



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE DIFERENTES VARIEDADES DE FRIJOL
COMÚN (*Phaseolus vulgaris*) SOBRE LAS MUTACIONES
DEL GEN *K-RAS* EN LAS LESIONES DE COLON DE RATAS
TRATADAS CON EL CARCINÓGENO DIMETILHIDRACINA”**

TESIS

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

PRESENTA

BERENICE SALAZAR MARTÍNEZ

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALIA REYNOSO CAMACHO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2006.

BIBLIOTECA CENTRAL UAQ

No. Adq. H71620

No. Título _____

Clas. TS

633.33

Sible



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTO DE DIFERENTES VARIEDADES DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris*) SOBRE LAS MUTACIONES DEL GEN K-RAS EN LAS LESIONES DE COLON DE RATAS TRATADAS CON EL CARCINÓGENO DIMETILHIDRACINA”

TESIS

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

PRESENTA

BERENICE SALAZAR MARTÍNEZ

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALIA REYNOSO CAMACHO

SINODALES

Dra. ROSALIA REYNOSO CAMACHO.
DIRECTOR

Dra. MINERVA RAMOS GOMEZ.
SINODAL

Dra. LAURA C. BERÚMEN SEGURA
SINODAL

Q.B. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ.
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Generalidades del cáncer	3
II.2 Células cancerosas y ciclo celular	4
II.3 Clasificación de genes involucrados en el cáncer	5
II.3.1 Oncogen <i>ras</i>	7
II.3.2 Participación de <i>ras</i> en la transducción de señales extracelulares	9
II.4 Genética del cáncer de colon	11
II.4.1 Cáncer de colon y <i>k-ras</i>	13
II.4.2 Marcadores moleculares en el diagnóstico del cáncer	13
II.4.3 Factores nutrimentales en el cáncer de colon	13
II.5 Frijol	14
II.5.1 Características del frijol	14
II.5.2 Composición del frijol	14
II.5.3 El frijol como protector contra el cáncer	16
II.6 Modelos animales de cáncer de colon	16
II.6.1 Etapas de la carcinogénesis por inducción química	17
II.7 Técnicas para medir expresión y mutaciones genéticas	18
II.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa	18
II.7.2 Detección de mutaciones puntuales	18

Contenido	Página
II.7.3 Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (SSCP)	19
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVOS	22
IV.1 General	22
IV.2 Específicos	22
V. METODOLOGÍA	23
V.1 Materiales	23
V.1.1 Material Biológico	23
V.1.2 Compuestos químicos	23
V.2 Métodos	24
V.2.1 Determinación de compuestos fenólicos totales	24
V.2.1.1 Curva de calibración	24
V.2.1.2 Cuantificación en muestras de harinas de frijol	25
V.2.2 Elaboración de dietas	25
V.2.3 Preparación del carcinógeno Dimetilhidracina (DMH)	25
V.2.4 Inducción del cáncer de colon	26
V.2.5 Sacrificio	26
V.2.6 Análisis macroscópico	26
V.2.7 Extracción de ADN	26
V.2.7.1 Extracción de ADN. Primera etapa	26
V.2.7.2 Extracción de ADN. Segunda etapa	27
V.2.8 Cuantificación de ADN	27
V.2.9 Reacción en cadena de la polimerasa	28
V.2.10 Polimorfismo conformacional de cadena sencilla	28
V.2.11 Western Blot	30
VI. RESULTADOS	32
VII. DISCUSIONES	40
VIII. CONCLUSIONES	43

IX. BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXOS	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Algunas anomalías genéticas detectadas en células de cáncer de colon	12
2	Composición del frijol	15
3	Modelos animales en la carcinogénesis química	17
4	Condiciones para realizar la amplificación del ADN	28
5	Condiciones para realizar el Polimorfismo conformacional de cadena sencilla	29
6	Multiplicidad y número promedio de tumores presentados en animales tratados con diferentes variedades de frijol y el carcinógeno Dimetilhidracina	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo celular	4
2	Clasificación de los oncogenes atendiendo al papel que desarrollan en la célula	6
3	Esquema de los factores que interviene en la activación y desactivación de las proteínas Ras	8
4	Hipótesis de la hidrólisis del GTP	9
5	Esquema de la cascada de transducción de señales en las que participa Ras	10
6	Concentraciones de compuestos fenólicos en las harinas de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>) cocido	33
7	Producto de PCR del gen <i>k-ras</i> de muestras de animales tratados con Dimetilhidracina	35
8	Efecto del frijol Negro 8025 sobre el gen <i>k-ras</i>	37
9	Efecto del frijol Pinto Zapata sobre el gen <i>k-ras</i>	38
10	Western Blot para muestras tratadas con diferentes variedades de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	39

RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una fuente importante de sustancias antioxidantes, tales como las antocianinas y proantocianidinas o taninos condensados, dichos compuestos poseen actividad antimutagénica y están relacionados con la modulación negativa del oncogen *k-ras*. Cabe mencionar que la concentración de estos compuestos es dependiente de la variedad de frijol y que este parámetro podría afectar la respuesta protectora contra ciertos tipos de cáncer. Con base en lo anterior el objetivo de esta investigación es evaluar el efecto de diferentes variedades de frijol sobre las mutaciones del gen *k-ras* en cáncer de colon inducido con dimetilhidracina.

La harina de frijol cocido fue analizada en cuanto a su concentración de compuestos fenólicos. Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratas Sprague Dawley, las cuales fueron alimentadas con el frijol Pinto Zapata, Negro 8025 y Marcela incorporado en la dieta antes (4 semanas), durante (8 semanas) y después (12 semanas) del tratamiento con el carcinógeno. Al finalizar el tratamiento los animales se sacrificaron y las lesiones fueron analizadas para determinar la multiplicidad, el número promedio de tumores y el volumen. Así mismo, se extrajo el DNA y se amplificó el gen *k-ras* mediante la técnica de PCR, dicho producto fue analizado para identificar mutaciones mediante la técnica de SSCP (polimorfismo conformacional de cadena sencilla). La expresión de la proteína K-ras se analizó por la técnica de Western blot.

El frijol negro mostró el contenido más alto de compuestos fenólicos (1.358 ± 0.016) comparado con el frijol Pinto Zapata (0.082 ± 0.018) y el frijol Marcela (0.744 ± 0.010). De las variedades evaluadas que se probaron en nuestro experimento, la especie que proporciona una mayor protección es Pinto Zapata con una incidencia del 67%, seguido de Negro 8025 con un 75% y finalmente Marcela con 100%. El número promedio de tumores fue de 1.00 ± 0.33 , 1.00 ± 0.30 y 2.29 ± 0.31 respectivamente.

En base a la técnica de SSCP las lesiones de los controles positivo mostraron mutaciones de *k-ras*, mientras que las lesiones de los animales tratados con frijol presentan una disminución de estas mutaciones en un 71% para Negro 8025 y del 80% para Pinto Zapata. Así mismo esto correlacionó con una menor expresión de la proteína.

Estos resultados sugieren que posiblemente los compuestos fenólicos del frijol Negro 8025 pudieran estar relacionados con la capacidad protectora presentada por dicha leguminosa. Sin embargo, el frijol Pinto Zapata contiene menor concentración de estos compuestos, por lo que la actividad observada podría atribuirse a un compuesto de naturaleza distinta o a algún compuesto fenólico presente en mayor concentración comparado con el Negro 8025. Uno de los mecanismos propuestos para la regulación del proceso de carcinogénesis en frijol es la disminución de las alteraciones del protooncogen *k-ras*.

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer llegó a ser una causa importante de muerte hasta el siglo XX. Antes de 1900, las neoplasias eran muy raras y representaban un pequeño porcentaje de las defunciones. En esa época la mayoría de las muertes eran debidas a enfermedades infecciosas. En países desarrollados, debido a una mejoría en las condiciones sanitarias, alimenticias y de higiene personal, así como al desarrollo de vacunas y antibióticos, las enfermedades infecciosas ya han sido prácticamente eliminadas como una causa mayor de defunción, mientras que las principales causas de muerte son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer.

La mayoría de los cánceres se inician durante la vida de una persona, es decir, no son hereditarios. Son iniciados por agentes medioambientales (compuestos químicos, radiaciones, virus), los cuales provocan una mutación en algún oncogén o antioncogén que permite ciertas ventajas en el crecimiento celular.

El cáncer colorrectal presenta una mayor prevalencia en los países que tienen una dieta de tipo occidental, no parece que las diferencias genéticas entre las poblaciones tenga gran importancia en ese aspecto. Estudios epidemiológicos indican que el 50% de los cánceres que aparecen a partir de los 70 años tienen localización colorrectal. Las causas que dan lugar al incremento de riesgo de padecimiento de este tipo de cáncer no están bien establecidas, pero se ha incluido en ellas el excesivo consumo de grasa animal y carne, así como la falta de ingesta de alimentos vegetales ricos en fibra. Durante los 70's, la población mexicana presentaba una menor incidencia de este tipo de cáncer, lo cual correlaciona con un mayor consumo de fibra como parte de la dieta tradicional, dada básicamente por la tortilla y el frijol.

Existen fuertes evidencias que demuestran que el frijol juega un papel muy importante en la prevención de ciertos tipos de cáncer, dentro de los componentes más relacionados con dicho efecto se encuentran los flavonoides y la fibra. El consumo de fibra dietaria se ha asociado con la prevención de tumores del sistema digestivo, principalmente cáncer de colon y en menor grado cáncer de estómago y recto. Los flavonoides son otros constituyentes del frijol con capacidad

quimioprotectora, los cuales protegen regulando vías de señalización de factores de crecimiento.

II. ANTECEDENTES

II.1 Generalidades del cáncer

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza fundamentalmente por una proliferación celular descontrolada; las células cancerosas forman tumores malignos que invaden tejidos vecinos y, posteriormente, pueden colonizar tejidos distantes mediante el proceso de metástasis, ésto lleva a la destrucción de órganos vitales.

El cáncer se origina cuando las células mutadas proliferan sin control y son capaces de inhibir sus mecanismos normales de apoptosis. Tanto la proliferación, el ciclo celular y la apoptosis son controlados por diversos genes que se activan o inactivan durante el desarrollo de un tumor maligno o neoplasia. Generalmente el cáncer es iniciado por agentes medioambientales que causan mutaciones en oncogenes, genes supresores de tumores e incluso genes involucrados en reparación del daño al ADN.

En etapas sucesivas del cáncer se alteran y/o desarreglan transcripcionalmente genes relacionados con el ciclo celular, inmortalización, estabilidad genómica, crecimiento, apoptosis, invasión, angiogénesis y metástasis. Es decir, durante las etapas múltiples participan varios genes que van otorgando gradualmente a la célula ventajas selectivas en su crecimiento respecto a otras células (Gariglio y Orozco, 2000).

Las células de un tumor se originan de una ancestral común, que en algún momento, generalmente décadas antes de que el tumor se manifieste, inició un programa de división indebido (Ríos y Hernández, 2001).

Cada etapa histopatológica en el desarrollo de un carcinoma requiere de varios años y el proceso total entre la lesión inicial y la aparición del tumor puede tomar 20-30 años, dependiendo del tipo de cáncer, aumentando con la edad el riesgo para contraer la mayoría de las neoplasias (Peralta-Zaragoza y col., 1997; Gariglio y Orozco, 2000).

II.2 Células cancerosas y ciclo celular

La reproducción celular está supervisada por determinados sistemas de control extremadamente rigurosos. Para que una célula se divida en 2 células hijas idénticas es necesaria la participación de una gran cantidad de moléculas como proteínas, enzimas, factores de crecimiento y genes que se activan e inactivan con una gran precisión. En las células normales, existe un control de las señales reguladoras del crecimiento recibidas por la célula y decide si ésta debe o no pasar a través de su ciclo de vida (Peralta-Zaragoza y col., 1997).

