZ 25% (582.29 ± 47.05) y N12.5% (610.22 ± 57.27). Ambos frijoles PZ 3% y N 0.5% incrementan la actividad de esta enzima lo cual pudiera también estar relacionado con una mayor actividad hepática de detoxificación y por ende mayor protección de estos frijoles.

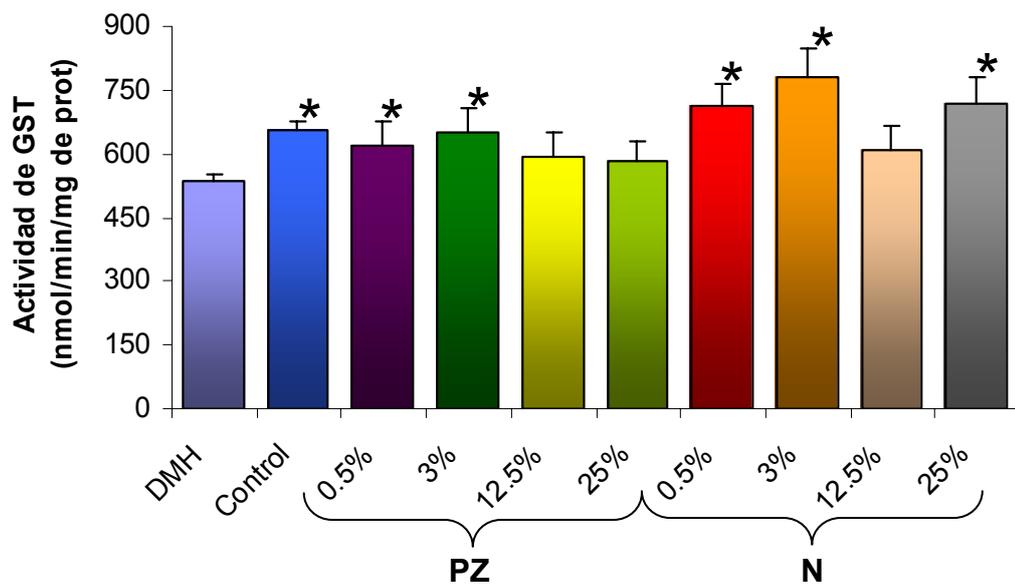


Figura 23. Actividad enzimática de glutatión S-transferasa (GST) en hígado de ratas tratadas con DMH y alimentadas con frijol. * Indica diferencia estadística significativa con respecto al grupo DMH ($p < 0.05$).

Debido a que se ha sugerido que las enzimas de fase II o enzimas detoxificadoras pueden ser inducidas por antioxidantes y que los niveles de inducción pueden atribuirse a la concentración y/o naturaleza de ciertos compuestos fenólicos (Seidegard y Ekström, 1997). Pudieran existir compuestos fenólicos, tanto en la variedad PZ, como en N que promuevan dicha actividad, llevando a cabo un sinergismo o antagonismo entre ellos potenciando o inhibiendo la activación de GST, siendo finalmente esta inducción dependiente de la concentración de dichos compuestos, lo cual se vio reflejado en las diferentes concentraciones de frijol en las dietas. Además se debe tomar en cuenta de que la concentración de dichos compuestos pudo alterarse mediante el tratamiento térmico (cocción y secado) que recibieron los frijoles.

Por otra parte, también se ha comprobado que un mecanismo de defensa a la exposición de niveles bajos de compuestos carcinogénicos y especies reactivas es el incremento de la actividad de enzimas detoxificadoras o enzimas de fase II. En este caso los resultados demuestran que la actividad no incrementó en presencia del carcinógeno DMH. Por el contrario la actividad enzimática fue menor que los niveles basales (control), lo que puede atribuirse a las concentraciones elevadas y repetidas de DMH a la que los animales fueron expuestos, ya que a concentraciones elevadas la respuesta es contraria (Prester *et al.*, 1993). Además, estudios realizados demuestran que células de colon humano incrementan la actividad de GST en presencia de butirato, por lo que pudiera ser otro mecanismo por el cual se incrementó de manera significativa la actividad de GST, o bien la conjunción de dos o más mecanismos.

7.4.8 Expresión de la proteína PCNA como marcador de la proliferación celular en colon de ratas alimentadas con harina de frijol e inducidas químicamente con el carcinógeno colónico DMH

La evaluación de la proliferación celular se realizó en lesiones obtenidas del colon de los animales tratados con el carcinógeno DMH y alimentadas con frijol. Este parámetro se evaluó mediante la expresión del antígeno nuclear de

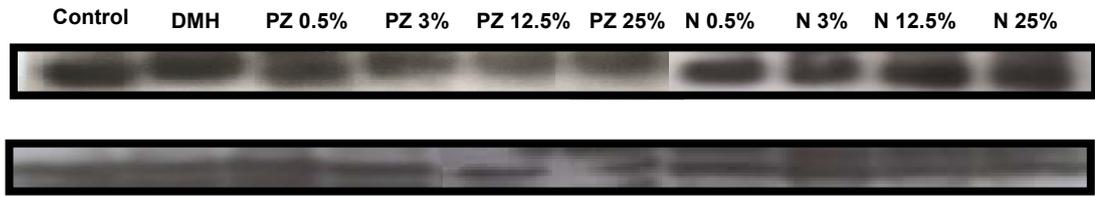
proliferación celular (PCNA por sus siglas en inglés), ya que es uno de los marcadores más utilizados debido a que se sintetiza tempranamente en las fases G1 y S del ciclo celular. En la figura 24 se muestran los niveles de expresión de la proteína PCNA mediante western blot y la relación obtenida con la proteína β -actina, la cual es utilizada como un control de carga.

