



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

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

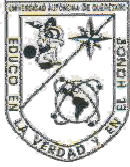
CARACTERIZACIÓN Y EFECTO DE
POLISACÁRIDOS DE FRIJOL COMÚN
(*Phaseolus vulgaris* L.) VARIEDAD
NEGRO 8025 SOBRE EL ESTADIO TEMPRANO
DE CÁNCER DE COLON

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA
M. en C. ANA ANGÉLICA FEREGRINO PÉREZ

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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA

**CARACTERIZACIÓN Y EFECTO DE POLISACÁRIDOS DE FRIJOL COMÚN
(*Phaseolus vulgaris* L.) VARIEDAD NEGRO 8025 SOBRE EL ESTADIO
TEMPRANO DE CÁNCER DE COLON**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA

M en C. ANA ANGÉLICA FERREGRINO PÉREZ

DIRIGIDA POR

DRA. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA

SINODALES:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Presidente


Firma

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Secretario


Firma

Dr. S. Horacio Guzmán Maldonado
Vocal


Firma

Dra. Guadalupe García Alcocer
Vocal


Firma

Dra. Minerva Ramos Gómez
Vocal


Firma

Dr. Ramón G. Guevara González
Suplente


Firma

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Suplente


Firma


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


Firma

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

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

RESUMEN

Estudios epidemiológicos indican que el aumento en la incidencia de cáncer de colon está relacionado directamente con la baja ingesta de frutas, verduras y leguminosas. El frijol es una leguminosa que contiene diversos agentes bioactivos en su mayoría carbohidratos, a los que se les ha atribuido diferentes actividades biológicas, un ejemplo de éstas es la actividad anticancerígena, y que se ha sugerido que mayoritariamente se atribuye a su fermentación en el colon produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Considerando que el frijol a pesar de ser parte de la dieta del mexicano, su consumo ha disminuido considerablemente, tratando de rescatar dicho consumo y conocer más acerca de algunas de las propiedades biológicas de esta leguminosa, se planteó como objetivo evaluar el efecto del extracto de polisacáridos del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad negro 8025 cocido, sobre el estadio temprano de cáncer de colon. Se cuantificó y caracterizó parcialmente los componentes de interés biológico en frijol cocido y en el extracto de polisacáridos (EP). Se obtuvo el 57.5% de polisacáridos en frijol cocido. Los oligosacáridos representaron: 6.8 y 10 mg eq de rafinosa; para frijol cocido y EP, respectivamente, así como 15.11 y 9.11 mg eq de (+)-catequina; 1.8 y 1.6 mg eq de rutina; 30.8 y 39.3 de almidón resistente; 20 y 53.1% de fibra total para frijol cocido y EP, respectivamente. Se evaluó la expresión de genes y proteínas en las zonas colónicas (proximal y distal), así como el efecto de los tratamientos sobre el ciclo celular por citometría de flujo y la inducción de apoptosis por el método de TUNEL y el número de fosas crípticas aberrantes (FCA) por técnicas histológicas. El frijol y el EP inhibieron la expresión de genes involucrados en proliferación celular (*rb* y *β-catenina*), incrementaron la expresión de proteínas relacionadas con arresto celular (p21) y por consiguiente mayor número de células en fase G₁, aumentaron la expresión caspasa 3 e incrementa el número de núcleos apoptóticos y disminuyen el número de FCA.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris* L., Polisacáridos., Ácidos grasos de cadena corta., Fosas crípticas aberrantes

ABSTRACT

Epidemiological studies have shown a good relationship between high incidence of colon cancer and low intake of fruits, vegetables and legumes. The common bean is a legume that contains several bioactive components, carbohydrates, major component with different biological activities, such as anticancer activity and it has been related to colonic fermentation to produce short-chain fatty acids (SCFA). In Mexico, common beans are part of diet however its consumption decreased considerably. The objective of this study was to determine the chemopreventive effect of polysaccharides extract (PE) from cooked common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds of cv. Negro 8025 on ACF development by histology analysis, quantification of SCFA and the evaluation of gene and protein expression (distal colon zone). The yield of PE was 57.5%, the concentration of oligosaccharides was 6.8 and 10 mg of eq raffinose for beans and PE, respectively; for condensed tannins 15.11 and 9.11 mg of eq (+)-catechin; for flavonoids 1.8 and 1.6 mg eq rutin; for resistant starch 30.8 and 39.3 of resistant starch, and for fiber 20 and 53.1% for cooked beans and PE, respectively. We evaluated the expression of genes and proteins in colonic zone (proximal and distal), as well as the effect of treatments on the cell cycle by flow cytometry, induction of apoptosis by TUNEL and the number of aberrant crypt foci (ACF) by histological techniques. The beans and PE inhibit the expression of genes involved in cell proliferation (*rb* and β -*catenin*), increase the expression of proteins associated with cellular arrest (p21) and therefore greater number of cells in G₁ phase, increases the expression caspase-3 and increases the number of apoptotic nuclei and reduce the number of ACF.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L, Polysaccharide, Short chain fatty acid, Aberrant crypt foci.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada, con número de registro 165476, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado al proyecto 57536 y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Estación Bajío (INIFAP, celaya).

A la Dra. Flavia por creer en mí, por ser mi guía, dedicarme tanto tiempo, por oírme, por ser más que asesora una amiga.,gracias.

A las Dras. Rosalía y Minerva, por siempre brindarme su ayuda en el laboratorio, sacarme de muchas dudas y por las aportaciones a este trabajo.

Al Dr. Ramón Guevara por su orientación, dedicación, tiempo, pero sobre todo por hacerme más fácil el mundo de la biología molecular.

A la Dra. Guadalupe García, por sus observaciones y comentarios para mejorar el presente trabajo de investigación.

Al Dr. Moustapha por todos sus comentarios y por sus valiosas observaciones.

Al Dr. Horacio Guzmán por el tiempo y apoyo dedicado a este trabajo.

DEDICATORIA:

A Dios por siempre ofrecerme un nuevo día y con ello tantas personas y cosas maravillosas que me han hecho crecer como ser humano.....Gracias.

A mis padres por todo su apoyo, ya que sin ellos yo no estaría aquí ahora.

A mis hermanos (Héctor y Maríssa) por darme los mejores sobrinos.