La célula cancerosa difiere notablemente de una célula normal en los mecanismos que bloquean el avance del ciclo celular, es decir, en la serie de eventos coordinados que involucran períodos sucesivos de replicación del ADN y de división celular. En el ciclo celular podemos distinguir la fase G_1 entre la mitosis (Fase M) y la replicación del ADN (Fase S); posteriormente a la fase de síntesis de ADN, tenemos la fase G_2 y finalmente la fase M (Figura 1) (Menéndez y Ríos, 1999).

Generalmente en la fase G_1 las células detienen su proliferación y se retiran del ciclo celular; estas células, ahora en fase G_0 , pueden iniciar el proceso de diferenciación celular, lo anterior puede inducirse en células normales carentes de factores de crecimiento; por el contrario, las células transformadas no entran a la fase G_0 cuando se eliminan factores de crecimiento.



Figura 1. Ciclo celular (Menéndez y Ríos, 1999).

El funcionamiento correcto de los procesos de ciclo celular requiere de cambios en complejos enzimáticos, entre los que se encuentran las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y los complejos que se forman entre ambas (CDK-ciclina). Las cinasas son enzimas que realizan la fosforilación de proteínas y este evento es de gran importancia para la regulación del ciclo celular. Los complejos CDK-ciclina dirigen a la célula de una fase a otra del ciclo celular.

Cuando existe algún daño genético, los mecanismos de control transcripcional de los complejos CDK-ciclina inducen la interrupción del ciclo celular hasta que el daño se corrige. Los factores de crecimiento activan la expresión de ciclinas necesarias para la transición entre G₁ y S (Peralta-Zaragoza y col., 1997).

II.3 Clasificación de genes involucrados en el cáncer

Cada vez es más aceptado que el cáncer se desarrolla por un proceso evolutivo que está conducido por mutaciones de genes celulares seguido de selección clonal de la progenie variante presentando propiedad de crecimiento cada vez más agresivas. Estas mutaciones afectan a protooncogenes y a genes supresores de tumores. También pueden afectar a genes que participan en la reparación del ADN, así como a los genes que participan en la activación y en la detoxificación de compuestos precancerígenos. La inactivación de los genes de reparación del ADN probablemente no afecta en forma directa los procesos que controlan el crecimiento celular, pero puede llevar a un aumento en la velocidad de mutación en distintos genes incluyendo protooncogenes y antioncogenes. Es decir, la inactivación de genes de reparación del ADN acelera el proceso de progresión tumoral.

Los protooncogenes son los genes celulares que controlan los procesos de proliferación y diferenciación. La ocurrencia de mutaciones en éstos puede resultar en variantes alteradas u oncogenes que codifican para proteínas que desencadenan señales positivas de proliferación que mantienen a la célula estimulada para pasar de una mitosis a otra. Los protooncogenes dirigen la producción de proteínas como ciclinas, factores de crecimiento, receptores que estimulan la proliferación celular, etc. (Figura 2). Cuando éstos mutan se

transforman en oncogenes. Algunos de estos oncogenes forzan la maquinaria celular para que sintetice de forma masiva determinados factores de crecimiento (Ríos y Hernández, 2001).

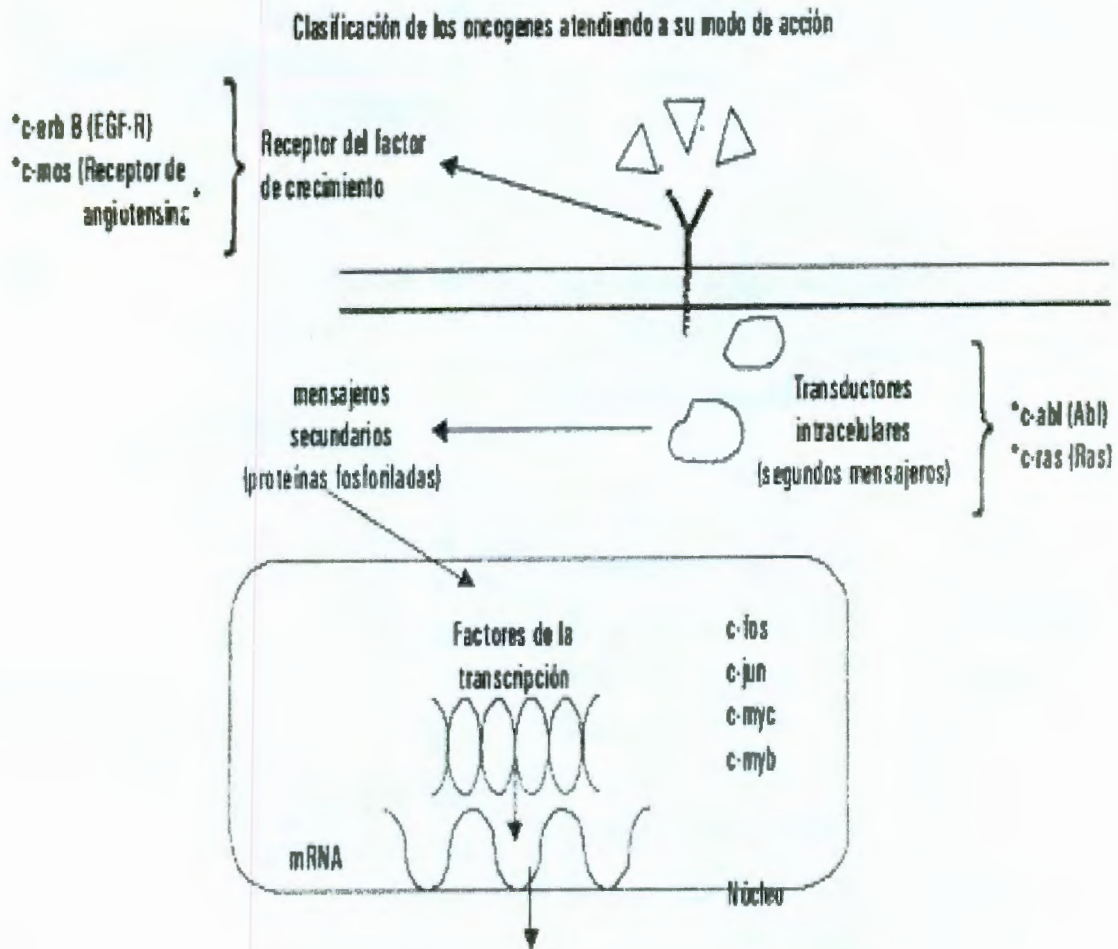


Figura 2. Clasificación de los oncogenes atendiendo el papel que desarrollan en la célula. Los productos de los oncogenes pueden actuar a nivel extracelular (factores de crecimiento), a nivel de membrana (receptores de membrana) y a nivel intracelular (receptores citosólicos, segundos mensajeros y factores nucleares) (Menéndez y Ríos, 1999).

Por otro lado, los genes supresores de tumores en el organismo sano controlan la proliferación celular. Ellos son reguladores negativos de crecimiento y cuando no están presentes en la célula o se encuentran inactivos a causa de mutaciones, las células dejan de crecer normalmente y adquieren propiedades proliferativas anormales, características de las células tumorales (Ríos y Hernández, 2001).

II.3.1 Oncogen *ras*

Los protooncogenes pueden ser activados por mutaciones puntuales como es el caso del oncogen *ras*. En su estado normal codifica para una familia de proteínas de 21 kD aproximadamente, conocidas colectivamente como p21^{ras} y que juegan un papel importante en el proceso de transmisión de señales en la célula, cuyo resultado pueden ser cambios en el fenotipo celular, el cual varía de división a diferenciación (Menéndez y Ríos, 1999).

En los humanos existen tres genes *ras* funcionales: *H-ras-1*, *K-ras-2* y *N-ras*, existen además dos pseudogenes: *H-ras-2* y *K-ras-1*. Los genes *ras* codifican proteínas conservadas que pertenecen a una familia extensa de GTPasas, la llamada familia de las proteínas G, y que funcionan como componentes críticos en cascadas de transducción de señales iniciadas por diversos factores de crecimiento y de diferenciación.

El recambio entre las formas activas e inactivas de *ras* se encuentra regulado principalmente por tres diferentes clases de factores: proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) e inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs). La activación de *ras* involucra el intercambio de GDP por GTP, el cual está dado por los GEFs, entre los que se encuentra Sos (Figura 3) (Santana y García-Carranca, 1997).

Las proteínas Ras adquieren la capacidad de inducir la transformación celular por el cambio de uno sólo de sus aminoácidos. Las mutaciones transformantes de estos genes ocurren principalmente en los codones 12, 13, 59 o 61, siendo las de los codones 12 y 61 las que se encuentran con mayor frecuencia en los tumores humanos. Los modelos actuales suponen que las proteínas Ras traducen sus

señales independientemente de las hidrólisis del GTP. Es decir, que dado que el flujo de señales no requiere de la hidrólisis del GTP, las formas oncogénicas de *ras* que no hidrolizan GTP y por ello están permanentemente activas, traducen señales de manera continua (Figura 4).

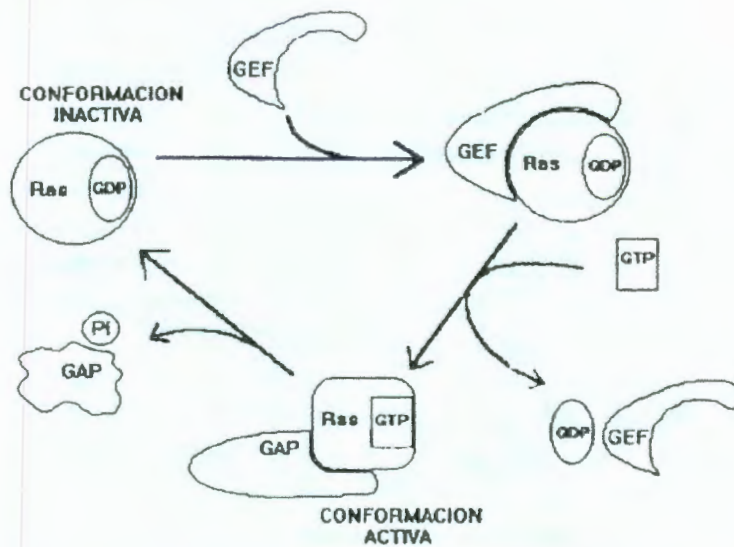


Figura 3. Esquema de los factores que intervienen en la activación e inactivación de las proteínas Ras. Los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) provocan el recambio de GDP a GTP, activando así la proteína Ras. Las proteínas activadoras de GTPasa (GAPs) favorecen la hidrólisis de GTP, regresando a Ras a su forma inactiva (Santana y García-Carranca, 1997).

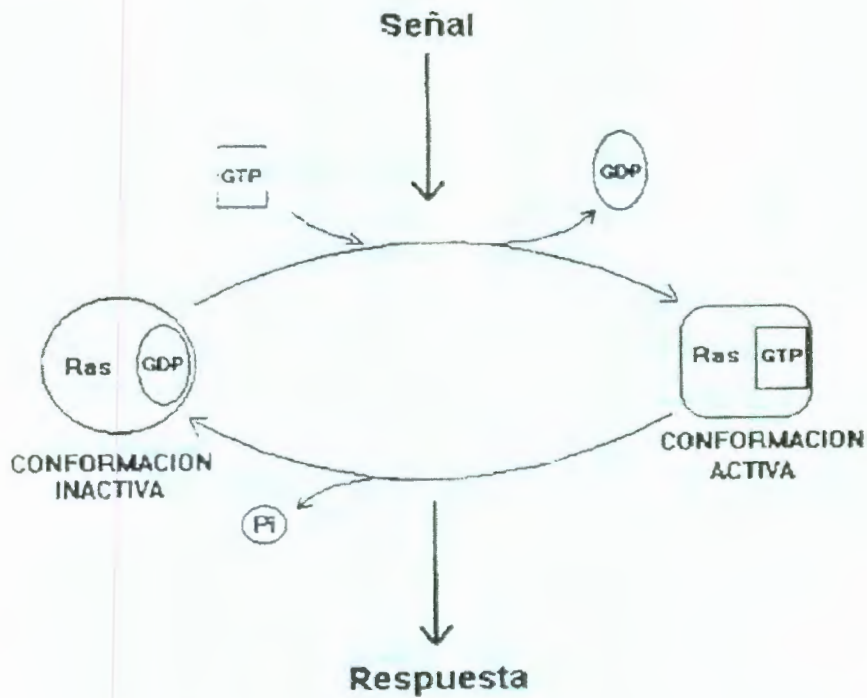


Figura 4. Modelo que ilustra la hipótesis de que la hidrólisis del GTP acompaña la transducción de las señales (Santana y García-Carranca, 1997).