Los resultados obtenidos mostraron un decremento en la expresión de PCNA para el grupo control de hasta un 47% con respecto al grupo DMH, lo que indica que la proliferación en este último grupo era mayor, lo cual se relaciona con una mayor incidencia de cáncer de colon (60%).

La expresión de PCNA para los grupos PZ 3%, PZ 25% y N 0.5% fue menor 23%, 25% y 24%, respectivamente con respecto al grupo DMH. Por el contrario los grupos PZ 0.5%, PZ 12.5%, N 3%, N 12.5% y N 25% no mostraron un efecto significativo sobre la expresión de PCNA con respecto a DMH.

Estos resultados se relacionan con la disminución en la incidencia de adenocarcinomas obtenida mediante la evaluación histopatológica para los grupos PZ 3% y N 0.5%, lo cual sugiere que un posible mecanismo de acción que el frijol pueda llevar a cabo para disminuir la incidencia de cáncer de colon, es mediante arresto del ciclo celular, lo que se refleja en una menor expresión de PCNA.

a)



b)

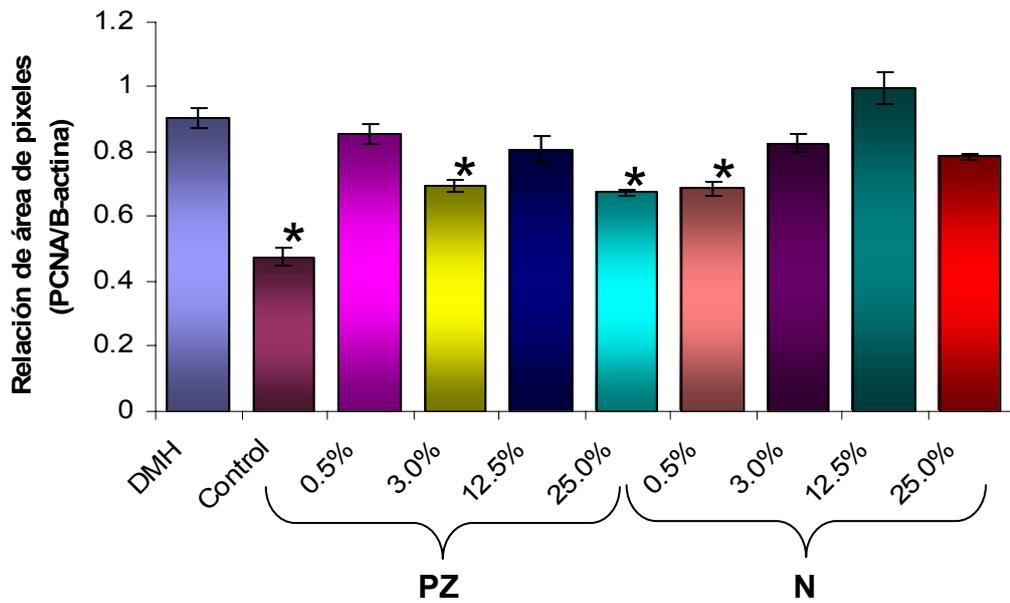


Figura 24. Niveles de expresión de PCNA evaluada mediante a) western blot y b) la relación de área de pixeles de PCNA entre β -actina. * indica diferencia significativa con respecto al grupo DMH ($p < 0.05$).

Este mecanismo puede atribuirse a la presencia de AGCC, los cuales como ya se ha mencionó son producto de la fermentación de la fibra soluble e insoluble, oligosacáridos y del almidón resistente llevada a cabo por las bacterias colónicas. Se ha demostrado que en células de cáncer de colon, el butirato disminuye significativamente la expresión de PCNA, lo cual se traduce en un decremento en la proliferación celular, disminuyendo a su vez la incidencia de cáncer de colon (Emenaker *et al.*, 2001). Aún cuando no se determinó el perfil de concentración de los AGCC, es importante considerar este parámetro en próximos estudios y comprobar dicho efecto.

8. CONCLUSIONES

- El consumo de frijol a altas concentraciones, aún cuando no modifica la ganancia de peso corporal, si disminuye de manera significativa los niveles de colesterol sanguíneo de los animales en tratamiento y esto se relaciona con una mayor producción de propionato en el contenido distal colónico.
- La actividad de la enzima β -glucuronidasa disminuye en animales tratados con 25 y 50% de frijol para ambas variedades, este efecto no está influenciado por la concentración de taninos condensados presentes en estas leguminosas, ya que el frijol negro mostró mayor concentración de dichos compuestos y la actividad de la enzima es disminuida de manera similar que PZ.
- La cantidad y el tipo de fibra aportada por las variedades de frijol es un factor determinante en la selección bacteriana colónica, produciendo un incremento o una disminución en la actividad enzimática de β -glucuronidasa.
- La actividad de la enzima GST en ratas sanas no es dependiente de la concentración de compuestos fenólicos, antocianinas y capacidad antioxidante (determinada por ABTS) de las harinas de frijol.
- El consumo de altas concentraciones de frijol (25 y 50%) regulan significativamente algunos factores de riesgo asociados al cáncer de colon, dicho efecto es dependiente de la variedad.
- La incorporación de frijol en la dieta a las diferentes concentraciones evaluadas disminuye la incidencia y el número promedio de adencarcinomas, mostrando en ambos frijoles un efecto más significativo a concentraciones bajas (0.5-3%).