A mis amigos de siempre (Claudia, David, Juanito, Eriko, Chava, Julia, Lucia, Carlos) por oírme, ayudarme, pero sobre todo por aguantar tanto abandono y hacerme saber que siempre están ahí para cuando los necesito.

A mis amigos del PROPAC:

Lorenzo, Crísty, Toño, Chío, Carmenchus, Jane, Jesy, Manuel, Aníta, Fany, Gíovís, Maríkís, Erika, Paola, Poncho Marítza, Consuelo, Immer, Omar, Chucho..... Gracias, por formar parte de mi vida y por darme el privilegio de considerarme su amiga.

A todos mis compañeros del laboratorio (Aldrín, Susy, Hayde, Raquel, Erika) y a todos los que han estado en algún momento formando parte de el (Daniel, Gíovana, Nataly, Adriana, Itzel, Erika, Marícela, Rosalba, Claudia, César, etc, etc, etc) gracias por darme un poquito de ustedes
A Lety Mancilla, Marígel, Lauríta, Carmelita, Vero, por ayudarme a resolver mis dudas, trámites, imprevistos, etc, etc,

ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE CUADROS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ABREVIATURAS	XIV
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
1. Frijol común	3
1.1 Generalidades	3
1.2 Composición química	3
1.3 Compuestos biológicamente activos en frijol	5
1.3.1 Compuestos fenólicos	5
1.3.1.1 Fenoles	5
1.3.1.2 Flavonoides	7
1.3.1.3 Taninos	8
1.3.1.2.1 Taninos condensados	9
1.3.2 Fibra dietaria	9
1.3.3 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	10
1.3.4 Almidón resistente	14
1.3.5 Oligosacáridos	15
2. Cáncer	19
2.1 Clasificación del cáncer	20
2.2 Proceso de carcinogénesis	21
2.3 Genética molecular del cáncer	22
2.3.1 Protooncogenes y oncogenes	23

2.3.1.1 β -Catenina	26
2.3.2 Genes supresores de tumores o antioncogenes	29
2.3.2.1 Gen retinoblastoma (<i>rb</i>)	32
2.3.2.2 Gen <i>p21</i>	33
2.3.2.3 Gen <i>p53</i>	35
3. El ciclo celular	35
4. Apoptosis	39
4.1 Receptores de membrana celular que median apoptosis	41
4.2 Mecanismos involucrados en la apoptosis	43
4.2.1 Gen <i>bcl-2</i>	43
4.2.2 Gen <i>bax</i>	44
4.2.3 Caspasas	44
4.2.3.1 Caspasa 3	46
5. Métodos utilizados para el análisis del ciclo celular y apoptosis	46
5.1 Citometría de flujo	47
5.1.1 Características generales de los citómetros de flujo	48
5.2 TUNEL	49
6. Cáncer colon-rectal	50
6.1 Epitelio colónico	50
6.2. Fosas crípticas	53
6.3 Carcinogéneis del cáncer de colon rectal	53
6.3.1. Generalidades	53
7. Modelos experimentales de carcinógenos	57
7.1 Carcinógenos	57
7.1.1 Azoximetano (AOM)	59
III. JUSTIFICACION	61
IV. HIPÓTESIS	61

V. OBJETIVOS	61
A. GENERAL	61
B. PARTICULARES	61
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	62
A. MATERIALES	62
1. Compuestos Químicos	62
2. Material Biológico	62
B. MÉTODOS	63
1. Cocción	63
2. Extracción de polisacáridos	63
3. Análisis químico proximal	63
3.1 Determinación de cenizas	63
3.2 Determinación de humedad	64
3.3 Determinación de proteína total	64
3.4 Determinación de fibra total	65
4. Extracción de fibra insoluble	65
5. Cuantificación de oligosacáridos	66
5.1 Extracción etanólica	66
5.1 Cuantificación de oligosacáridos	66
6. Cuantificación de fenoles	67
6.1 Extracción metanólica	67
6.2 Cuantificación de taninos condensados	67
6.3 Cuantificación de flavonoides	68

7. Extracción y cuantificación de almidón resistente.	68
8. Bioensayo	68
8.1. Estrategia general	68
8.1.1. Primer bioensayo	69
8.1.2. Segundo bioensayo	70
9. Medición del pH	71
10. Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	71
11. Determinación de fosas crípticas aberrantes (FCA)	73
11.1 Azul de metileno	73
11.2 Tinción con Dapi y/o hematoxilina y eosina (H&E)	74
12. Expresión de genes por RT-PCR	74
12.1 Extracción de ARN.	74
12.2 Detección y evaluación de la calidad del ARN	77
12.3 Cuantificación de ARN	77
12.4. Obtención de ADNc	78
12.4.1 Síntesis de ADNc de cadena sencilla	78
12.4.2 Síntesis de ADNc de doble cadena	79
12.4.3 Detección de ADNc de doble cadena sintetizado	82
12.5 RT-PCR	82
12.5.1 Detección de los productos de RT-PCR	85
13. Expresión de proteínas involucradas en arresto al ciclo celular y apoptosis	85
13.1 Extracción de proteína	85
13.2 Cuantificación de proteínas totales	86
13.3 Análisis de Western Blot	86
13.3.1 Electroforesis SDS-PAGE	86
13.3.2 Inmunoblot	88

14. Citometría de flujo	88
15. Determinación de núcleos apoptóticos (TUNEL)	89
16. Análisis estadístico	90
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES	91
1. FRIJOL	91
1.1 Análisis bromatológico del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad Negro 8025	91
1.2 Contenido de polisacáridos y oligosacáridos totales presentes en frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad Negro 8025	94
1.3 Cuantificación de fibra total	97
1.4 Cuantificación de almidón resistente (AR)	97
1.5 Cuantificación de compuestos fenólicos	101
1.5.1 Taninos condensados	101
1.5.2 Flavonoides totales	103
2. Inducción de fosas crípticas aberrantes (FCA)	105
2.1 Estandarización de la inducción de fosas crípticas aberrantes (FCA) por azoximetano (AOM) en ratas macho Sprague Dawley	105
3. Butirato de sodio (NaBu)	109
3.1 Curva dosis-respuesta de butirato de sodio (NaBu)	109
3.2 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en la administración de NaBu a diferentes concentraciones	114
4. Efecto del extracto de polisacáridos (EP) y frijol común variedad Negro 8025 sobre el estadio temprano de cáncer de colon	116
4.1 Consumo de agua y alimento	116
4.2 Ganancia de peso	118
4.3 pH	118