II.3.2 Participación de Ras en la transducción de señales extracelulares

Las proteínas Ras funcionan como componentes críticos en cascadas de transducción de señales iniciadas por la estimulación de diversos receptores.

Cuando las células son estimuladas por diversos factores, el complejo Grb2/Sos que está presente en el citosol en células no estimuladas se une al receptor activado a través de Grb2, esto produce un acercamiento de Sos a la membrana plasmática que a su vez activa a Ras al promover el intercambio de GDP por GTP. Una vez que Ras ha sido activado por Sos, éste interacciona con una cinasa de serina/treonina llamada Raf, la cual a su vez fosforila y activa a la cinasa de la MAP cinasa también conocida como MEK. MEK fosforila residuos de treonina y tirosina de la cinasa MAP cinasa (MAPK), activando así también su función de cinasa. Esta última proteína, también conocida como ERK (cinasa regulada por señales

extracelulares) activa a enzimas como la cinasa de serina/treonina p90^{rsk} y la fosfolipasa A2, y se introduce al núcleo donde fosforila factores de transcripción como c-Myc, Elk-1 y c-Jun (DeVita y col., 2000).

Además de Raf, se sabe que las proteínas GAP y la cinasa de 3-fosfatidilinositol (PI3K) son también moléculas efectoras de Ras. Así mismo, las proteínas de la familia Rho/Rac son reguladas por Ras a través de las proteínas reguladoras GEFs y GAPs (Figura5).

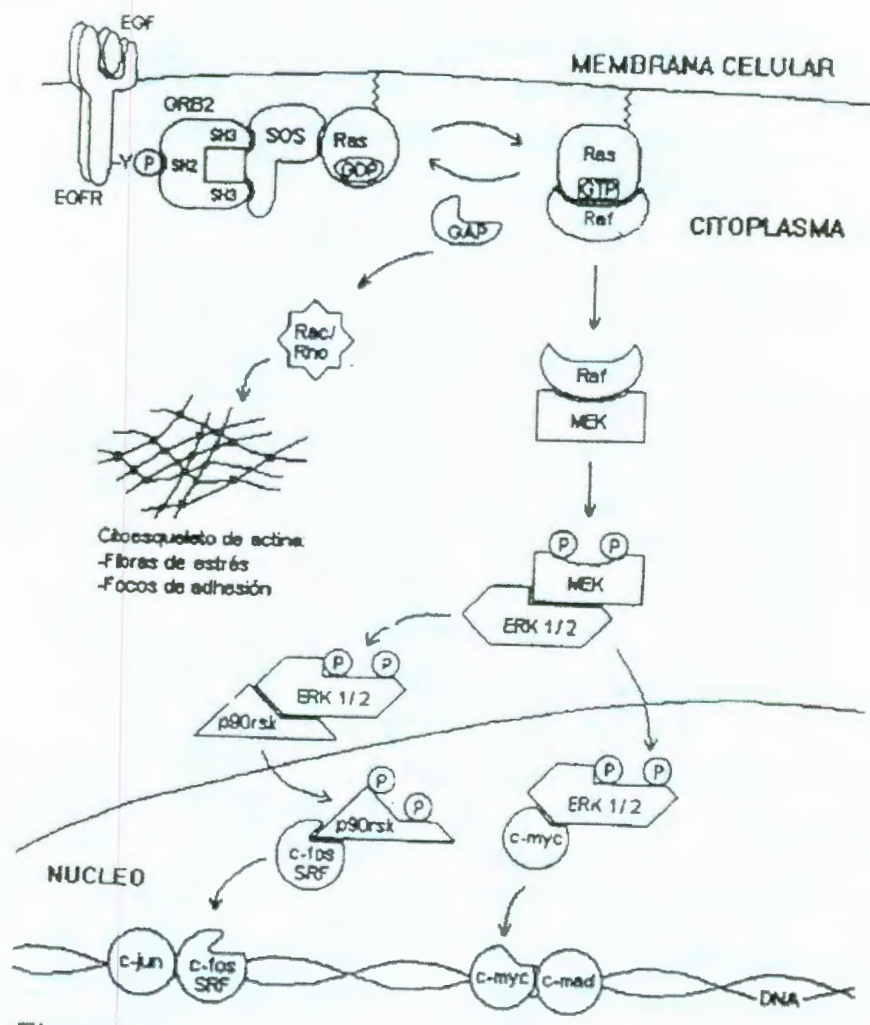


Figura 5. Esquema de la cascada de transducción de señales en la que participa Ras (Santana y García-Carranca, 1997).

II.4 Genética de cáncer de colon

En el cáncer de colon las mutaciones y/o alteraciones génicas encontradas son múltiples y su aparición no puede relacionarse sólo con una.

El cáncer de colon es el resultado de un desbalance entre dos procesos que controlan el ciclo celular: la replicación celular y la apoptosis. La primera de ellas promueve el desarrollo incontrolado de células neoplásicas; la segunda al estar inhibida, tiene como consecuencia la permanencia de la célula mutada. Actualmente se ha profundizado en el conocimiento de alguno de estos procesos y cómo la aparición de mutaciones en los genes que los controlan o el aumento de su expresión, está relacionado con la inducción de cáncer (Carretero y col., 2001).

En la actualidad se acepta la existencia de tres vías distintas que conducen a la aparición de cáncer de colon. Dos de ellas tienen un componente familiar hereditario plenamente establecido y son el síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no polipoideo (CCHNP) que es la vía mutadora mediada por la mutación de genes reparadores y la vía supresora mediada por el gen supresor APC de la poliposis múltiple familiar (PAF). La tercera no se ha podido relacionar con mecanismos de transmisión hereditaria y sería el cáncer colorrectal esporádico.

El conjunto de cánceres hereditarios representa menos del 15% de los cánceres de colon y recto, siendo el tipo APC menor del 2%. Las investigaciones realizadas hasta el momento se han llevado a cabo en distintas direcciones y ello ha permitido relacionar las mutaciones detectadas con las distintas fases de proceso evolutivo del cáncer colorrectal (Abad y col., 2003).

Determinadas mutaciones se han relacionado con el riesgo de padecer cáncer colorrectal, otras con la evolución de adenoma a carcinoma, con el pronóstico, con el riesgo de metástasis y la malignidad del proceso, incluso con la localización del tumor (Carretero y col., 2001).

Fearon y Vogelstein (1990) han propuesto un modelo genético para explicar el desarrollo del cáncer colon-rectal. Las características principales de este modelo son las siguientes: 1) se requieren varios pasos, lo cual está de acuerdo con una serie de conocimientos que indican que el cáncer es un proceso de etapas

múltiples. 2) interviene una serie de mutaciones de genes supresores de tumores en los cromosomas 5, 18 y 17. 3) también participa la mutación y activación consecuente del oncogen *ras* en el cromosoma 12.3; por lo tanto, por lo menos cuatro genes, y es probable que 5 o 6, están implicados. 4) se afectan más genes de supresión de tumores que oncogenes. El orden preciso de cambios no es tan importante como la acumulación de estos. 5) son necesarias mutaciones adicionales para permitir la dispersión y metástasis. Es probable que en otras neoplasias el espectro de oncogenes y de genes supresores de tumor afectados difiera de los implicados en este modelo. Se espera que los hallazgos anteriores sean útiles en términos de prevención, diagnóstico, predicción del pronóstico y tratamiento (Ríos y Hernández, 2001).

Cuadro 1. Algunas anomalías genéticas detectadas en células de cáncer de colon

<i>Gen</i>	Cromosoma	Tumores con mutaciones (%)	Clase
<i>k-ras</i>	12	~50	Oncogén
<i>neu</i>	17	2	Oncogén
<i>myc</i>	8	2	Oncogén
<i>APC</i> (poliposis coli adenomatosa)	5	>70	Supresor de tumores
<i>DCC</i> (deleccionado en carcinoma de colon)	17	>70	Supresor de tumores
<i>p53</i>	17	>70	Supresor de tumores
<i>HNPCC</i> (cáncer colorectal hereditario no polipoide)	2	~15	Supresor de tumores

(Abad y col., 2003)

II.4.1 Cáncer de colon y *k-ras*

Las mutaciones del oncogen *k-ras* son de relevante importancia en el desarrollo del carácter invasivo del cáncer de colon e imprimen además distintos grados de agresividad al tumor (Abad y col., 2003).

El oncogen *k-ras* es una de las alteraciones genéticas más comunes en el cáncer de colon y el 85 % de los tumores presenta cambio en los codones 12 (TGT) y 13 (GAC) de este oncogen. Algunos estudios han demostrado diferencias significativas entre las mutaciones en general o tipos específicos de mutaciones en *k-ras* y el estado del tumor, supervivencia y otras variables clínicas (Samowitz y col., 1999).

Además, *k-ras* es observable en las formas polipoideas de cáncer de colon. Esta mutación se observa en el 55% de los adenocarcinomas y sólo en el 27% de los adenomas (Carretero y col., 2001).

II.4.2 Marcadores moleculares en el diagnóstico del cáncer

Una variedad de secuencias de nucleótidos de ADN y ARN pueden servir como marcadores para el diagnóstico del cáncer mediante genética molecular. La mayoría de estos marcadores directa o indirectamente representan alteraciones en el DNA, que distinguen las células malignas de las células normales. Estos marcadores pueden estar relacionados como causa del cáncer o como modificaciones en las secuencias de los ácidos nucleicos que son adquiridas durante la progresión del tumor. Además, las secuencias de los ácidos nucleicos que marcan la célula progenitora normal de la cual surge el tumor pueden también ser de ayuda diagnóstica en algunos tipos de cáncer. El principio fundamental se basa en el uso de marcadores de los ácidos nucleicos para el diagnóstico del cáncer, ya que el cáncer es un proceso clonal (DeVita y col., 2000).

II.4.3 Factores nutrimentales en el cáncer de colon

Estudios epidemiológicos indican una mayor incidencia de cáncer de colon en países que realizan una dieta con gran consumo de carne, grasa animal e hidratos de carbono y pobre en fibra. El efecto de la fibra dietética sobre la incidencia de cáncer de colon es objeto de gran controversia. Los resultados contradictorios

pueden deberse en parte a que se trata de un grupo muy heterogéneo de compuestos indigestibles. Así las fibras insolubles, como el salvado, sufrirán pocos cambios en su paso por el colon, mientras que las solubles como la pectina, se degradan a ácidos grasos de cadena corta. Aunque la fibra soluble puede ejercer un efecto protector a través del n-butirato, es la insoluble la más eficaz en reducir la carcinogénesis (Casimiro, 2002).

En líneas celulares de cáncer de colon el n-butirato ha mostrado inhibición en crecimiento y diferenciación, además de inducción de la apoptosis (Henningsson y col., 2001).

Dentro de los alimentos a los cuales se les ha atribuido una capacidad quimioprotectora contra cáncer de colon se encuentra el frijol (Casimiro, 2002).

II.5 Frijol

II.5.1 Características del frijol

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es una planta originaria de América y es una de las más importantes fuentes de proteínas para la población mexicana (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998).

En nuestro país, después del maíz, el frijol (*Phaseolus vulgaris*) es considerado la principal fuente de proteína para un porcentaje alto de la población, sobre todo en las áreas rurales. El 70% de la producción nacional se obtiene de áreas temporales. Su cultivo se realiza en los 32 estados de la República, sin embargo los estados de Zacatecas, Durango, Sinaloa y Chihuahua concentran el 63% de toda la superficie sembrada y el 65% de la producción nacional (SAGARPA, 2003).