- La disminución de cáncer de colon por ambos frijoles está relacionada con una menor concentración de triglicéridos, mayor actividad de la enzima glutatión S-transferasa y menor expresión del antígeno PCNA.
- El consumo de bajas concentraciones de frijol (0.5 y 3%) disminuyen significativamente la incidencia de cáncer de colon, pero este efecto es dependiente de la variedad de frijol, ya que cada variedad contiene diferente perfil de compuestos bioactivos.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Aal**, M. S., and P. Hucl. **1999**. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem.* 76:350-354.
- Agostini**, L. R., M. J. Morón , y A. N. Ramón. **2004**. Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente. *ALAN.* 54:89-92.
- Albert**, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. Watson. **1994**. *Molecular Biology of the Cell*, Garland (Ed). p. 769-766,1288-1290.
- Alexander-Williams**, J., and H. Binder. **1983**. *Gastroenterología 3: Intestino grueso*, Manual Moderno (Ed). p. 208-212.
- Alvarado-Osuna**, C., F. Milian-Suazo, y V. Valles-Sánchez. **2001**. Prevalencia de diabetes mellitus e hiperlipidemias en indígenas otomíes. *Salud Pública Mex.* 43:459-463.
- AOAC**. *Official Methods of Análisis of AOAC Internacional*, AOAC Internacional (Ed). Vol. II. Chapter 32. p. 2,5,12,14.
- Aparicio-Fernández**, X., L. Manzo-Bonilla and G. Loarca-Piña. **2005**. Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B₁". *J Food Sci.* 70:S73-S78.
- Arimochi**, H., K. Kataota, T. Kuwahara, H. Nakayama, M. Misawa, and Y. Ohnishi. **1999**. Effects of β -glucuronidase-deficient and lycopene-producing *Escherichia coli* strains on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Biochem Biophys Res Communications.* 262:322-327.

- Arts, M., G. Haenen, H-P. Voss, and A. Bast. 2003.** Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chem Tox.* 42:45-49.
- Biggs, A., C. Kapricka, and L. Lundgren. 2000.** *Biología: La dinámica de la vida*, McGraw-Hill (Ed), p. 277-278.
- Bressani, R., y A. Blanco. 1991.** Biodisponibilidad de aminoácidos en el frijol (*Phaseolus vulgaris*). *INCAP.* 41:39-51.
- Cabrera, C. M. y M. A. López-Nevot. 2005.** APC e inestabilidad cromosómica en el cáncer de colon. *Rev esp enferm dig.* 97:738-743.
- Cardador-Martínez, A, E. Castaño-Tostado and G. Loarca-Piña. 2002.** Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in common beans against aflatoxin B₁. *Food Additives and Contaminants.*19(1): 62-69.
- Castellanos, J. Z., H. Guzmán, A. Jiménez, C. Mejía, J. J. Muñoz, J. A. Acosta, G. Hoyos, E. López, D. González, R. Salinas, J. González, J. A. Muñoz, P. Fernández, y B. Cáceres. 1997.** Hábitos preferenciales de los consumidores de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) en México. *ALAN.* 47:163-167.
- Cavallé de Moya, C., G. Grant, G. Frühbeck, E. Urdaneta, M. García, F. Marzo, and S. Santidrián. 2003.** Local (gut) and systemic metabolism of rats is altered by consumption of raw bean (*Phaseolus vulgaris L. var. atropurpurea*). *British J Nutr.* 89:311-318.
- Clayson, D. B. 2000.** *Toxicological Carcinogenesis*, Lewis Publishers (Ed), p. 2-5.
- Corpet, D., and S. Tache. 2002.** Most Effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. *Nutr Cancer.* 43:1-21.

- Desphande**, and Cheyran. **1987**. Determination of phenolic compounds of dry beans using vainillin, redox and precipitation assays. *J Food Sci.* 52:332-334.
- De Vita**, V. T., S. Hellman, and S. Rosenberg. **1999**. *CANCER. Principios y Práctica de Oncología, Médica Panamericana* (Ed), p. 79-102.
- Díaz-Batalla**, L., J. M. Widholm, G. C. Fahey, E. Castaño-Tostado, and O. Paredes-López. **2006**. Chemical Components with Health Implications in Wild and Cultivated Mexican Common Bean Seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* 54:2045-2052.
- Díaz**, R. E. **1999**. Revisión en Cáncer Vol. 1, ARAN (Ed), p. 341-380.
- Drumm**, T. D., J. I. Gray, and G. L. Hosfield. **1990**. Variability in the saccharide, protein, phenolic acid and saponins contents of four market classes of edible dry beans. *J Sci Food Agric.* 51:285-297.
- Ebert**, M. N., G. Beyer-Sehlmeyer, U. M. Liegibel, T. Kautenburger, T. W. Becker, and B. L. Pool-Zobel. **2001**. Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal. *Nutr Cancer.* 41:156-164.
- Ebert**, M. N., A. Klinder, H. M. Peters, A. Schäferhenrich, W. Sendt, J. Scheele, and B. L. Pool-Zobel. **2003**. Expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate. *Carcinogenesis.* 24:1637-1644.
- Ellington**, A. A., M. Berhow, and K. W. Singletary. **2005**. Induction of macroautophagy in human colon cancer cells by soybean B-group triterpenoid saponins. *Carcinogenesis.* 26:159-167.
- Ellington**, A. A., M. Berhow, and K. W. Singletary. **2006**. Inhibition of Akt signaling and enhanced ERK1/2 activity are involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells. *Carcinogenesis.* 27:298-306.