4.4 Histología de las fosas crípticas aberrantes (FCA) obtenidas de los tratamientos con frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu	120
4.5 Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) con el tratamiento de frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu	129
5. Análisis molecular de genes y proteínas involucrados en el estadio temprano de cáncer de colon	139
5.1 Obtención de ARN	139
5.2 Síntesis de ADNc	139
5.3 RT-PCR	140
5.4 Expresión de proteínas involucradas en el estadio temprano de colon por Western Blot	152
5.4.1 Obtención de proteínas	152
6. Segundo bioensayo	159
6.1 Análisis de la incidencia de fosas crípticas aberrantes (FCA) por azul de metileno y hematoxilina & eosina (H&E)	159
6.2. Efecto de los polisacáridos de frijol común sobre el ciclo celular por citometría de flujo	169
6.3 Análisis de núcleos apoptóticos por TUNEL	171
VIII. CONCLUSIONES	176
IX. BIBLIOGRAFÍA	174
XI. ANEXOS	205
A. Soluciones para Western Blot	213

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Componentes presentes en el frijol	4
2.	Ejemplo de oncogenes, función de su proteína y tipo de neoplasia	25
3.	Ejemplo de genes supresores de tumores, función de su proteína y tipo de neoplasia	31
4.	Clasificación de acuerdo a la estructura química de los carcinógenos colónicos como lo sugiere la unión europea (UE) y la agencia internacional para investigación sobre el cáncer	58
5.	Oligonucleotidos de los diferentes genes involucrados en el proceso de carcinogénesis de colon	84
6.	Análisis bromatológico de muestras de harina de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad Negro 8025	92
7.	Rendimiento de polisacáridos totales y contenido de oligosacáridos en el extracto de polisacáridos (ep) de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido variedad Negro 8025	96
8.	Proporción de fibra dietética total en frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) de la variedad Negro 8025	98
9.	Contenido de almidón resistente total en frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) de la variedad Negro 8025	100
10	Cuantificación y validación de fenoles totales en diferentes extractos de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad Negro 8025	102

CUADRO	PÁGINA
11. Cuantificación y validación del método de flavonoides totales en diferentes muestras de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad Negro 8025	104
12. Análisis de la inducción de fosas crípticas aberrantes (FCA) con azoximetano (AOM) y el efecto del butirato de sodio (NaB) sobre estas	106
13. Consumo de agua y alimento de los grupos experimentales de butirato de sodio (NaBu) inducidos químicamente con azoximentano (AOM)	108
14. Ganancia de peso en los grupos experimentales de butirato de sodio (NaBu) inducidos químicamente con azoximentano (AOM)	108
15. Consumo de agua y alimento de los diferentes tratamientos de butirato de sodio (NaBu)	110
16. Ganancia de peso de las ratas con tratamiento de NaBu a diferentes concentraciones	110
17. Efecto del NaBu sobre el ph del contenido colónico, cecal y heces	112
19. Consumo de agua y alimento de los diferentes tratamientos de frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu con y sin AOM	117
20. Ganancia de peso de las ratas con tratamiento de frijol, extracto de polisacáridos (EP), NaBu con y sin azoximentano (AOM)	119

CUADRO		PÁGINA
21.	Efecto del frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu sobre el ph de contenido cecal, colónico y heces de ratas Sprague Dawley	119
22.	Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el contenido cecal, colónico y heces de los tratamientos de frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu	136
23.	Utilidad del gel de agarosa respecto a su concentración	209
24	Mezcla de reactivos para amplificación de los genes de interés por PCR	209
25.	Concentración de ARN de las zonas colónicas proximal y distal de los tratamientos de frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu por dos métodos de cuantificación	211
26.	Concentración de los geles para electroforesis	214
27.	Concentración de proteína en la zona proximal y distal del colon de los tratamientos de frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu por el método de Lowry	216

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Representación de un tanino condensado	9
2. Fermentación bacteriana	11
3. Estructuras de los oligosacáridos	17
4. Proceso general de carcinogénesis	22
5. Estructura de doce repeticiones armadillo de β -catenina	26
6. Esquema general de la función de pRb	32
7. Esquema de las diferentes fases del ciclo celular	36
8. Esquema de los procesos de necrosis y apoptosis de la célula	40
9. Esquema representativo de las proteínas que intervienen en el proceso de apoptosis	41
10. Esquema general de los componentes de la citometría de flujo	49
11. Cortes histológicos de colon tratados con el método de TUNEL	50
12. Histología del colon	51
13. Corte transversal de la mucosa colónica humana donde se observan las criptas de Lieberkühn	52
14. Representación de la carcinogénesis colorrectal	55
15. Metabolismo del azoximetano	60
16. Estrategia general del modelo <i>in vivo</i>	70
17. Identificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por cromatografía de gases	72
18. Fotografía representativa de las diferentes zonas de colon de rata	73
19. Ejemplo representativo del corrimiento de las proteínas por electroforesis SDS-PAGE	87
20. Cortes histológicos de la zona proximal de colon. En el recuadro se delimitan las fosas crípticas de cada uno de los grupos. A) Grupo control, B) Concentración de 1.2 mM de NaBu y C) Concentración de 10 mM de NaBu	113

FIGURA	PÁGINA
21. Número de fosas crípticas aberrantes (FCA) en las diferentes zonas colónicas.	122
22. Visualización de fosas crípticas aberrantes (FCA) con azul de metileno.	124
23. Efecto del frijol común (<i>P vulgaris</i> L.) cocido variedad Negro 8025, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu sobre fosas crípticas aberrantes (FCA) inducidas químicamente con azoximetano (AOM) en la zona proximal de colon.	125
24. Efecto del frijol común (<i>P vulgaris</i> L.) variedad Negro 8025 cocido, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu sobre fosas crípticas aberrantes (FCA) inducidas químicamente con azoximetano (AOM), en la porción distal de colon.	126
25. Visualización de fosas crípticas aberrantes (FCA) con tinción de Dapi	128
27. Expresión y normalización de los genes <i>β-catenina</i> y <i>p53</i> en la zona proximal del colon	144
28. Expresión y normalización de los genes <i>p21</i> y <i>rb</i> en la zona proximal del colon	146
29. Expresión y normalización de los genes <i>bcl-2</i> , <i>bax</i> y <i>caspasa 3</i> en la zona proximal del colon	148
30. Expresión y normalización de los genes <i>p53</i> y <i>β-catenina</i> en la zona distal del colon	150
31. Expresión y normalización de los genes <i>p21</i> y <i>rb</i> en la zona distal del colon	150
32. Expresión y normalización de los genes <i>bcl-2</i> , <i>bax</i> y <i>caspasa 3</i> en la zona distal del colon	152
33. Efecto de los tratamientos sobre la expresión de las proteínas p53, p21 y Rb-P, en la porción proximal del colon.	154
34. Efecto de los tratamientos sobre la expresión de las proteínas Bcl-2, Bax y Caspasa 3, en la porción proximal del colon	155