II.5.2 Composición del frijol

El frijol (*Phaseolus vulgaris*), además de ser una buena fuente de proteínas, carbohidratos y rico en fibra dietética tanto soluble como insoluble se le considera una buena fuente de vitaminas, así como algunos minerales y grasas no saturadas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición del frijol (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998)

COMPONENTE	COMPOSICIÓN
Proteína	16-33
Fibra dietética (%)	
Frijol crudo	
Fibra insoluble	0.1-13.1
Fibra soluble	3.3-7.6
Frijol cocinado	
Fibra insoluble	13.4-22.9
Fibra soluble	3.1-7.0
Ácidos grasos (g/100g)	
Linoleico	21-28
Linolenico	37-54
Vitaminas (mg/100g)	
Ácido fólico	0.17-0.59
Niacina	1.16-2.68
Riboflavina	0.14-0.27
Tiamina	0.9-1.2
Oligosacaridos (g/100g)	
Rafinosa	0.19-0.22
Estaquiosa	1.84-2.45
Ácido fítico (mg/g)	22-28
Taninos (mg cat. eq/mg)	9.6-13.14
Inhibidores de tripsina (TIU7g)	13-29

II.5.3 El frijol como protector contra el cáncer

Estudios epidemiológicos muestran una baja incidencia de cáncer de colon en países latinoamericanos donde el consumo del frijol es alto. El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una buena fuente de fibra y de fitoquímicos que se han relacionado fuertemente con un bajo riesgo de padecer cáncer de colon. Además se ha puesto un gran interés en la relación fibra dietaria-cáncer de colon desde que Burkitt (1971) presentó la hipótesis de un rol preventivo de la fibra dietaria (Hughes y col., 1997).

El rol de la dieta en la etiología de ciertos cánceres tiene un buen reconocimiento y se ha prestado mucha atención a potenciales factores protectores presentes en los alimentos.

Una dieta basada en vegetales y particularmente en granos, leguminosas y frutas, se ha asociado con una baja incidencia de cáncer principalmente el de mama y colon (Davies, 2000).

El consumo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) se ha relacionado con la reducción del riesgo de cáncer de colon, diabetes, obesidad y algunas enfermedades coronarias (Geil y Anderson, 1994; Hughes y col., 1997; Sandberg 2000; Bourdon y col., 2001). Los efectos fisiológicos por el consumo de frijol (*Phaseolus vulgaris*), pueden deberse a la presencia de fitoquímicos incluidos los polifenoles, que poseen capacidad antimutagénica y anticarcinogénica (Cardador-Martínez y col., 2002; Aparicio-Fernández y col., 2005).

En México, el consumo de frijol y maíz han sido parte de la dieta tradicional por cientos de años (Guzmán-Maldonado y Paredes-López 1998), con un consumo *per capita* de aproximadamente 19.5 Kg por año (Castellanos y col., 1997).

II.6 Modelos animales de cáncer de colon

Prácticamente todos los tipos de cánceres humanos pueden reproducirse en animales de experimentación por exposición a carcinógenos químicos específicos (Cuadro 3).

Los modelos animales han demostrado la similitud de la interacción entre los carcinógenos y el huésped en distintas especies de mamíferos mediante la reproducción de cánceres específicos de un órgano en animales con compuestos químicos que son carcinógenos humanos demostrados (DeVita y col., 2000).

Cuadro 3. Modelos animales en la carcinogénesis de colon por inducción química

ÓRGANO	COLON
Especies	Rata, Ratón
Agentes	Aminas heterocíclicas Nitrosaminas Dimetilhidrazina
Tipo de tumor	Pólipos adenomatosos Adenocarcinomas
Modificadores	Dieta con alto contenido en lípidos, sales biliares, calcio, aspirina, vitamina D3.
Cambios genéticos asociados	Mutaciones en <i>k-ras</i>

(DeVita y col., 2000)

II.6.1 Etapas de la carcinogénesis por inducción química

La mayoría de los cánceres humanos y los inducidos experimentalmente con sustancias químicas aparecen en el epitelio, donde las células diana suelen organizarse en una estructura estratificada o pseudoestratificada. Para volverse autónomas, las células cancerosas tienen que superar los obstáculos impuestos por la organización del tejido y los procesos de regulación, como el control hormonal y la apoptosis. La carcinogénesis suele iniciarse por mutaciones en una única célula. Una vez que el clon se expande, las células iniciales forman una lesión premaligna, que suele ser un tumor primario como un adenoma, pero

también se observan algunos focos hiperplásicos y displásicos en algunos sitios del tejido. Los agentes que provocan la expansión clonal de estas células iniciales se denominan promotores tumorales. La promoción de un tumor puede ocurrir como consecuencia de exposiciones exógenas, como el humo de tabaco o infecciones virales. La promoción puede ser también un proceso endógeno como es la estimulación por las sales biliares en el cáncer de colon. Algunos focos o lesiones progresan a una mayor velocidad que otros, y éstos son los que más riesgo corren de sufrir conversión maligna. La progresión premaligna ocupa la mayoría del período de latencia del tumor antes de la conversión maligna, cuando la lesión empieza a mostrar propiedades invasivas (DeVita y col., 2000).

II.7 Técnicas para medir expresión y mutaciones genéticas

II.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa

Una de las técnicas más reciente desarrollada, y que rápidamente ha llegado a ser el pilar en el diagnóstico molecular del cáncer es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction). La PCR es un procedimiento en el cual ciertas regiones del ADN en un genoma complejo pueden ser enormemente amplificadas *in vitro*, proporcionando secuencias de nucleótidos inmediatamente contiguos a estas regiones conocidas. El principio fundamental es que bajo las condiciones apropiadas, la ADN polimerasa bacteriana copiará cada hebra patrón del ADN de doble cadena; esta enzima puede solamente copiar el ADN del patrón mediante la adición de nucleótidos en el extremo 3' de una cadena de ADN preexistente complementaria al ADN patrón. Estos extremos 3' están provistos de un par de oligonucleótidos de cadena simple, denominados primers o cebadores, cada uno de ellos de una longitud de 15 a 40 nucleótidos. La PCR es relativamente rápida, ya que las amplificaciones estándar de 25 a 30 ciclos pueden ser complementadas en pocas horas (DeVita y col., 2000).

II.7.2 Detección de mutaciones puntuales

Varias técnicas están disponibles para la detección de las mutaciones puntuales (sustitución de un simple par de bases) en el ADN.

Este problema surge de dos formas: (1) la detección de una mutación específica en la posición de un nucleótido en particular, dentro del gen y, (2) la detección de alguna mutación en numerosas posibles posiciones dentro del gen (DeVita y col., 2000).

II.7.3 Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (SSCP)

Una técnica muy común se basa en el principio referido como polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP), en donde el ADN se separa en un gel de poliacrilamida que funciona bajo condiciones no desnaturalizantes. Una segunda técnica basada en la conformación, es la desnaturalización por gradiente en electroforesis de gel (DGGE). Esta técnica se basa en el hecho que un gradiente en el incremento de desnaturalizantes químicos añadido al gel de poliacrilamida induce a la separación local de las cadenas en los productos de la PCR, puesto que éstos migran a través del gel (DeVita y col., 2000).

La técnica de SSCP puede distinguir entre dos secuencias de ADN muy similares, sólo basada en la forma específica de sus estructuras de cadena simple. Por consiguiente, pueden discriminarse, en principio, hasta dos alelos del mismo gen. Una molécula de cadena simple tiene la propiedad de formar estructuras secundarias gracias a apareamientos internos de sus bases. Estas estructuras secundarias dependen de la secuencia y dan lugar a formas particulares en cada molécula de cadena simple. Las diferencias en la estructura secundaria hacen que las cadenas de ADN migren de modo diferente en el gel. De tal forma que el SSCP es un método de electroforesis que permite detectar, pero no caracterizar, mutaciones y polimorfismos. El producto amplificado por la técnica de PCR es separado por calor en dos cadenas sencillas y puesto a correr en gel de acrilamida:bis-acrilamida no desnaturalizante, basándose en el principio de que la movilidad electroforética de una molécula en un gel es sensible al tamaño, carga y forma de la molécula. En un gel no desnaturalizante, las dos cadenas sencillas de ADN previamente desnaturalizado, a medida que migran electroforéticamente, adquieren una conformación tridimensional, según la secuencia nucleotídica que constituye a cada una. En el análisis de SSCP, el cambio de un solo nucleótido es

suficiente para alterar la estructura tridimensional de una secuencia con respecto a otra. Esta alteración del ADN se detecta como una migración diferente de una o ambas cadenas en la electroforesis del gel, dependientes de la conformación adoptada por cada cadena sencilla. La capacidad del PCR-SSCP para detectar mutaciones depende de cómo la mutación afecta al plegamiento de la molécula y como el plegamiento afecta a la movilidad electroforética (Hayashi y Yandell, 1993). El SSCP detecta del 70% al 95% de mutaciones en los productos de PCR de 200 pb y de menor tamaño; sin embargo presenta el inconveniente de no detectar la totalidad de las posibles variantes de secuencias (Leone y col., 1997).

III. HIPÓTESIS

Las variedades de frijol (Negro, Pinto Zapata y Marcela) incorporadas a la dieta, modulan negativamente la expresión del biomarcador genético *k-ras* en lesiones de colon de ratas tratadas con el carcinógeno dimetilhidracina.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Evaluar el efecto de dietas a base de diferentes variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) sobre las alteraciones producidas en el gen *k-ras* en lesiones de colon inducidos con dimetilhidracina en ratas Sprague Dawley.

IV.2 Específicos

- Determinar la concentración de compuestos fenólicos totales en las harinas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) cocido.
- Evaluar el efecto de una dieta a base de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) sobre la modulación del gen *k-ras* utilizando la técnica de SSCP.
- Determinar el efecto de las mutaciones del gen *k-ras* sobre la expresión de su proteína, empleando la técnica de Western blot .

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales

V.1.1 Material Biológico

- Ratas macho Spague Dawley de 4 semanas de edad de la misma línea genética adquiridas en Harlan de México, S.A. de C. V.
- Frijol en sus variedades: Pinto Zapata, Negro y Marcela, las cuales fueron donadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Pecuarias (INIFAP), Unidad Celaya.

V.1.2 Compuestos químicos

1,2-Dimetilhidracina (DMH) (Fluka)

Fenol equilibrado (ultrapuro, USB)

Cloroformo y alcohol isoamílico (J.T. Baker)

Alcohol etílico y Metanol (Merck)

Proteinasa K 20 mg /ml (BioRad)

Kit para PCR que incluye: Taq DNA polimerasa 5 U/ μ l, mezcla de dNTP's 10 mM (Invitrogen)

Agarosa y acrilamida (Bio-Rad)

(+)-Catequina (Fluka)

Vainillina (Fluka)

Agua HPLC

Solventes y sales utilizadas para soluciones buffer fueron grado analítico (J.T. Baker)

V.2 Métodos

V.2.1 Determinación de compuestos fenólicos totales

Para la determinación de los compuestos fenólicos totales se utilizó la técnica descrita por Aparicio-Fernández y col. (2005), en donde se utilizó metanol al 100% para la extracción.

V.2.1.1 Curva de calibración

Las concentraciones para la curva de calibración fueron las siguientes: 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 mg/mL

Cada una de las concentraciones de la curva se realizaron por triplicado, se calculó la media de las absorbancias y se determinó la ecuación de la recta, la r (que debe ser lo más cercana a 1).

Las concentraciones requeridas se prepararon mediante diluciones seriadas, para ello se pesaron 20 mg de (+)-catequina y se llevaron a un volumen de 25 mL con metanol, de esta solución se tomaron 7.5 mL y se aforó a 10 mL con el mismo disolvente, de esta solución se tomaron 6.6 mL y de igual manera se llevaron a 10 mL, de la solución anterior se tomaron 5 mL y se llevo a 10 mL, finalmente de la solución anterior se tomaron 5 mL y se aforó a 10 mL con metanol.