- Emenaker, N. J., G. M. Calaf, D. Cox, M. D. Basson, and N. Qureshi. 2001.** Short-chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating uPA, TIMP-1, TIMP-2, mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 y PCNA protein expression in an in vitro cell culture model. *J Nutr.* 131:3041S – 3046S.
- Espinoza-Alonso, L. G., A. Lygin, J. M. Widholm, M. E. Valverde, and O. Paredes-Lopez. 2006.** Polyphenols in Wild and Weeby Mexican Common Beans (*Phaseolus Vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* 54:4436-4444.
- Fawcett, D. 1988.** Tratado de Histología, McGraw-Hill – Interamericana (Ed), p. 697-698.
- Feldman, M., B. F. Scharschmidt, and M. H. Sleisenger. 2000.** Sleisenger & Fordtran. Enfermedades Gastrointestinales y Hepáticas: Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento, Panamericana (Ed), p. 2047-2085.
- Fenoglio-Preiser, C., P. Lantz, M. Listrom, M. Davis, and F. Rilke. 1989.** Gastrointestinal Pathology. Raven Press (Ed), Ltd., USA. 383-397.
- Foster-Powel, K., S. Holt, and J. Brand-Miller. 2002.** International table of glycemic index and glycemic load values. *Am J Clin Nutr.* 76:5-56.
- Geoffrey, M. 2000.** The Cell a Molecular Approach, SINAUER (Ed), p. 1358.
- Goldberg, I. 1994.** Funtional Food: Designer Food, Pharmafoods, Nutraceuticals, Chapman and Hall (Ed), p. 3-18.
- Griffiths, A., W. Gelbart, J. Miller, y R. Lewontin. 2000.** Genética Moderna, McGraw-Hill – Interamericana (Ed), p. 479.
- Hangen, L. and M. R. Bennink. 2002.** Consumption of Black Beans and Navy Beans (*Phaseolus vulgaris*) Reduced Azoxymethane-Induced Colon Cancer in Rats. *J Nutr Cancer.* 44:60-65.
- Hodgson, H. and R. C. Smart. 2001.** Introduction to Biochemical Toxicology, 3^a ed., Wiley-Interscience (Ed), p. 343-395.

<http://www.cancer.gov>, **2006**

<http://www.chem.duke.edu>, **2007**

<http://www.en.wikipedia.org/wiki/PCNA>, **2007**

<http://www.inegi.gob.mx>, **2005**

<http://www.siap.sagarpa.gob.mx>, **2003**

Hughes, J. S., Ch. Ganthavorn, and S. Wilson-Sanders. 1997. Dry Beans Inhibit Azoxymethane-Induced Colon Carcinogenesis in F344 Rats. *J Nutr.* 127:2328-2333.

Iniestra-González, J. J., F. J. Ibarra-Pérez, J. A. Gallegos-Infante, N. E. Rocha-Guzmán, and R. F. González-Laredo. 2005. Factores Antinutricios y Actividad Antioxidante en Variedades Mejoradas de Fríjol Común (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia.* 39:603-610.

Jackson, P., D. Cooper, J. O'Connor, and A. Povey. 1999. The relationship between 1,2-dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumours: Tumour development in female SWR mice does not require a K-ras mutational event. *Carcinogenesis.* 20:509-513.

Jackson, S. J. and K. W. Singletary. 2004. Sulfurophane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization. *J Nutr.* 134:2229-2236.

Jee, S. H., H. Ohrr, J. W. Sull, J. E. Yun, M. Ji, and J. M. Samet. 2005. Fasting serum glucose level and cancer risk in Korean men and women. *JAMA.* 12:194-202.

Jenab, M., S. E. Richard, L. J. Orcheson, and L. U. Thompson. 1999. Flaxseed and lignans increase cecal β -glucuronidase activity in rats. *Nutr Cancer.* 33:154-158.

- Jenab, M., and L. U. Thompson. 2000.** Phytic acid in wheat bran affects colon morphology, cell differentiation and apoptosis. *Carcinogenesis*. 21:1547-1552.
- Jin, L. Z., Y. W. Ho, N. Abdullah, and S. Jalaludin. 2000.** Digestive and Bacterial Enzyme Activities in Broilers Fed Diets Supplemented with *Lactobacillus* Cultures. *Poultry Science*. 79:886-891.
- Kelman, Z. 1997.** PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*. 14:629-640.
- Klaassen, C. D. 2001.** Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons, 6^a ed., Mc Graw-Hill (Ed), p. 11-13.
- Kozuharov, S., D. G. Oakenfull, and G. S. Sidhu. 1986.** Navy beans and navy beans saponins lower plasma cholesterol concentrations in rats. *Proceedings Nutr Society Australia*. 11:162.
- Kuismanen, S. A., M. T. Holmberg, R. Salovaara, A. de la Chapelle, and P. Peltomaki. 2000.** Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Am J Pathol*. 156: 1773-1779.
- Lee, W. K., J. H. Lee, and Y. C. Lee. 2004.** Vitamins, Phytochemicals, Diets, and Their Implementation in Cancer Chemoprevention. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 44:437-452.
- Levitt, N. C., and I. D. Hickson. 2002.** Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. *Trends Mol Med*. 8: 179-86.
- Linde, J. A., J. Utter, R. W. Jeffery, N. Sherwood, N. P. Pronk, and R. G. Boyle. 2006.** Specific food intake, fat and fiber intake, and behavioral correlates of BMI among overweight and obese members of a managed care organization. *International J Behavioral Nutr Physical Activity*. 3:42.