FIGURA	PÁGINA
35. Efecto de los tratamientos sobre la expresión de las proteínas p53, p21 y Rb-P en la porción distal del colon	157
36. Efecto de los tratamientos sobre la expresión de las proteínas Bcl-2, Bax y Caspasa 3 en la porción distal del colon	158
37. Efecto del extracto de polisacáridos (EP) sobre la inducción de fosas crípticas aberrantes (FCA) por análisis histológico con azul de metileno para ambas zonas colónicas	160
38. Fotografías representativas de fosas crípticas aberrantes (FCA) con azul de metileno.	167
39. Fotografías representativas de fosas crípticas aberrantes (FCA) con hematoxilina & eosina (H & E)	167
40. Efecto del extracto de polisacáridos (EP) sobre la inducción de fosas crípticas aberrantes (FCA) por análisis histológico con Hematoxilina & Eosina (H & E) para ambas zonas colónicas	168
41. Efecto del extracto de polisacáridos (EP) sobre las fases del ciclo celular e índice de proliferación celular por citometría de flujo	170
42. Efecto del extracto de polisacáridos (EP) sobre el número de núcleos apoptóticos por la técnica de TUNEL	173
43. Fotografías representativas de núcleos apoptóticos por técnica de TUNEL	174
44. Esquema del posible mecanismo de acción del extracto de polisacáridos (EP) sobre el estadio temprano de cáncer de colon	175
45. Curva de calibración mg equivalentes de rafinosa	205
46. Curva de calibración de mg (+)-catequina	206
47. Curva de calibración de flavonoides totales, expresado en µg equivalentes de rutina	207
48. Curva de calibración de ácidos grasos de cadena corta	208
49. ARN de las zonas estudiadas (proximal y distal) de los tratamientos de frijol, EP y NaBu	210

FIGURA	PÁGINA
50. Ejemplo de la optimización de ciclos para ADNc	212
51. Optimización de ciclos para ADNc en cada una de las muestras	212
52. Visualización de la concentración de ARN utilizado de los diferentes tratamientos de frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu tanto de la zona proximal como de la zona distal	213
53. Curva de calibración de albúmina sérica bovina para proteína	215

ABREVIATURAS

Ácidos grasos de cadena corta	AGCC
Extracto de polisacáridos	EP
Fosas crípticas aberrantes	FCA
Almidón resistente	AR
Almidón resistente tipo 1	AR1
Almidón resistente tipo 2	AR2
Almidón resistente tipo 3	AR3
Aflatoxina B ₁	AFB₁
Azoximetano	AOM
1,2-dimetilhidrazina	1,2-DMH
Butirato de sodio	NaBu
Fructo-oligosacáridos	FOS
Galacto-oligosacáridos	GOS
Gliceraldehido 3-Fosfato Deshidrogenasa	GADPH
Factor de necrosis tumoral	TNF
Citocromo C	Cyt C
Factor activador de proteasa apoptótica 1	Apaf 1
Tinción de Hematoxilina-Eosína	H & E
Carcinogénesis colorrectal	CCR
Poliposis Adenomatosa Familiar	FAP
Cáncer colorrectal hereditario no polipoideo	HNPCC

I. INTRODUCCIÓN

Dentro de la dieta del mexicano se encuentran una gran cantidad de alimentos a los que se les han atribuido propiedades nutraceuticas. El término alimento nutraceutico se refiere al alimento completo o parte del mismo que presenta beneficios a la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades, además de las funciones nutricionales básicas (Morrissey, 2002).

Entre los alimentos de mayor consumo para los mexicanos, destacan el maíz y el frijol (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2002). Al frijol se le han atribuido propiedades quimioprotectoras ya que contiene compuestos como: fibra dietaria, oligosacáridos y fenoles (taninos condensados, flavonoides), inhibidores de tripsina, lectinas, entre otros. A estos compuestos se les han demostrado propiedades antimutagénicas y anticarcinogénica, y que al ser ingeridos en la dieta reducen el riesgo de desarrollar enfermedades crónico-degenerativas (Sandberg, 2000; Bourdon *et al.*, 2001; Serrano y Goñi, 2004). Además, se ha informado que existe una relación directa entre el consumo de frijol (incorporando el 0.4% en la dieta) y una menor incidencia de cáncer de colon (Ríos *et al.*, 2007) y esto se ha atribuido principalmente a su contenido de carbohidratos, los que constituyen del 55 al 65% del peso total del grano (Bravo *et al.*, 1998). Dentro de éstos, se encuentran la fibra soluble e insoluble, el almidón resistente y los oligosacáridos (Bravo *et al.*, 1998), que pasan al tracto colónico sin sufrir una degradación enzimática, y que ahí pueden ser fermentados por la flora asociada. Como resultado de esta fermentación se tiene la producción de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato principalmente), con funciones importantes a nivel del colon como lo es la disminución del pH, la aportación de energía a los enterocitos (García-Peris *et al.*, 2002; Kles y Chang, 2006).

De estos ácidos grasos de cadena corta producidos por las bacterias a nivel del colon, al ácido butírico se le han atribuido propiedades anticarcinogénica considerándose el principal componente protector. Estudios han demostrado que el ácido butírico inhibe la proliferación celular bloqueando la célula en puntos de

restricción a lo largo del ciclo celular, induciendo diferenciación y apoptosis, así como modulación de la expresión genética como oncogenes y genes supresores de tumores (p21 y Rb) (Bravo *et al.*, 2000). Además, este ácido también induce enzimas detoxificantes como la glutatión S-transferasa y disminuye la expresión de enzimas colónicas como la β -glucuronidasa (Pool-Zobel *et al.*, 2005), evitando la inducción de células cancerosas.