Para la cuantificación de las concentraciones de la curva de calibración se realizaron los siguientes pasos:

Se colocaron 0.5 mL de cada una de las soluciones en tubos de ensaye, a continuación se le adicionaron 2.5 mL de una solución 1:1 de HCl 8% : vainillina 1%. Esta solución debe adicionarse de 0.5 en 0.5 mL a cada uno de los tubos hasta completar los 2.5mL.

Paralelamente se preparó un blanco con 0.5 mL de metanol y 2.5 mL de HCl al 4%. Tanto las muestras como el blanco deben protegerse de la luz, incubándose en un baño maría a una temperatura de 30°C por 20 minutos. Al finalizar este procedimiento, se midieron las absorbancias en un espectro UV-Visible a una longitud de onda de 500 nm.

V.2.1.2 Cuantificación en muestras de harinas de frijol

En lo que respecta a la cuantificación de compuestos fenólicos totales en las muestras se realizaron los siguientes pasos:

El experimento se realizó por triplicado.

Se pesaron 0.2 gramos de harina de frijol en un matraz de 50 mL protegido de la luz, se le adicionaron 10 mL de metanol y se dejó en agitación por 24 horas a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de agitación, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos.

Se tomaron 0.5 mL del sobrenadante y se colocaron en tubos de ensaye, se le adicionaron 2 mL de una solución 1:1 de HCl 8% : vainillina 1%, este volumen se adicionó de 0.5 en 0.5 mL hasta completar el volumen requerido. Se colocaron en un baño maria a 30°C durante 20 minutos protegidas de la luz.

Al finalizar el tratamiento se leyeron en un espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 500 nm.

V.2.2 Elaboración de dietas

Para determinar la cantidad de frijol incorporado en la dieta, se consideró el consumo per cápita que se tiene en México, que es de 11 kilos por año (Casimiro, 2002).

El frijol se coció a temperatura de ebullición en una olla con aislamiento térmico y temperatura controlada. Enseguida se secó en un horno de convención a 60°C durante toda una noche. Posteriormente fueron molidos en un molino pulvex. Al igual que el frijol, la croqueta fue molida para poder incorporarlas diferentes variedades. La concentración final del frijol fue de 0.42 g por Kg de peso del animal.

V.2.3 Preparación del carcinógeno Dimetilhidracina (DMH)

El carcinógeno fue preparado el mismo día de la inyección.

Se preparó una solución de DMH 0.07 M en agua HPLC estéril que contenía 37 mg de EDTA por cada 100 mL como agente estabilizador y se ajustó el pH de la solución a 6.5 usando hidróxido de sodio.

V.2.4 Inducción del cáncer de colon

La dieta fue administrada durante 4 semanas antes del inicio del tratamiento con el carcinógeno. Cada uno de los grupos experimentales recibió por vía subcutánea la DMH en una dosis de 21 mg/Kg de peso corporal, una vez por semana durante 8 semanas.

V.2.5 Sacrificio

Para facilitar la limpieza del colon los animales se dejaron en ayuno desde la noche anterior. Estos se sacrificaron por decapitación a las 17 semanas después de la primera inyección del carcinógeno. Se realizó una incisión torácica abdominal media para extraer el intestino grueso. Posteriormente se procedió a su apertura longitudinal por el borde antimesentérico y se realizó una limpieza suave de la superficie mucosa con solución fisiológica estéril, seguida de la fijación del intestino sobre un trozo de corcho con alfileres, manteniendo una temperatura de 4°C, para evitar la descomposición del tejido.

V.2.6 Análisis macroscópico

El intestino se dividió en tres zonas: proximal, media y distal. Se analizó el tejido macroscópicamente y se detectaron lesiones, las cuales fueron medidas con un vernier con 0.1 mm de graduación. Las variaciones que se midieron fue el alto, ancho y largo de las lesiones para así determinar el volumen de las mismas.

V.2.7 Extracción de ADN

Se extrajo el ADN genómico de cada uno de las lesiones y de tejido normal de las ratas control mediante las técnicas estándar de digestión con proteinasa K, seguido de extracción con fenol-cloroformo y su posterior precipitación con etanol (Ausubel y col., 1992).

V.2.7.1 Extracción de ADN. Primera etapa

Se pesaron entre 0.025-0.05 g de tejido y se colocaron en un tubo Eppendorf, y se agregaron 500 µL de buffer de digestión; el tejido se homogenizó con un émbolo de

teflón estéril y enseguida se agregaron 500 μL más de buffer de digestión, finalmente se agregó proteinasa K (0.1 mg/mL). Se incubó de 12 a 24 horas a una temperatura de 50-55° C.

V.2.7.2 Extracción de ADN. Segunda etapa

Se sacaron los tubos de incubación y agregó 500 μL de buffer de extracción, se agitó suavemente durante 3 minutos y se centrifugaron durante 15 minutos a 5000 g a 4°C

Se extrajo la fase acuosa y se adicionó un volumen igual de buffer de extracción, se agitó suavemente durante 3 minutos y se centrifugo 15 minutos a 5000 g a 4°C. Nuevamente se extrajo la fase acuosa. A esta fase se agregó 2 volúmenes iguales de etanol al 100% frío y 1/10 partes de Acetato de sodio. Se agitó durante 2 minutos muy suavemente. Se centrifugo a 7500 g durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol al 70%, se agitó durante 30 segundos y se centrifugo a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el tubo. Finalmente se colocaron 50 μL de agua HPLC estéril para resuspender el ADN.

V.2.8 Cuantificación de ADN

Para la cuantificación se hicieron diluciones del ADN recién extraído. La dilución recomendada es 1: 100 (10 μL de ADN y 990 μL de agua HPLC) para un volumen de 1 mL.

La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro utilizando el programa lambda 40 a una longitud de onda de 260 y 280 nm y de esta forma conocer la concentración y la pureza mediante la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} .

Para determinar la concentración del DNA se aplicó la siguiente ecuación:

$$[\text{DNA}] \mu\text{g/mL} = (\text{D.O. } 260 \text{ nm}) (50) (\text{dilución})$$

Donde: el factor de 50 se debe a que una unidad de D.O. a 260 nm corresponden a 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA de doble cadena.

V.2.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En un microtubo Eppendorf se colocó un volumen total de 50 μ L compuestos por ADN y una mezcla constituida por primers (forward y reverse), 10 mM dNTP, buffer 10X, MgCl₂, Taq polimerasa y agua HPLC.

Los microtubos se colocaron en el termociclador bajo las siguientes condiciones (Cuadro 4).

Cuadro 4. Condiciones para realizar la amplificación del ADN

95°C	5 minutos	1 ciclo
94°C	1 minuto	30 ciclos
57°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	

(Hayashi y Yandell, 1993)

A. Electroforesis en gel de agarosa

Para comprobar la amplificación del ADN se realizó una electroforesis de las muestras en un gel de agarosa al 1.5%, se cargó en cada pozo un volumen de 10 μ L de muestra y 5 μ L de colorante, en uno de los pozos se cargó 1 μ L de marcador de DNA de 100 pares de bases (pb). La electroforesis en gel de agarosa se realizó con buffer TAE 10X en una cámara Mini-Sub Cell GT de Bio-Rad a voltaje constante (60 volts) durante 1 hora. Las bandas de ADN se observaron tiñendo el gel de agarosa con bromuro de etidio 0.5 μ g/mL, observando el gel en el transiluminador 2020E UV/ White con lámparas para UV.

V.2.10 Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP)

Del producto de PCR tanto de tumores como de controles, se llevó a cabo el análisis de polimorfismo de cadena sencilla, bajo las siguientes condiciones (Cuadro 5).

Cuadro 5. Condiciones para realizar el Polimorfismo conformacional de cadena sencilla

K-ras			
<u>Oligonucleótidos:</u>			
Sentido 1AKforward 5' -TAAGGCCTGCTGAAAATG - 3'			
Antisentido 1AKreverse 5' -ATGACTGCCACCCTTTAC - 3'			
<u>Concentraciones:</u>		<u>Condiciones:</u>	
	[final]	Temperatura	Tiempo
Templado de DNA	50 ng	1 ciclo	
dNTP's	100 µM	95 ° C	5 min
Oligonucleótidos			
1AKforward	8 pmolas	30 ciclos	
1AKreverse	8 pmolas	94 ° C desnaturalización	1 min
Buffer PCR	1 X	57 ° C alineamiento	1 min
MgCl ₂	1.5 mM	72 ° C elongación	1 min
Taq polimerasa	0.5 U		

(Yamada y col., 2000)

Se utilizó una cámara Hoefer SE 260 de Amersham Biosciences, en la cual se preparo la muestra como lo describe Yamada y col. (2000) colocando volúmenes iguales de producto de PCR y amortiguador para SSCP y la mitad del volumen final de formamida. Esta mezcla se agitó en un vortex y se desnaturalizó calentándola a 90°C durante 3 minutos y se enfrió en hielo. Se agitó nuevamente en el vortex y se inyectaron en el gel de acrilamida al 10% que contiene un 5% de glicerol. Este se corrió durante 21 horas a 100 volts.

El gel se tiñó con soluciones para tinción con plata. Se lavó durante 30 minutos con 100 ml de ácido acético al 10% seguido de 3 enjuagues de 2 minutos cada uno con agua destilada. La siguiente etapa fue la impregnación que se hace con 100 mL de AgNO₃ por 25 minutos. Se enjuago con agua destilada durante 20 segundos, se

desechó el agua y se agregó la solución reveladora (Na_2CO_3 y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) por 5 minutos durante los cuales deben observarse bandas. Enseguida se agregó la solución para detener el revelado y finalmente la solución impregnante.

El gel se secó en un Gel Dryer modelo 583 por 90 minutos a una temperatura de 65°C .

V.2.11 Western Blot

El Western Blot es una técnica que se consta de tres pasos: electroforesis, transferencia y detección de proteínas por quimioluminiscencia.

Las muestras obtenidas del intestino grueso se lisaron directamente con un buffer de homogenización que contiene Hepes 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, NaPP 10 mM, Na_3VO_4 2 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM, NaF 10 mM, EDTA 2 mM, PMSF 2 mM, leupeptina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, NP-40 1%, glicerol 10% a 4°C . El homogenizado se incubó por 30 minutos a 4°C , mezclando lentamente y posteriormente se centrifugo a 25000 g durante 5 minutos.

Determinación de proteínas totales por el método de Bradford

Procedimiento para el microensayo

La concentración de proteínas fue determinada por el método Bradford usando el reactivo Bio-Rad Protein Assay y seroalbúmina bovina (BSA) como estándar (1 mg/mL).

El rango lineal para este ensayo empleando BSA es de 1.2 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Electroforesis SDS-PAGE

Los extractos de proteínas de colon se disolvieron previamente en buffer de muestra con β -mercaptoetanol y se desnaturalizaron en baño maría a 60°C por 20 minutos. Las muestras se cargaron (50 μg de proteína) en un gel al 7% (SDS-PAGE) con un espesor de 1 mm, las proteínas fueron separadas a través de un

sistema Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad Laboratories) durante 95 minutos a 120 Volts con una temperatura de 4 °C.

Inmunoblot

Una vez separadas las proteínas, éstas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando una cámara semiseca (Trans-Blot SD de Bio-Rad Laboratories), durante 20 minutos a 15 Volts. Se verificó la transferencia de las mismas tiñendo el gel con azul de coomassie.

Los sitios no específicos de la membrana se bloquearon con una solución de proteínas al 10% (Blocking reagent Roche Molecular Biochemicals) durante toda la noche a 4 °C, sin agitación.

La membrana se incubó durante 3 horas con el anticuerpo monoclonal de interés a temperatura ambiente con agitación constante. Los anticuerpos *k-ras* (1:2600) y el de actina (1:10000) fueron diluidos en solución bloqueante al 5%. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó con un esquema de 6 lavados con TTBS de 5 minutos, 2 lavados con TTBS de 10 minutos y 2 lavados con solución bloqueante al 5% de 10 minutos.