- Lindström, C. G., J. E. Rosengren, and O. Ekberg. 1978.** Experimental Colonic Tumours in the Rat. *Acta Radiologica Diagnosis*. 19:799-816.
- Liu, Z., W. Ishikawa, X. Huang, H. Tomotake, J. Kayashita, H. Watanebe, and N. Kato. 2001.** A Buckwheat Protein Product Suppresses 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colon Carcinogenesis in Rats by Reducing Cell Proliferation. *J Nutr Cancer*. 1:1850-1853.
- Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, S. L. Zipursky, and J. Darnell. 2003.** *Molecular Cell Biology*, 5^a ed., W. H. Freeman and Company (Ed), p. 935-961.
- Lomanto-Díaz, L. D., O. L. Ortiz-Cala, C. O. Bretón-Pinto, A. I. Gómez-Lizcano, y V. M. Mesa-Cornejo. 2003.** El ciclo celular. *MEDUNAB*. 6:21-29.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MacDonald, R. S., J. Guo, J. Copeland, J. D. Browning, D. Sleper, G. E. Rottinghaus, and M. A. Berhow. 2005.** Environmental influences on isoflavones and saponins in soybeans and their role in colon cancer. *J Nutr*. 135:1239-1242.
- Manoj, G., B. S. Thampi, S. Leelamma, and P. V. Menon. 1993.** Dietary fiber and activity of intestinal tissue beta-glucuronidase in rats. *Nutr Res*. 13:575-582.
- Manoj, G., B. S. Thampi, S. Leelamma, and P. V. Menon. 2001.** Effect of dietary fiber on the intestinal and fecal beta-glucuronidase activity during 1,2-dimethylhydrazine induced colon cancer. *Plant Foods for Human Nutr*. 56:13-21.
- Marti del Moral, M. A., J. Moreno-Aliaga y J. Alfredo Martínez Hernández. 2003.** Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. *Nutr Hosp*. 18:181-188.

- Mathers, J. C. 2002.** Pulses and carcinogenesis: potencial for the prevention of colon, breast and other cancers. *British J Nutr.* 88:S273-S279.
- Matthews, R. 1989.** Legumes, chemistry, technology and nutrition. Marcell Dekker, Inc. (Ed), p. 389.
- Mckeown-Eyssen, G. 1994.** Epidemiology of colorectal cancer revisited: Are serum TG and/or plasma glucose associated with risk?. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 3:687-695.
- Mendelsohn, J., P. M. Howley, M. A. Israel, and L. A. Liotta. 2001.** The Molecular Basis of Cancer, 2^a ed., Saunders (Ed), p. 41-50.
- Miao, W., L. Hu, M. Kandouz and G. Batist. 2003.** Oltipraz is a bifuntional inducer activating both phase I and phase II drug-metabolizing enzymes via the xenobiótico responsive element. *Mol Farmacol.* 64:346-354.
- Milner, J. A. 2002.** Strategies for cancer prevention: the role of diet. *British J Nutr.* 87:S265-S272.
- Nakanishi, S., K. Kataoka, T. Kuwahara, and Y. Ohnishi. 2003.** Effects of High Amylose Maize Starch and *Clostridium butyricum* on Metabolism in Colonic Microbiota and Formation of Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci in the Rat Colon. *Microbiology and Immunology.* 47:951-958.
- Negrette, S. M., M. Montenegro, J. T. Borda, and A. N. Burna. 2000.** Lesiones Neoplásicas Tempranas (LNT) y Tumores del Colon Inducidos con 1,2-Dimetilhidrazina (DMH) en Ratas. Cátedra Patología General y Sistemática. Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE-Sargento Cabral 2139-(3400).
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 1995.** Programas Nacionales de Lucha Contra el Cáncer, p. 7-26

- Peralta-Zaragoza, O., M. Bahena-Román, C. E. Díaz-Benítez, y V. Madrid-Marina. 1997.** Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública.* 39:451-462.
- Piñols, F. C. 1998.** Tesis: Estudio de los cambios en la mucosa colónica de rata y cinética celular durante la carcinogénesis experimental inducida con 1,2-dimetilhidrazina. Universidad de Lleida. Lleida. España.
- Plancarte, S. R. y R. F. Mayer. 2003.** Alivio del Dolor y Cuidados Paliativos en Pacientes con Cáncer, McGraw-Hill (Ed), p. 19-39.
- Pool-Zobel, B. L., V. Selvaraju, J. Sauer, T. Kautenburger, J. Kiefer, K. K. Richter, M. Soom, and Wölfl. 2005.** Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis.* 26:1064-1076.
- Presser, K. A., D. A. Ratkowsky and T. Ross. 1997.** Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl Environ Microbiol.* 63:2355-2360.
- Pretera, T., W. D. Holtclaw, Y. Zhang, and P. Talalay. 1993.** Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci.* 90:2965-2969.
- Pretlow, II T. G., and T. P. Pretlow. 1994.** Biochemical and molecular Aspects of Selected Cancers. Vol. 2. Academic Press, Inc. (Ed), p. 47-70.
- Queiroz-Monici, K., G. Costa, N. Da Silva, S. Reis, and A. C. Oliveira. 2005.** Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starch from leguminous on the intestinal microbiota of rats. *J Nutr.* 21:602-608.
- Quezada, A. 2003.** Diagnóstico de Laboratorio. Principales Pruebas de Bioquímica Clínica y de Laboratorio. 1ª edición. Litografía e Imprenta Lehmann (Ed), p. 23-46.