Por otro lado, cabe resaltar que el cáncer representa un problema de salud pública. A nivel mundial, constituye una de las principales causas de muerte. En los Estados Unidos de Norte América es la segunda causa de muerte; se presenta con mayor frecuencia en el hombre, y el 90% de los casos se diagnostica después de los 50 años de edad (Murillo *et al.*, 2004). En México, el cáncer representa la tercera causa de muerte, y, a pesar del gran esfuerzo por mejorar el tratamiento y encontrar una cura, la mortalidad debida a esta enfermedad no ha disminuido. Dentro de los diversos tipos de cáncer, el cáncer de colon representa el 5 y 4.6% de muertes en México, para hombres y mujeres respectivamente (INEGI, 2008).

Debido al incremento de muertes por cáncer de colon en México y considerando los informes en la literatura de que las leguminosas contienen agentes con propiedades quimioprotectoras y que dentro de estas leguminosas se encuentra el frijol, se consideró importante evaluar la capacidad anticarcinogénica de frijol y algunos de sus componentes involucrados. Los resultados de esta investigación permitirán conocer la relación existente entre el consumo de esta leguminosa sobre la incidencia del cáncer, específicamente el de colon, por medio de modelos experimentales que permitan establecer el posible mecanismo de acción y su implementación en el tratamiento y prevención en estadios tempranos de esta patología.

II. ANTECEDENTES

1. Frijol común

1.1 Generalidades

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una planta originaria de América Latina, específicamente de las regiones mesoamericanas (desde el norte de México hasta Costa Rica) y andina (del norte de Perú al noroeste de Argentina). Su uso con características domésticas data de hace siete mil años aproximadamente (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998; Paredes-López *et al.*, 2006).

En nuestro país, existe una gran diversidad de variedades de frijol; dicha diversidad responde a la geografía del consumo del mismo. Por ejemplo: en la zona norte se prefieren las variedades bayo, pinto y azufrados; en la zona centro del país consumen frijoles de todos los tipos, colores y tamaños, y en el sureste prefiere los frijoles negros (Lepiz y Navarro, 1983; Castellanos *et al.*, 1997).

1.2 Composición química

El frijol, junto con el maíz, es un alimento básico en la dieta del mexicano, aportando la mayoría de sus proteínas y carbohidratos. Los carbohidratos constituyen la fracción principal de estos granos (del 55 al 65% del peso seco en promedio). De ellos, los polisacáridos (fibra dietética) son los principales constituyentes, con cantidades pequeñas pero significativas de oligosacáridos (Bravo *et al.*, 1998). El frijol es rico en fibra y se le considera una buena fuente de vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6 y ácido fólico) así como de algunos minerales (calcio, magnesio, hierro, fósforo, potasio y zinc) y de grasas insaturadas (Reyes-Moreno y Paredes-López, 1993). Compuestos como la fibra y oligosacáridos son componentes con propiedades antioxidantes fuertemente relacionadas con beneficios a la salud (Cuadro 1).

Cuadro 1. Componentes presentes en el frijol

COMPONENTES	CONTENIDO	COMPONENTES	CONTENIDO
Proteína (%)	14-33	Lípidos (%)	1.5-6.2
		Ácidos Grasos (%)	
		Linoleico	21-28
		Linolénico	37-54
Carbohidratos (%)	52-76	Cenizas (%)	2.9-4.5
Fibra total(%)	14-19	Vitaminas (mg/100g)	
Frijol crudo		Ácido Fólico	0.17-0.58
Fibra insoluble	10.1-13.4	Tiamina (B1)	0.86-1.14
Fibra soluble	3.1-7.6	Riboflavina (B2)	0.14-0.27
Frijol cocinado		Niacina (B3)	1.16-2.68
Fibra insoluble	13.4-22.9	Piridoxina (B6)	0.34-0.64
Fibra soluble	3.1-7.0		
Oligosacáridos (%)		Otros componentes	
Rafinosa	0.19-0.22	Ácido Fítico (%)	0.6-2.7
Estaquiosa	1.84-2.45	Taninos (mg eq cat /g)	9.6-131.4
		Inhibidores de Tripsina (UIT/mg)	13-29

Miligramos equivalentes de catequina por gramo (mg eq cat/g)

Unidades de inhibición de tripsina por miligramo (UIT/mg)

(Modificado de: Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998; Paredes-López *et al.*, 2006)

A pesar de que el frijol es una fuente de aminoácidos aromáticos (lisina, leucina, e isoleucina), es deficiente en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), valina, triptofano y treonina (Blanco y Bressani, 1991; Serrano y Goñi, 2004; Paredes-López *et al.*, 2006). Sin embargo, debido a que el frijol se consume habitualmente con tortillas de maíz (ración diaria: 30 g de frijol con 100 g de maíz), se obtiene con ello una complementación proteínica para el humano, ya que la ingesta diaria de proteínas recomendada es de 1.2 g/kg de peso para un adulto (Torun *et al.*, 1996). Por otra parte, el frijol aporta el 34.4%, 19.1% y 15.9% de las cantidades diarias recomendadas de ácido fólico, hierro y zinc respectivamente, nutrientes que generalmente se encuentran deficientes entre la población (Serrano y Goñi, 2004).

1.3 Compuestos biológicamente activos en frijol

El frijol es también una fuente rica de numerosos fitonutrientes que actualmente han despertado mayor interés debido a sus propiedades biológicas y que se reflejan en beneficios a la salud. Entre las propiedades biológicas se pueden citar: antioxidantes, antimutagénicas y anticarcinogénicas (Cardador-Martínez *et al.*, 2002a, 2002b; Hangen y Bennink, 2002; Aparicio-Fernández *et al.*, 2005; Heimler *et al.*, 2005).

1.3.1 Compuestos fenólicos

El término compuesto fenólico se usa para designar a un grupo de sustancias que poseen uno o más sustituyentes hidroxilo (OH) enlazados a un anillo bencénico. A los compuestos que tienen varios anillos aromáticos hidroxilados se les conoce como polifenoles. Por sus características se puede clasificar a los fenoles en distintos subgrupos entre los que podemos destacar: ácidos fenólicos, ligninas, flavonoides, auronas, cumarinas y taninos (Ho, 1992; Shahidi y Naczk, 1995).

1.3.1.1 Fenoles

Los fenoles se encuentran ampliamente distribuidos en los alimentos, principalmente los de origen vegetal. Datos de la literatura indican que los fenoles se

encuentran en su mayor parte en las semillas de ciertos cultivos pigmentados, como sorgo y algunas leguminosas, como el frijol (Deshpande y Cheryan, 1987; Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998).