Posteriormente, la membrana se incubó con un segundo anticuerpo (1:2000) conjugado con peroxidasa de rábano, durante 45 minutos a temperatura ambiente y con agitación. Se lavó nuevamente la membrana 6 veces con TTBS durante 5 minutos y 1 lavado con TTBS de 10 minutos.

Finalmente, la membrana se incubó con la solución de quimioluminiscencia (en la oscuridad y se expuso a una película fotográfica Kodak BioMax Light). Las bandas se cuantificaron en un fotodocumentador (software Kodak ID Image).

VI. RESULTADOS

Además de los componentes nutricionales, el frijol común contiene altas concentraciones de fitoquímicos que aportan beneficios potenciales a la salud, tales como los compuestos fenólicos. Por lo tanto, primeramente se determinó la concentración de dichos compuestos en las harinas de frijol cocido, utilizando la metodología descrita por Fernández-Aparicio y col. (2005), en donde el solvente que se utiliza para la extracción es metanol al 100%. Así mismo se realizó una curva estándar utilizando (+)-catequina (Anexo II).

Los resultados obtenidos en las muestras nos indican que la harinas de frijol Negro 8025 presentaron la concentración más alta de compuestos fenólicos totales en mg equivalentes (+)-catequina/g de muestra (1.358 ± 0.016) seguido de la harina del frijol Marcela (0.744 ± 0.010) y finalmente la harina del frijol Pinto Zapata mostró la concentración más baja de dichos compuestos (0.082 ± 0.018) (Figura 6).

Estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de alimentos ricos en flavonoides protegen contra enfermedades asociadas con estrés oxidativo, enfermedades coronarias y cáncer. Dentro de los flavonoides que se han reportado para frijol se encuentran principalmente antocianinas, proantocianidinas o taninos condensados los cuáles poseen actividad antioxidante y antimutagénica (Aparicio-Fernández y col, 2005).

Con respecto a los estudios *in vivo*, el frijol cocido fue incorporado antes, durante y después de la administración del carcinógeno en la dieta de los animales y los resultados obtenidos fueron los siguientes. Con respecto a la incidencia, que es el número de animales que presentaron tumores con respecto al total de los animales de experimentación por grupo, se encontró que el frijol Negro 8025 y el Pinto Zapata mostraron una inhibición de la incidencia del 25 y del 33% respectivamente, lo cual nos indica que hubo un número importante de animales que no presentaron tumores en colon, comparados con el control positivo. La harina de frijol Marcela no

presentó protección con respecto a este parámetro (Cuadro 6). No se presentó diferencia estadística significativa entre los 4 grupos de estudio.

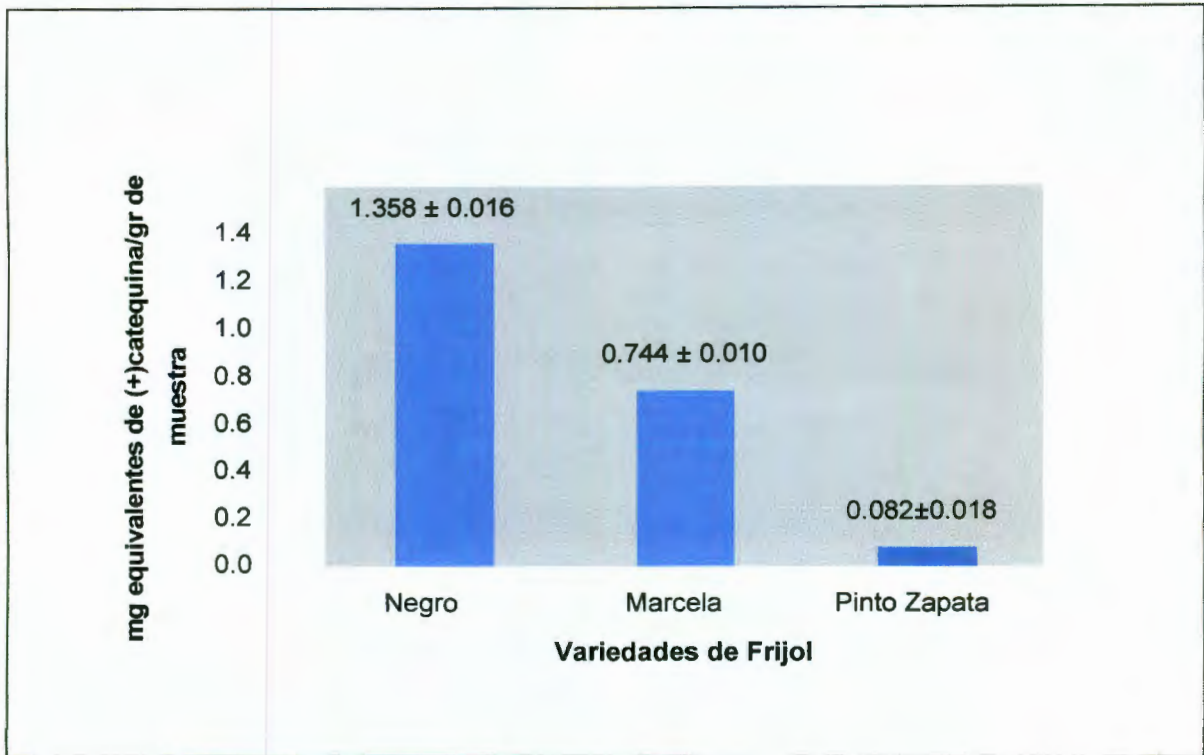


Figura 6. Concentración de compuestos fenólicos en las harinas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) cocido. Cada barra representa el promedio de tres determinaciones independientes \pm SD.

En lo que respecta al número promedio de tumores que es un parámetro calculado a partir del número total de tumores entre el total de animales de experimentación, se demostró que los valores más elevados corresponden al grupo control positivo con 2.86 ± 0.31 y Marcela con 2.29 ± 0.31 , mientras que para el Negro 8025 y Pinto Zapata fue de 1.00 ± 0.30 y 1.00 ± 0.33 , respectivamente (Cuadro 6). No existe diferencia estadística significativa entre el control positivo y el grupo Marcela pero sí

entre el control positivo, Negro 8025 y Pinto Zapata respectivamente.

La multiplicidad que se define como el número de lesiones encontradas entre el número total de animales con lesiones en el grupo, nos ayuda también a determinar que tan agresivo es el carcinógeno utilizado y de esta manera evaluar la protección brindada por el frijol.

El Cuadro 6 nos muestra que la multiplicidad es mayor en los grupos control (2.86 ± 0.31) y Marcela (2.29 ± 0.31) mientras que para los grupos Negro 8025 (1.20 ± 0.29) y Pinto Zapata (0.67 ± 0.27) disminuye (Cuadro 4). No se presenta diferencia significativa entre el control positivo y Negro 8025 pero sí entre el control positivo y Pinto Zapata.

Para determinar si la protección del frijol podría estar mediada a través de la modulación del gen *k-ras*, se determinaron mutaciones en dicho gen, para lo cual primero se extrajo el DNA y se amplificó por PCR las regiones de interés y se obtuvo un producto correspondiente al segmento del gen *k-ras* (175 pb) (Figura 7).

Cuadro 6. Multiplicidad, incidencia y número promedio de tumores presentados en animales tratados con diferentes variedades de frijol y el carcinógeno Dimetilhidracina

Muestra	Incidencia	No. Promedio de Tumores	Multiplicidad
Control Positivo	100%	2.86 ± 0.31^a	2.86 ± 0.31^a
Negro 8025	75%	1.00 ± 0.30^b	1.20 ± 0.29^a
Pinto zapata	67%	1.00 ± 0.33^b	0.67 ± 0.27^b
Marcela	100%	2.29 ± 0.31^a	2.29 ± 0.31

Las letras a y b indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

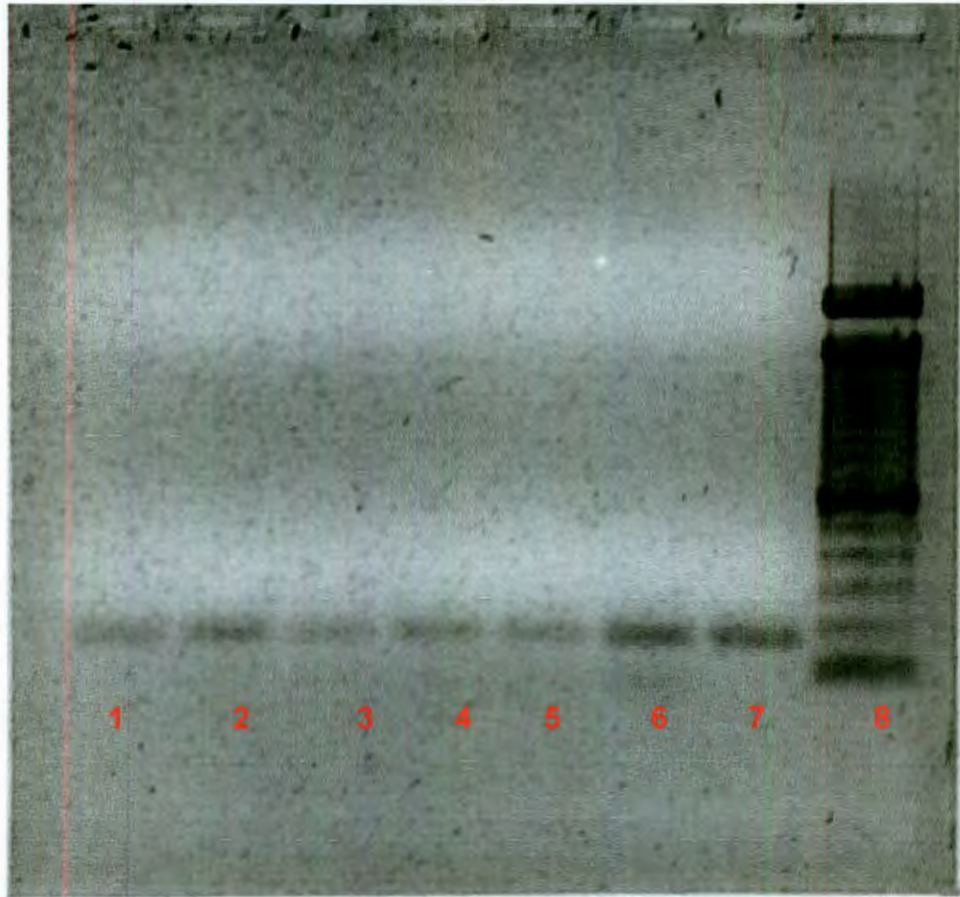


Figura 7. Producto de PCR del gen *k-ras* de muestras de animales tratados con dimetilhidracina. Carril 4 Muestra de control Positivo; Carril 1-3, 5-7 Muestras tratadas con frijol Pinto Zapata; Carril 8 Marcador de 100 pares de bases.

El análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) es una de las técnicas más ampliamente utilizadas en la búsqueda de mutaciones que pueden presentarse en un segmento amplificado de DNA que va desde los 175 a 250 pb. El principio de esta técnica se encuentra basado en el hecho de que la movilidad electroforética de las cadenas simples de DNA, bajo condiciones no

desnaturalizantes, adoptan diversas conformaciones dependiendo de las asociaciones intramoleculares que en ellas se den debido a las áreas de autocomplementariedad en la misma cadena; por lo que cualquier cambio en la secuencia que modifique las regiones de autocomplementariedad es probable que altere la configuración y produzca un cambio detectable en la movilidad.

La detección de las posibles mutaciones se llevó a cabo mediante el análisis de SSCP de los productos de PCR del gen *k-ras* para los tumores encontrados en el colon de las ratas tratadas con dimetilhidracina.

La Figura 8 muestra uno de los geles que presenta el patrón de bandeo obtenido para *k-ras*, en el que se observan claramente dos bandas correspondientes a las cadenas complementarias de ADN (Banda 1 y 2) tanto para las muestras control como para la de las muestras tratadas con frijol Negro 8025. Se pueden apreciar una tercer y cuarta banda (Banda 3 y Banda 4) como posibles mutaciones con mayor intensidad en los controles positivos y de menor intensidad e incluso desaparición en las muestras tratadas con frijol Negro. Esta disminución se encontró en el 71% de las muestras colónicas provenientes de animales alimentados con frijol Negro.