- Raju, J., J. M. Patlolla, M. V. Swamy, and C. V. Rao. 2004.** Diosgenin, a Steroid Saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), Inhibits Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci Formation in F344 Rats and Induces Apoptosis in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *Cancer Epidem Biomark & Prevent.* 13:1392-1398.
- Rao, C. V., D. Chou, B. Simi, H. Ku, and B. S. Reddy. 1998.** Prevention of colonic aberrant crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffee fiber, inulin and pectin. *Carcinogenesis.* 19:1815-1819.
- Reyes-Moreno, C., and O. Paredes-López. 1993.** Hard-to-cook phenomenon in common beans. *Food Sci Nutr.* 33:227-286.
- Riddell, R. H., H. Goldman, D. F. Ransohoff, H. D. Appelman, C. M. Fenoglio, R. C. Haggitt, C. Ahren, P. Correa, S. R. Hamilton, and B. C. Morson. 1983.** Dysplasia inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol.* 14:931-968.
- Ríos-Ugalde, MC., R. Reynoso-Camacho, I. Torres-Pacheco, J. Acosta-Gallegos, A. C. Palomino-Salinas, M. Ramos-Gómez, E. González-Jasso y S. H. Guzmán-Maldonado. 2007.** Efecto del consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. En prensa.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., J. Tovar, P. Osorio-Díaz, O. Paredes-López, and L. A. Bello-Pérez. 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.
- Seidegard, J., and G. Ekström. 1997.** The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Enviromental Health Perspectivas.* 105:4:791-799.
- Serrano, J., y I. Goñi. 2004.** Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. *ALAN.* 54:1.

- Suhr, Y. 2003.** Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer.* 3:768-777.
- Teague, C. A. 1990.** *Experimental Colon Carcinogenesis*, McGraw-Hill (Ed), p. 108-123.
- Thiagarajan, D. G., M. R. Bennink, L. D. Bourquin, and F. A. Kavas. 1998.** Prevention of precancerous colonics lesions in rats by soy flakes, soy flour, genistein, and calcium. *American Society for Clinical Nutrition.* 68:1394S-1399S.
- Tran, T. T., A. Medline, W. R. Bruce. 1996.** Insulin promotion of colon tumors in rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 5:1013-1015.
- Vitolo, M. R., P. D. Campagnolo, and C. M. Gama. 2007.** Factors associated with risk of low dietary fiber intake in adolescents. *J Pediatr.* 83:47-62.
- Volate, S. R., D. M. Davenport, S. J. Muga, and M. J. Wargovich. 2005.** Modulation of Aberrant Cript Foci and Apoptosis by Dietary Herbal Supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *Carcinogenesis.* 26:1450-1456.
- Vucenik, I., and A. M. Shamsuddin. 2003.** Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP₆) and inositol: from laboratory to clinic. *American Society for Nutritional Sciences.* 133:3778S-3784S.
- Weiguang, Y., J. Fischer, G. Krewer, and C. Akoh. 2005.** Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J Agric Food Chem.* 53:7320-7329.
- Yamada, K., S. Araki, M. Tamura, I. Sakai, Y. Takahashi, H. Kashihara, and S. Kono. 1998.** Relation of serum total cholesterol, serum triglycerides and fasting plasma glucose to colorectal carcinoma *in situ*. *Intr J Epidem.* 27:794-798.

Zhao, C., M. M. Giusti, M. Malik, M. P. Moyer, and B. A. Magnuson. 2004. Effects of Commercial Anthocyanin-Rich Extracts on Colonic Cancer and Nontumorigenic Colonic Cell Growth. *J Agric Food Chem.* 52:6122-6128.

Zhang, Z., Y. Song, and L. Wang. 2005. Inositol hexaphosphate-induced enhancement of natural killer cell activity correlates with suppression of colon carcinogenesis in rats. *World J Gastroenterology* . 11:5044-5046.

10. ANEXOS

Determinación de la actividad de β -glucuronidasa

10.1.1 Reactivos

a) Buffer de fosfatos pH 7.4

8 g de NaCl

0.2 g de KCl

1.44 g de Na_2HPO_4

0.24 g de KH_2PO_4

Se disuelven en 800 ml de agua HPLC y se ajusta el pH a 7.4, una vez disuelto se afora en 1 Lt.

10.1.2 Procedimiento

1. Se pesaron 0.5 g de contenido distal y se homogeniza con un politrón en 10 ml de PBS 0.2M pH 7.0, posteriormente sonicados 6 minutos a 4° C.
2. Las muestras se centrifugan a 500 x g por 15 min. El sobrenadante se colecta y se usa inmediatamente para el ensayo enzimático.
3. Para la mezcla de reacción se toman 0.8ml de PBS 0.02M, 0.1ml de β -D-glucuronido-fenolftaleína 1mM y 0.1ml del extracto fecal. Se incuba por 1 hora a 37° C.
4. La reacción es detenida con la adición de 2.5ml de glicina alcalina, 1ml de ácido tricloroacético al 5% y 1.5ml de agua HPLC.
5. La mezcla anterior producirá el color que se leerá a los 10 minutos a 540nm.