González de Mejía *et al.* (1999) informaron que los compuestos fenólicos presentes en la cascarilla de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), variedad Flor de Mayo, inhibieron la mutagenicidad inducida por los mutágenos 1-nitropireno (1-NP) y benzo (a)-pireno (B(a)P) mediante el ensayo de Ames. Estos autores sugieren que la inhibición podría ser interactuando directamente con los agentes fenólicos, con el metabolito mutagénico o formando un complejo compuesto fenólico-B(a)P y/o sus metabolitos. Cardador-Martínez *et al.* (2002a, b) demostraron la actividad antimutagénica contra la mutagenicidad inducida por aflatoxina B₁ (AFB₁) en el ensayo de microsuspensión y la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos presentes en la cascarilla de frijol común (*P. vulgaris* L). También se ha informado que el almacenamiento y tratamiento térmico de frijol disminuyen la concentración de compuestos fenólicos, debido a que éstos se pueden acomplejar con proteínas u otros constituyentes, sin embargo, conservan en aproximadamente un 30% su propiedad antimutagénica (Aparicio-Fernández *et al.*, 2005).

Otro ejemplo de los compuestos biológicamente activos presentes en el frijol son las antocianinas, las cuales tienen un interés médico. Se ha propuesto que inducen el arresto al ciclo celular e inducen apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon humano (Zhao *et al.*, 2004); además presentan propiedades antioxidantes contra radicales peroxilo (Takeoka *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997). Estos oxidantes podrían ser un factor importante en el desarrollo de un gran número de enfermedades incluyendo el cáncer (Ames *et al.*, 1993). Los antioxidantes pueden neutralizar radicales libres, por lo tanto son de importancia central en la prevención de estas enfermedades (Wang *et al.*, 1997).

1.3.1.2 Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos de las plantas sintetizados a partir de la fenilalanina (Harborne y Turner, 1984) y que generalmente producen un color llamativo en las partes florecientes de las plantas (Clifford y Cuppett, 2000).

Entre los compuestos fenólicos, los flavonoides (ej. catequina, epicatequina, etc.) son los más comunes. Comprenden más de 3000 compuestos, incluyendo antocianinas (255), isoflavonoides (630), y flavonas y flavonoles (1660) (Aherne y O'Brien, 2002). Han sido referidos como un componente semi-esencial de los alimentos. En años recientes, han recibido atención considerable debido a sus habilidades para inhibir el ciclo celular, la proliferación celular, y el estrés oxidativo, e inducir la destoxificación de enzimas, la apoptosis, y la activación del sistema inmune (Birt *et al.*, 1999).

Son compuestos protectores o defensores de la planta, protegiéndola de insectos y ataques patógenos, o radiaciones UV, proveyendo protección antioxidante, o guiando a los polinizadores (Wildman, 2001; Havsteen, 2002). No pueden ser sintetizados por los humanos ni por los animales (Cook y Samman, 1996), por lo que son parte integral de la dieta (Harborne y Turner, 1984; Clifford y Cuppett, 2000).

Los flavonoles son los flavonoides más abundantes en los alimentos, y de éstos, los más comunes son la quercetina, el kaempferol y miricetina. (Marchand, 2002).

La actividad biológica de los flavonoides presentes en el frijol común incluye la antimutagenicidad en contra de la aflotoxina B1 (González de Mejía *et al.*, 1999; Cardador-Martínez *et al.*, 2002a), actividad antioxidante (Oomah *et al.*, 2005; Galvez-Ranilla *et al.*, 2007), y un efecto antiproliferativo en líneas de células cancerígenas (Dong *et al.*, 2007).

1.3.1.3 Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos de peso molecular entre 400 y 3,000 Da (Bravo, 1998) y son solubles en agua. Estos difieren de otros compuestos por algunas características especiales, tales como la capacidad de precipitar proteínas en solución y también pueden formar complejos con ciertos tipos de polisacáridos, ácidos nucleicos y alcaloides (Shahidi y Nackz, 1995., Gu *et al.*, 2003).

La importancia de los taninos en relación con las plantas, radica en su efectividad como compuestos repelentes contra predadores, ya sea insectos o microorganismos; ya que debido a ésto se impide que los depredadores (como: ácaros) invadan los tejidos vegetales por precipitación de proteínas salivales al acomplejarse con los compuestos polifenólicos, lo mismo ocurre con los microorganismos, puesto que estos compuestos inmovilizan sus enzimas extracelulares impidiendo la invasión (Yoque, 1969).

Los taninos, desde el punto de vista estructural, han sido clasificados para su mejor estudio en 4 grupos (Khanbabaee, 2001; Santana *et al.*, 2002), que comprenden: 1) Hidrolizables, 2) Complejos, 3) Florotaninos y 4) Condensados que son de interés en el presente trabajo.

Esta clasificación basada en consideraciones estructurales, también presenta una subdivisión basada en su origen biogénético; las proantocianinas son el producto de la vía de biosíntesis de flavonoides (cinaniato) y los galotaninos y elagitaninos derivados ambos de la vía del shikmato (Shahidi y Nackz, 1995; Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

1.3.1.2.1 Taninos condensados

Los taninos condensados están compuestos por un polímero cuyo núcleo es un Flavan-3-ol en el que las ligaduras interflavonas se encuentran generalmente de C-4 a C-8 o de C-4 a C-6 (Figura 1).

Los taninos condensados son los más difundidos de la naturaleza y su diversidad y complejidad estructural es la mayor entre todos los grupos conocidos.

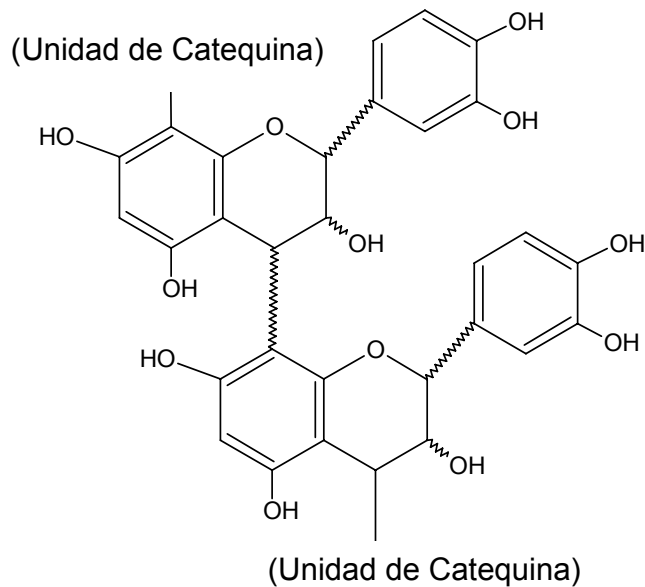


Figura 1. Representación de un tanino condensado.