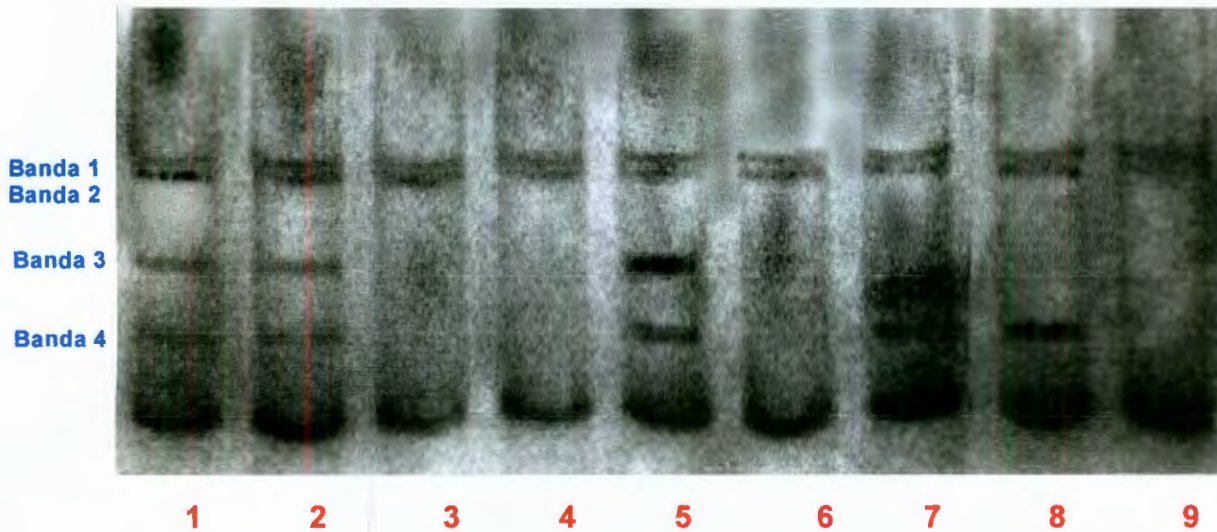


Figura 8. Efecto del frijol Negro 8025 sobre el gen *k-ras*. Carril 1-2 Muestras correspondientes a controles positivos; Carril 3-4 Muestras correspondientes a controles negativos; Carril 5-9 Muestras tratadas con frijol negro 8025.

En la figura 9 podemos observar el patrón de bandeo obtenido para *k-ras*, en el que se observan claramente las dos bandas correspondientes a las cadenas complementarias de ADN (Banda 1 y 2) tanto para las muestras control como para la de las muestras tratadas con frijol Pinto Zapata. Una tercer y cuarta banda (Banda 3 y Banda 4) consideradas como posibles mutaciones se pueden apreciar con mayor intensidad en los controles positivos, mientras que en lo que respecta a las muestras tratadas con el frijol dicha banda también disminuye en un 80% de las lesiones analizadas.

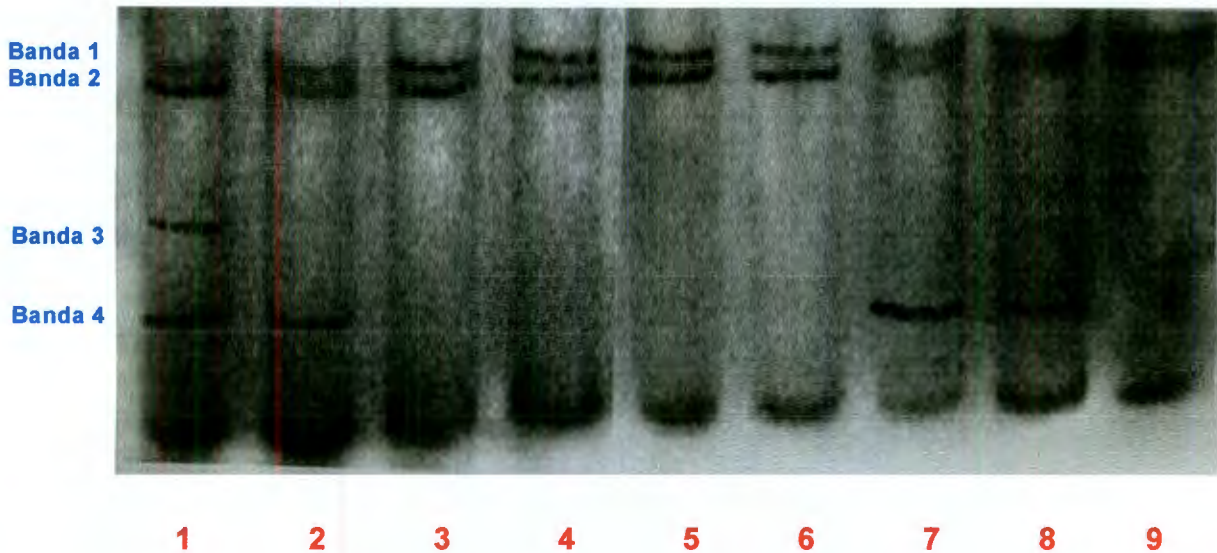


Figura 9. Efecto del frijol Pinto Zapata sobre el gen *k-ras*. Carril 1-2 Muestras correspondientes a controles positivos; Carril 3-4 Muestras correspondientes a controles negativos; Carril 5-9 Muestras tratadas con frijol Pinto Zapata.

A las muestras de frijol Marcela también se les extrajo el DNA y el gen *k-ras* fue amplificado. Sin embargo, debido a un problema de incremento de temperaturas en el refrigerado, las muestras fueron degradadas, por tal motivo no fue posible analizarlas mediante la técnica de SSCP.

En la figura 10 se muestra la expresión de la proteína K-ras obtenida mediante la técnica de Western blot. Las muestras de control positivo presentaron la mayor expresión de dicha proteína, mientras que en las muestras obtenidas de los animales que fueron alimentados con frijol Negro 8025 y Pinto Zapata disminuyó de manera considerable la expresión de *k-ras*. Los animales alimentados con frijol Marcela mostraron un efecto menor, ya que la proteína K-ras sólo disminuyó ligeramente al compararla con el control positivo (DMH).

Es conocido que las mutaciones en este gen se dan a etapas tempranas de la formación de adenomas y, además, se presentan en mucosa histopatológicamente normal. Por otra parte, se ha comprobado que las mutaciones en el gen *k-ras* inducidas por la dimetilhidracina son exclusivamente transiciones de G \longrightarrow A de los codones 12 ó 13 en el segundo nucleótido, siendo diferente para los tumores de colon esporádicos en humanos, donde las mutaciones en *k-ras* exhiben sustituciones por A, T o C, ya sea en el primer o segundo nucleótido del codón 12 únicamente. La naturaleza selectiva de esta mutación puede ser debida a las diferencias en accesibilidad de los residuos de guanina a la dimetilhidracina, como se ha visto para otros agentes que causan mutaciones en el oncogen *ras*.



Figura 10. Western Blot de muestras tratadas con diferentes variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Carril 1 Control Positivo; Carril 2-3 Muestra tratada con frijol Negro; Carril 4-5 Muestras tratadas con frijol Pinto Zapata; Carril 6-7 Muestras tratadas con frijol Marcela.

VII. DISCUSIONES

La dieta juega un rol importante en la reducción de enfermedades degenerativas tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes.

El consumo del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) se ha relacionado con la reducción del riesgo de padecer cáncer de colon, debido a que contiene polifenoles que pueden ser los responsables de este efecto fisiológico.

Con los resultados obtenidos respecto a la determinación de compuestos fenólicos podemos observar que el frijol Negro 8025 posee la mayor cantidad (1.358 ± 0.016 mg equivalentes de (+)-catequina/gr de muestra), seguido por Marcela y Pinto Zapata con 0.744 ± 0.010 y 0.082 ± 0.018 mg equivalentes de (+)-catequina/gr de muestra, respectivamente. De acuerdo a Aparicio-Fernández y col., (2005) la pigmentación de la cáscara del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) está determinada por la presencia de compuestos polifenólicos siendo en su mayoría flavonoides, específicamente flavonoides glicosilados, taninos y antocianinas. Por lo tanto, entre mayor pigmentación mayor cantidad de compuestos fenólicos.

En un estudio realizado por Díaz-Batalla y col. (2006) se determinaron las concentraciones de algunos flavonoides en las especies Negro 8025 y Marcela, y reportaron que el Negro 8025 mostró mayor concentración de quercetina, ácido vainillínico y ácido ferulico. El ácido cumárico sólo fue detectado en el Negro 8025.

La actividad biológica de los flavonoides depende de los tipos de fitoquímicos que lo constituyen y de la complejidad de sus estructuras, así como de la composición de la mezcla de flavonoides, ya que se ha establecido que entre más compleja sea la mezcla esta posee mayor capacidad de protección al combinarse con otros aditivos o por efectos de sinergismo (Aparicio-Fernández y col., 2005).

El efecto de los compuestos fenólicos sobre enfermedades crónico degenerativas tales como la diabetes, enfermedades coronarias y cáncer puede deberse a que estos complementan mecanismos de acción incluyendo modulación de la detoxificación enzimática, estimulación del sistema inmune, reducción de agregación plaquetaria, reducción del metabolismo de lípidos y hormonas, efectos

antioxidantes, antibacterianos, antimutagénicos y antiangiogénicos, reducción en la iniciación de tumores e inducción de apoptosis (Lampe,1999).

En base a los resultados obtenidos podemos observar que el frijol Negro 8025 ofrece el mayor grado de quimioprotección debido a la alta cantidad de compuestos fenólicos que posee. Sin embargo, Pinto Zapata al igual que Marcela son especies poco coloridas, pero Pinto Zapata también presentó una alta protección. Esto puede deberse a que a pesar de contener un menor nivel de compuestos fenólicos, éstos poseen una mayor acción quimioprotectora, o la actividad biológica podría atribuirse a otros compuestos presentes en el frijol.

El frijol contiene un alto porcentaje de carbohidratos glicémicos de digestión lenta y no glicémicos que son fermentables en el intestino grueso; estos últimos pueden ejercer efectos fisiológicos benéficos relacionados con la disminución de los factores de riesgo de cáncer de colon, debido a la formación de productos de fermentación colónica como el ácido propiónico y butírico. Siendo el ácido butírico el principal substrato energético para los colonocitos, se ha demostrado que induce apoptosis, inhibe el crecimiento y diferenciación de células colónicas tumorales (Serrano y Goñi ,2004).

Al examinar los tumores mediante la técnica de SSCP podemos observar que las posibles mutaciones tienden a disminuir de intensidad e incluso desaparecer en un 71% de las muestras tratadas con el carcinógeno dimetilhidracina y protegidas con la variedad Negro 8025. Mientras que con la variedad Pinto Zapata, las bandas debidas a una posible mutación se presentan con una menor intensidad en el 80% de las muestras.

Limtrakul y col. (2001) reportaron que el flavonoide curcumina adicionado a la dieta en 0.5-2% correlaciona con bajos índices de cáncer de estómago, duodeno y colon, debido a que la curcumina puede bloquear ciertos puntos en las rutas metabólicas de señales de transducción para la expresión de los oncogenes *ras* y *fos*. Por lo anterior, se puede suponer que los flavonoides que contiene el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) pueden actuar de la misma manera, indicando que la capacidad quimioprotectora que puede estar determinada por la cantidad y/o

composición de los compuestos fenólicos de las diferentes variedades de frijol estudiadas.

Con estos estudios se ha demostrado que el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) inhibe el desarrollo del cáncer inducido químicamente con dimetilhidracina, dicha capacidad depende de la variedad y pudiera estar mediada a través de la regulación negativa del oncogen *k-ras*.