10.2 Determinación de la actividad de GST

10.2.1 Reactivos

a) Buffer de fosfatos 0.1M y pH 6.5

Para 200 ml de Buffer de fosfatos

1.89 g de NaH_2PO_4 en 68.5 ml de agua HPLC

0.895 g de Na_2HPO_4 en 31.5 ml de agua HPLC

Adicionar 100ml para ajustar a 200 ml de volumen total

b) Stock de GSH 150 mM

6.15 mg por 1 ml de agua HPLC

c) stock de CNDB 60 mM

4.04 mg por 1 ml de etanol

A partir de los stocks se prepararon las soluciones que se agregaron a la microplaca.

d) Solución de trabajo de GSH 3 mM

140 μl del stock de GSH + 6.86 ml de buffer de fosfatos 0.1M

e) Solución de trabajo de CDNB 2 mM

300 μl del stock de CDNB + 8.7 ml de buffer de fosfatos 0.1M

10.2.2 Obtención de la fracción citosólica

1. Las muestras de tejido fueron homogenizadas en un politrón con una solución amortiguadora compuesta por:

7.9 g de Tris-HCl

2.1 g de MgCl₂

1.9 g de KCl

85.6 g de sacarosa ultra pura

Se afora a 1 Lt con agua HPLC y se ajusta el pH a 7.0

Por cada 5 g de tejido se agregaron 4 volúmenes de solución amortiguadora.

2. Las muestras ya homogenizadas se centrifugaron a 8750 g durante 20 minutos, se tomó el sobrenadante y se colocó con pipetas pasteur en tubos para ultracentrifuga.

3. Se ultracentrifugaron a 100 000 g durante 60 minutos y el citosol se almacenó en tubos eppendorf a -70° C.

10.2.3 Procedimiento

1. Descongelar en hielo los citosoles almacenados a -70° C. Diluir los citosoles de hígado (1:80) con solución amortiguadora de fosfatos.

2. Agregar 50 µl de citosol ya diluido en cada pozo.

3. Antes de la medición, adicionar 15 µl de menadiona en acetonitrilo (8.6 mg/ml) a cada 15 ml de solución amortiguadora de trabajo y una vez disuelto adicionar cada pozo 200µl de la solución amortiguadora con los cofactores y la menadiona.

4. La reacción se detiene a los 5 minutos con 50 µl de solución amortiguadora de fosfatos 0.025 mM (pH 7.4) conteniendo 20 µl de de dicumarol preparado

en NaOH 1N a una concentración de 20 mg/ml y se lee en el lector de ELISA a 610nm.

10.3 Soluciones para western blot

10.1.1 Extracción de Proteínas

a) Reactivos

HEPES 500mM

NaCl 1500mM

NaPP 100mM

Na₃VO₄ 200mM

MgCl₂ 10mM

CaCl₂ 25mM

NaF 500mM

EDTA 20mM

PMSF 60mM

Glicerol 10%

NP40 1%

b) Activación del Na₃VO₄

Se ajusta el pH a 10 de la solución de Na₃VO₄, usando NaOH 1N o HCL 1N (la solución se tornará amarilla). La solución se calienta a ebullición hasta que se torne transparente y posteriormente enfriar y reajustar el pH a 10 y repetir lo anterior hasta que la solución sea totalmente transparente y el pH estable. Finalmente se alicuota y congela.

c) Preparación del Buffer para Homogenizar

En un matraz aforado se agregaron 100 µL de solución HEPES 500mM, 100 µL de NaCl 1500mM, 100 µL de NaPP 100mM, 100 µL de MgCl₂ 10mM, 40 µL de CaCl₂ 25mM, 20 µL de NaF 500mM, 100 µL de EDTA 20mM, 66.60 µL de solución PMSF 60mM, 10 µL de solución NP40 1%, 10 µl de Na₃VO₄ 200mM y

100 μL de glicerol 10% y se completo a este caso a 1 ml con agua HPLC (el volumen deseado va a depender de las muestras a procesar). El buffer se debe mantener en hielo durante su uso.

10.1.2 Cuantificación de Proteínas

a) Curva de Calibración de Proteínas

Preparar albúmina a una concentración de 1mg/ml en un tubo eppendorf. Para la curva de calibración se sigue la siguiente tabla.

Concentración (μg)	Volumen de Albúmina (μL)	Volumen a aforar con H_2O HPLC a 800 μL (μL)
2	2	798
5	5	795
8	8	792
11	11	789
14	14	786
17	17	783
20	20	780

Al volumen total de 800 μL se le adiciona 200 μL del reactivo de Bradford y el El blanco se prepara con H_2O destilada y 200 μL del reactivo de Bradford. Para las muestras es necesario hacer una dilución de 10 μL en 3500 μL , tomar 800 μL de la dilución y agregar 200 μL del reactivo de Bradford. Después de agregar el reactivo de Bradford en todos los casos agitar en el thermolyne, dejar reposar 5 minutos. Usar celda de cuarzo y leer a una longitud de onda de 595nm en el espectrofotómetro. Realizarlo por triplicado.