1.3.2 Fibra dietaria

El frijol está ubicado entre las principales fuentes conocidas de fibra dietaria, y contiene cantidades significativas tanto de fibra soluble como insoluble. El frijol cocido contiene en promedio un 4.5% y 22.6% de fibra dietaria soluble e insoluble, respectivamente (Hunghe *et al.*, 1996; Herrera *et al.*, 1998). En la fracción de fibra están incluidos los componentes propios de la fibra (polisacáridos no amiláceos y lignina) y otros compuestos asociados como por ejemplo los taninos. Todos estos

componentes, junto con almidón resistente, oligosacáridos no digeribles y otros componentes del frijol que no son digeridos en el intestino delgado, constituyen la fracción indigestible del alimento, los cuales pueden ser fermentados por la microflora colónica (Saura-Calixto *et al.*, 2000), originándose ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

El consumo de frijol como fuente de fibra produce una mayor saciedad, debido a varias causas: mayor volumen de alimentos, mayor tiempo de digestión. Lo anterior conlleva una mayor sensación de plenitud intestinal, niveles elevados de fibra, y esta última se ha relacionado con disminución en los niveles plasmáticos de glucosa e insulina (Bourdon *et al.*, 2001). Recientemente, hallazgos científicos sugieren que altos niveles de insulina en la sangre (Giovannucci, 1995; Shandu *et al.*, 2002) inducidos por los niveles de glucosa en sangre (McKeown-Eyssen, 1994) promueven el cáncer de colon. Estos estudios sugieren que la ingesta de frijol disminuye los niveles de insulina y glucosa en sangre y que éste podría ser el mecanismo por el cual el frijol disminuye a su vez el cáncer de colon.

1.3.3 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

El proceso de fermentación de la fibra en el colon es fundamental para los enterocitos. Gracias a dicho proceso se produce el mantenimiento y el desarrollo de la flora bacteriana, así como de las células epiteliales. El resultado de esta fermentación bacteriana, es la producción de hidrógeno, dióxido de carbono, metano y los ácidos grasos de cadena corta (AGCC): acético, propiónico y butírico, en una proporción molar casi constante 60:25:15 (Millar y Wolin, 1979; Nordgaard y Mortensen, 1995; Mateu de Antonio, 2004).

Los AGCC se generan en el metabolismo del ácido pirúvico producido por la oxidación de la glucosa a través de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof (Wolin y Millar, 1983). Existen dos vías para la metabolización del piruvato. En una de ellas se genera propionato a través del succinato. En la otra vía se convierte el piruvato en

acetil CoA que posteriormente es hidrolizado para formar acetato o reducido para producir butirato (Figura 2) (García-Peris *et al.*, 2002).

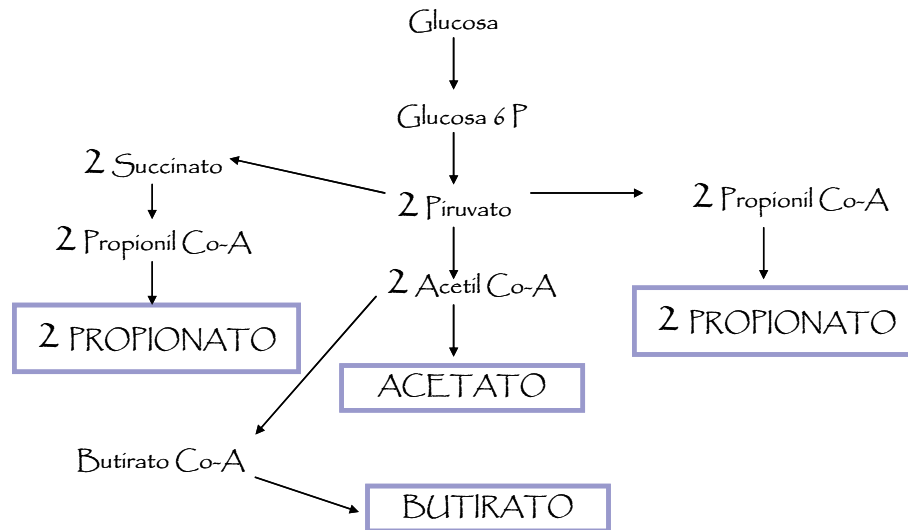


Figura 2. Fermentación bacteriana (García-Perris *et al.*, 2002)

Los principales AGCC obtenidos en la fermentación colónica de la fibra representan el sustrato energético fundamental del enterocito. Las concentraciones luminares de los mismos son altas en el ciego y el colon ascendente, donde las concentraciones de la microflora también son altas, siendo los niveles de pH bajos en esta zona (5.4 – 5.9), niveles que se van incrementando distalmente de 6.6 a 6.9 (Velázquez *et al.*, 1996b).

El ácido butírico y los otros AGCC contribuyen en un 80% a los requerimientos energéticos del enterocito y en un 5-10% al total de los requerimientos energéticos del individuo (McNeil, 1984).

Una vez absorbidos los AGCC, son metabolizados por el epitelio colónico. Diversos estudios han demostrado que el orden de utilización de los AGCC por el enterocito es butírico>acético>propiónico (Roediger, 1982; Henningsson *et al.*, 2001).

La mayoría del butírico (aproximadamente el 90%) y entre el 10-15% del propiónico es metabolizado por la mucosa colónica. El remanente del propiónico y el acético alcanzan el hígado. El propiónico será utilizado como sustrato para la gluconeogénesis y el acético será metabolizado, dando lugar a glutamina y los cuerpos cetónicos acetoacetato y β -hidroxibutirato (Rombeau y Kriple, 1990). Éstos alcanzarán el intestino delgado, siendo los principales sustratos energéticos del enterocito, fundamentalmente, la glutamina. Sin embargo, el orden de utilización de todos estos sustratos por el enterocito, según se ha demostrado en estudios *in vitro*, es butírico>acetoacetato>glutamina>glucosa (Lupton y Kurtz, 1993; Inan *et al.*, 2000; Cumming *et al.*, 2001).