VIII. CONCLUSIONES

La variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) Negro 8025 posee una mayor cantidad de compuestos fenólicos totales, seguida de Pinto Zapata y finalmente Marcela.

Los animales tratados con la variedad Pinto Zapata presentan una menor incidencia de lesiones, mientras que los tratados con Marcela presentan una incidencia similar (100%) al del control positivo.

El número promedio de tumores es mayor en el control positivo seguido de la variedad Marcela. En cuanto a las variedades Negro 8025 y Pinto Zapata no se presenta diferencia estadística significativa entre ambos, pero sí respecto al control positivo.

En lo que respecta a la multiplicidad los valores más elevados corresponden al grupo control positivo, seguido por Marcela, Negro 8025 y finalmente Pinto Zapata.

En base al análisis de los tumores por la técnica de SSCP, se observó que el frijol Negro 8025 y Pinto Zapata disminuyeron las mutaciones del gen *k-ras* generadas por el carcinógeno dimetilhidracina.

El consumo de frijol a bajas concentraciones disminuye el riesgo de padecer cáncer de colon, así como la modulación de genes implicados en el desarrollo del mismo.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, A. E. Martínez-Balibrea, J. L. Manzano, B. Cirauquí. 2003.** Biología molecular del cáncer colorectal. Revista de Gastroenterología. Vol. 73 (1): 9-16
- Aparicio-Fernández X., Manzano B. L., Loarca P. G. 2005.** Comparision of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and storage common beans (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B₁. Journal of Food Science. Vol. 70 (1): 55-61
- Aparicio-Fernández X., Garcia G. T., Yousef G.G., Loarca P.G., De Mejia E., Mary Ann L. 2006.** Chemopreventive activity of polyphenolics from black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on HeLa and HaCat cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 53: 4615-4622
- Aparicio-Fernández X., Yousef G.G., Loarca P.G., De Mejia E., Mary Ann L. 2005.** Characterization of polyphenolics in the seed coat of black Jamapa Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 54: 2116-2122
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D., Seiman, J. G., Smith, J. A and Struhl, K. 1995.** Short Protocols in Molecular Biology . 2da. Ed., John Wiley and Sons, New Cork: 10.30, 11.26-11.27
- Bourdon, I., Olson B., Backus R., Richter B., Davis P., Schneeman B. 2001.** Beans, as a source of dietary fiber, increase cholecystokinin and apolipoprotein B48 response to test meals in men. Journal Nutrition. Vol.131:1485-1490
- Cardador-Martínez, A., Castaño-Tostado E., Loarca-Piña G. 2002.** Antimutagenic activity of natural phenolic compounds in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B₁. Journal of Food Science 1981:62-9
- Carretero, E., Herrerías, E., Delgado, E. 2001.** Oncogenes y cáncer colorrectal. Revista de Gastroenterología. Vol. 3: 181-198
- Casimiro, C. 2002.** Factores etiopatogénicos en el cáncer colorrectal. Aspectos nutricionales y de estilo de vida (segunda de dos partes). Nutrición Hospitalaria. Vol. 17(3): 128-138

- Castellanos, J. Z., Guzmán, M.H., Jiménez, A., Mejía, C., Muñoz, R. J. J., Acosta G. J. A., Hoyos G., López S. E., González ED., Salinas P. R, González, A. J., Muñoz V. J. A., Fernández H. P., Cáceres, B. 1997.** Preferential Habits of consumers of common bean in México. *Archive Latinoamerican Nutritional*. Vol. 47(2):163-167
- Davies, J. 2000.** Preventing colon cancer: What you can do. *Medical News*. Vol. 9(2): 142-149
- DeVita, V. T., Hellman, S. J., Rosenberg, S. A. 2000.** *Cáncer, Principios y prácticas de oncológica*. 5ª. ed., Médica Panamericana, España: 579-587,1144-1148
- Díaz-Batalla L., Widholm J.M., Fahey G.C., Castaño T. E., Paredes L. O., 2006.** Chemical components with health implications in wild and cultivated mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 5: 2045-2052
- Fearon E.R., Vogelstein B., 1990.** A genetic model for colorectal carcinogenesis. *Cell*. Vol. 61: 759-767
- Gariglio, P., y Orozco, E. 2000.** *Genética y biomedicina molecular*. 1ra. Ed., Limusa, México, D.F.: 181-198
- Geil P. B., Anderson J.W., 1994.** Nutrition and health implications of dry beans: a review. *Journal of the American College of Nutrition*. Vol. 13:549-58
- Guzmán-Maldonado S. H., Paredes-López O. 1998.** Functional products of plant indigenous to Latin América: amaranth, quinoa, common beans and botanicaols. In: Mazza G. (Ed). *Functional foods biochemical and processing aspects*. Lancaster, Pa.: Technomic: 460
- Hayashi, K., Yandell, D.W. 1993.** How sensitive is PCR-SSCP?. *Human mutation*. Vol. 2 (5): 338-346
- Henningsson A.M., Margareta E., Nyman G.L., Inger M.E. 2001.** Content of short-chain fatty acids in the hindgut of rats fed processed bean (*Phaseolus vulgaris*) flours varying in distribution and content of indigestible carbohydrates. *British Journal of Nutrition*. Vol. 86: 379-389
- Hughes, J., Chutima, G., Wilson-Sanders S., 1997.** Dry bean inhibit azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Journal of Nutrition*. Vol. 127:2328-2333

- Lampe, J.W., 1999.** Health effects of vegetables and fruits: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 70 (3): 174-490
- Leone, P.E., Bello, M.J., Rey, J.A. 1997.** Incremento en la detección de mutaciones del gen NF2 en meningiomas y neuronotas mediante en análisis de polimorfismo de la cadena sencilla (SSCP) del ADN. *Metrociencia*. Vol. 6 (3): 23-28
- Limtrakul, P., Anuchaprenda S., Lipigorngoson S., Floyd W.D., 2001.** Inhibition of carcinogen induced *c-ha-ras* and *c-fos* protooncogenes expresión by dietary curcumin. *Biomed Central Cancer*. Vol. 1: 1471-1477
- Menéndez, M, Ríos, M.A., 1999.** Oncogenes y Cáncer. *Revista Cubana de oncología*. Vol. 15(2): 131-9
- Peralta-Zaragoza, O., Bahena-Román, M., Díaz-Benítez, C.E., y Madrid-Marina, V. 1997.** Regulación del ciclo celular y desarrollo de Cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública de México*. Vol. 39(5): 451-462
- Ríos, H.M., Hernández, M.M. 2001.** Los genes supresores de tumores y en cáncer. *Revista cubana de oncología*. Vol. 17(1): 65-71
- Samowitz, W., Powers., Spiro, L., Nollet, F., Van Roy, R. and Slaterry, M. 1999.** β -catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinoma. *Cancer Research*. 59: 1442-1444
- Sandberg, A. S., 2000.** Developing functional ingredients a case study. In: Gibson GR, Williams CM, editors. *Functional foods concepts to product*. Boca Raton, Fla.: CRC Press: 218-226
- Santana, C., y García-Carranca, A. 1997.** Los genes ras, el ciclo celular y el desarrollo de tumores. *Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.*: 16: 86-91
- SAGARPA. 2003.** Secretaría de Agricultura y Recursos Pesqueros y de Alimentación. <http://www.sagarpa.gob.mx>
- Serrano, J., Goñi. I. 2004.** Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*. Vol. 54 (1): 289-308

Yamada, Y., Yoshimi, N., Hirose, Y., Kawabata, K., Matsunaga, K., Shimizu, M., Hara, A., Mori, H. 2000. Frequent *β -catenin* gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. *Cancer Research*. Vol. 60: 3323-3327

ANEXO I

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Buffer de Digestión

Tris 1M pH 8.0

EDTA 500 mM pH 8.0

NaCl 4M

SDS 20%

β -mercaptoetanol

Fenol:Cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1)

Solución Fijadora

10 mL de ácido acético y llevar a volumen de 100 mL con agua grado HPLC

Solución Impregnante 1

0.1 g de AgNO_3 aforar a 100 mL con agua HPLC. Adicionar 100 μL formaldehído al 37%, éste se adiciona hasta que se utiliza la solución

Solución Reveladora

2.5 g de Na_2CO_3

0.002 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Llevar a un volumen de 100 mL con agua HPLC, antes de utilizarla adicionarle 100 μL de formaldehído al 37%

Solución Stop

2 g de glicina

0.5 g de EDTA

Aforar a 100 mL con agua HPLC

Solución Impregnante 2

5 mL de glicerol y aforar a 100 mL con agua HPLC

Gel de agarosa al 1.5% (para 25 mL)

0.375 g agarosa

24.5 mL de agua HPLC

0.5 mL TAE 50X

TAE 1X

5 mL TAE 50X

Aforar a 250 mL con agua HPLC

Bromuro de etidio

12.5 mL de bromuro de etidio

Aforar a 250 mL de agua HPLC

Gel de acrilamida (para 10 mL)

Acrilamida /bisacrilamida (49:1) 3.30 mL

Agua 5.00 mL

Glicerol al 5% 622 μ L

TBE 10X 1.00 mL

Persulfato de amonio 70 μ L

TEMED 3.5 μ L

Solución digestora para muestras SDS-PAGE

SDS 5%

Glicerol 30%

Tris 100 mM pH 6.8

Mercaptoetanol 4%

Azul de cumassie 0.02%

Gel separador (para 15ml)

Acrilamida 30% - bisacrilamida 0.938%	5mL
Tris 3M – HCL 1M – SDS 0.3%.	5mL
Glicerol 79.5%	2mL
Agua	3mL
Persulfato de amonio 10%	50 μ L
TEMED	5 μ L

Gel condensador (para 6ml)

Acrilamida 30% - bisacrilamida 0.938%	0.6mL
Tris 3M – HCL 1M – SDS 0.3%	1.5mL
Agua	3.9mL
Persulfato de amonio 10%	40 μ L
TEMED	4 μ L

Buffer superior para 1L

Tris 0.1M	12.10 g
Tricina 0.1M	17.76 g
SDS 0.1%	1.00 g

Buffer inferior para 1L

Tris – HCl pH 8.9 (0.2M)	24.23 g
--------------------------	---------

Buffer de transferencia para 1L

Tris	5.80 g
Glicina	2.93 g

Solución de TBS para 1L

Tris-HCl 1M pH 8	10mL
NaCl 5M	30mL

Solución de TTBS para 1L

Tris-HCl 1M pH 8	10mL
NaCl 5M	30mL
Tween 20	10mL

Solución bloqueante al 10% para 100ml

Solución bloqueadora	10mL
TBS	90mL

Solución bloqueante al 5% para 100ml

Solución bloqueadora	5mL
TBS	95mL

Dilución del primer anticuerpo para una membrana

Primer anticuerpo	3.50 μ L
Solución bloqueante al 5%	10 mL

Mantener en refrigeración.

Dilución del segundo anticuerpo para una membrana

Segundo anticuerpo	5.00 μ L
Solución bloqueante al 5%	10 mL

Mantener en refrigeración.

Acido Clorhídrico al 8% para 100 mL

HCl concentrado	21.6 mL
-----------------	---------

Levar a volumen con metanol

Almacenar en el refrigerador hasta su uso

Acido Clorhídrico al 4% para 50 mL

HCl concentrado 5.4mL

Llevar a volumen con metanol

Almacenar en refrigerador

Vainillina al 1% para 100 mL

1g de vainillina

Llevar a volumen con metanol

Almacenar la solución en refrigerador

Solución (1:1) de HCl 8% : vainillina 1%

Tomar una alícuota de 20 mL de cada reactivo y mezclar

Esta solución se prepara al momento de emplearse

No reutilizar

ANEXO II

Curva de calibración para la determinación de compuestos fenólicos en las harinas de frijol.

Curva (+)Catequina				
	0.8	0.6	0.2	0.1
	0.452	0.325	0.129	0.08
	0.433	0.33	0.134	0.082
	0.439	0.32	0.131	0.09
Media (Abs)	0.441	0.325	0.131	0.084