10.1.3 Electroforesis SDS-PAGE

a) Reactivos

Acrilamida al 30%

bis-acrilamida al 0.938%

Tris 3M - HCl 1M – SDS 0.3%

Glicerol 79.5% (v/v)

Persulfato de Amonio al 10%

Buffer de Digestión

Mercaptoetanol

Azul de Bromofenol

Buffer Inferior

Buffer Superior

b) Gel Separador al 10%

Se mezclaron los reactivos en el siguiente orden: Acrilamida al 30%, Bis-acrilamida al 0.938%, Tris 3M – HCl 1M – SDS 0.3%, Glicerol 79.5% (v/v), H₂O HPLC, Persulfato de Amonio al 10%, y Temed; la mezcla debe realizarse a 4° C.

c) Gel de Condensación al 3%

Se mezclaron los reactivos en el siguiente orden: Acrilamida al 30%, Bis-acrilamida al 0.938%, Tris 3M – HCl 1M – SDS 0.3%, H₂O HPLC, Persulfato de Amonio al 10%, y Temed; la mezcla debe realizarse a 4° C.

d) Solución Digestora

Mezclar los reactivos en el siguiente orden: SDS 10%, Glicerol 30%, Tris 10mM pH 6.8, Mercaptoetanol 4% y Azul de Bromofenol 0.02% - 0.01%

b) Procedimiento para Electroforesis

Se limpiaron con metanol los vidrios, los separadores y los peines. Se colocó primero el vidrio grande, después los separadores y posteriormente el vidrio pequeño. Se montaron en la en la cámara para hacer geles y se llenaron de agua para verificar que no existieran fugas. El agua fue retirada y se secó el interior con papel filtro. Posteriormente se colocó el peine y se hizo una marca

medio centímetro por debajo de la base del pozo que contiene el peine, para indicar el tamaño del gel separador. Se prepararon los geles como se mencionó en el inciso b y c, primero el separador, a este se le adicionan unas gotas de buffer superior diluido 1:4 con H₂O HPLC para sellar. El gel separador solidifica aproximadamente en 20 minutos.

Ya solidificado se retira el buffer superior diluido con ayuda de papel filtro, cuidando de no tocar el gel. Posteriormente se preparó el gel de condensación y se agregó, se colocó el peine, y se marcan los pozos. Ya solidificado se lavaron los pozos con el buffer superior y se dejaron llenos con éste.

A las muestras se les agregó solución digestora y se dejaron 20 minutos a 60° C. Se cargan en el gel aproximadamente 15 - 25µl, según la concentración de tu proteína, tomando del carril 2 al 9 para evitar que la proteína corra mal o se salga del gel. Se debe colocar 4µl del marcador o estándar para verificar el peso molecular de la proteína de interés y se corrió el gel a 120 volts durante 180 minutos en frío (4° C).

10.1.4 Transferencia Semi-Seca

a) Reactivos

Buffer de transferencia

Solución para teñir membrana

Solución para desteñir membrana 1

Solución para desteñir membrana 2

b) Procedimiento

Se despegó el gel una vez terminada la electroforesis y se marcó del lado del marcador de peso molecular haciendo un corte en la parte superior derecha. Se hicieron dos lavados de 10 minutos cada uno en buffer de transferencia. En el intermedio de los lavados se cortó y activó la membrana colocándola unos

segundos en metanol y después en agua HPLC. La membrana activada se coloca en buffer de transferencia durante 10 minutos. Terminados los lavados del gel y la membrana se colocaron de la siguiente forma en la cámara de transferencia:

- 1) Tres papeles filtro humedecidos con buffer de transferencia
- 2) Membrana
- 3) Gel
- 4) Tres papeles filtro humedecidos con buffer de transferencia

Fue importante que entre capa y capa se eliminaran las burbujas con ayuda de una pipeta pasteur haciéndola rodar sobre la superficie sin presionar demasiado, además se limpió el líquido excedente de la cámara de transferencia, se cerro y programo la fuente de poder a 15 volts durante 20 minutos. Al terminar la membrana se marcó de la misma forma que el gel y fue teñida con rojo de ponsuo.

10.1.5 Western Blot

a) Reactivos

Tris-HCl pH 8 1M

TBS

TTBS

Solución bloqueadora

Solución de Quimioluminiscencia

a) Procedimiento

Se activó la membrana unos segundos en metanol y luego se lava con agua HPLC. Las membranas fueron bloqueadas con solución bloqueadora al 10% durante toda la noche en refrigeración, posteriormente fue incubada con el primer anticuerpo de 3 horas a temperatura ambiente con agitación a 50 rpm. Al

término de la incubación se realizaron 6 lavados con TTBS de 5 minutos cada uno y 2 de 10 minutos cada uno. Finalmente se realizaron 2 lavados con solución bloqueadora al 5% de 10 minutos cada uno. Después de estos lavados se realizó la incubación con el segundo anticuerpo por 1 hora a temperatura ambiente con agitación a 50 rpm, de igual forma se realizaron posteriormente 6 lavados con TTBS de 5 minutos cada uno y 2 de 10 minutos cada uno. Antes del último lavado se preparó la solución de quimioluminiscencia.

Para revelar se preparó la membrana de la siguiente forma:

- Sobre el cassette se colocó una bolsa de plástico y sobre de ella la membrana, la bolsa de plástico fue pegada al cassette con cinta adhesiva para evitar que se moviera.

- Se agregó la solución de quimioluminiscencia con una pipeta de 1000 μ L en toda la membrana y se movió el cassette para asegurar que toda la membrana quedara impregnada de la solución.

- La membrana se cubrió con la otra parte de la bolsa cuidando de no dejar burbujas y de no mover la membrana.

- Se cortó la película con luz roja para evitar que se velara y se le realiza un corte en la parte superior derecha, finalmente se colocó la película sobre la bolsa cubriendo la membrana y se ceró el cassette.

- Después de transcurrir 15 minutos se abrió el cassette y se sacó la película, con luz roja. Sin soltar la película se colocó en la solución reveladora por unos segundos hasta que se observaron las bandas, después se enjuagó con agua y se pasa a la solución fijadora por 60 segundos, finalmente se lava con agua.