De los tres AGCC, el butírico es el que tiene mayor efecto sobre la mucosa. Los mecanismos por los cuales tiene lugar este efecto son: aporte directo de energía, aumento del flujo sanguíneo del colon, incremento de la secreción pancreática y de otras hormonas gastrointestinales y estimulación del sistema nervioso autónomo (Gee *et al.*, 1996).

El principal papel del butírico en relación con su propiedad antitumoral radica en sus efectos sobre el crecimiento, la diferenciación y el proceso de apoptosis de los enterocitos. Detiene el crecimiento de los enterocitos neoplásicos en una gran variedad de líneas celulares derivadas de cáncer de colon (Bravo *et al.*, 2000).

Por otro lado, el epitelio colónico es un sistema dinámico con células madre localizadas en la base de la cripta colónica que proliferan y migran hacia la superficie de la misma, donde se diferencian, hasta la muerte celular por apoptosis. El proceso de la carcinogénesis rompe esta migración ordenada, de manera que las células continúan la proliferación y migración hacia la superficie de las criptas, no presentando las características de diferenciación normal y, ocasionalmente, invadiendo la membrana basal (Higgins, 1989; Batlle *et al.*, 2002).

Los mecanismos que regulan la proliferación, la diferenciación y la apoptosis están intrínsecamente programados. Sin embargo, estos procesos también están sujetos a la modulación por factores externos como los AGCC. El ácido butírico a concentraciones fisiológicas de 1-10 mmol/mL, detiene el crecimiento de los enterocitos neoplásicos en la fase G₁ del ciclo celular en múltiples líneas celulares en cultivo e *in vivo*, donde el estudio es más limitado (Young y Gibson, 1994; Velázquez *et al.*, 1996a, 1996b; Rouet-Benzineb *et al.*, 2004; Young-Ho *et al.*, 2004; Li y Elsasser, 2005). Así mismo, el ácido butírico induce la expresión de marcadores de diferenciación tanto *in vitro* como *in vivo*. Este compuesto aumenta la actividad de enzimas de la membrana plasmática, como la fosfatasa alcalina y la dipeptidil peptidasa IV (Heerdt *et al.*, 1994; Rouet-Benzineb *et al.*, 2004; Young-Ho *et al.*, 2004).

También se ha informado que el ácido butírico bloquea la proliferación celular neoplásica al modificar la expresión de algunos genes implicados en el proceso de transmisión de señales: inhibe los protooncogenes *ras*, *src* y *c-myc* e induce la expresión de los protooncogenes *c-fos* y *c jun* (Hague *et al.*, 1993; Souleiman y Asselin, 1993; Rouet-Benzineb *et al.*, 2004).

Por otra parte, se ha informado que el ácido butírico induce apoptosis, un acontecimiento importante para la detención del proceso de carcinogénesis del colon. Esta apoptosis es independiente de p53 y existen evidencias de que ocurre como etapa final del proceso de diferenciación. El ácido butírico aumenta la expresión de Bax en algunas líneas celulares, mientras que en otras disminuye los valores de Bcl-2, lo cual produce una disminución de la relación Bcl-2/Bax que puede estar implicada en la promoción de la apoptosis (Hague *et al.*, 1993; Hague *et al.*, 1997).

En lo que respecta a los AGCC aportados por el frijol, Bednar *et al.* (2001) informan que cada gramo materia fermentable de frijol produce 7.24 mmol de AGCC, con un perfil de fermentación acético:propiónico:butírico de 71:12:17. Estos AGCC,

como ya se mencionó, ejercen efectos fisiológicos sistémicos y locales que repercuten sobre el metabolismo lipídico y colónico (Goñi y Martín-Carron, 2001). El ácido propiónico se relaciona con la disminución de colesterol plasmático debido a la inhibición de la colesterogénesis. El ácido butírico como ya se mencionó aporta energía a los enterocitos, induce apoptosis e inhibición del crecimiento de las células cancerígenas (Meyer y Tunland, 2001), así como diferenciación de células colónicas tumorales (Siavosian *et al.*, 2000). También, genera inhibición de la proliferación celular por arresto de la fase G1 del ciclo celular, además de modular la expresión de múltiples genes, incluidos algunos de los oncogenes y genes supresores implicados en la carcinogénesis colorectal, considerándose un componente protector de las dietas ricas en fibra (Bravo *et al.*, 2000). Por otra parte, Pool-Zobel *et al.*, (2005) han reportado que el ácido butírico induce enzimas de detoxificación, contribuyendo a la inducción del sistema de defensa toxicológico en procesos carcinogénicos.

Debido a que los AGCC son generados a nivel del colon por las bacterias de esta zona, una medida indirecta de la formación de éstos es el pH en el contenido colónico o bien en las heces. Al generarse la fermentación de los compuestos, el pH disminuye, generando acidificación del medio; estas condiciones son apropiadas para aumentar el desarrollo de bacterias como las *Bifidobacterias* y *Lactobacterias* (Kulkarni y Reddy, 1994). Además se ha informado que en las condiciones acidificadas en el medio, se genera inhibición de ciertas enzimas como la β -glucuronidasa (enzima indispensable para la desconjugación del ácido glucurónico en el colon), evitando de esa manera la formación de algunos metabolitos genotóxicos (Mc Bain y Macfarlane, 1998; Andlauer *et al.*, 2000).

1.3.4 Almidón resistente

Los carbohidratos constituyen la fracción principal en los granos del frijol, 55 a 65% del peso seco en promedio. De ellos, el almidón y otros polisacáridos (fibra dietética) son los principales constituyentes, con cantidades significativas de oligosacáridos (Bravo *et al.*, 1998). El almidón es el carbohidrato disponible en la dieta humana (Bjorck *et al.*, 1994; Skrabanja *et al.*, 1999) que es absorbido en el

intestino delgado. Sin embargo, una fracción del almidón resiste la hidrólisis por las enzimas digestivas humanas, sigue su tránsito y llega al intestino grueso donde puede ser fermentado por la microflora del colon. Esta fracción llamada almidón resistente (AR), se define como la suma del almidón y los productos de la degradación del almidón no absorbidos en el intestino delgado de individuos sanos (Asp, 1992). AR se puede clasificar en: AR1 que corresponde a los almidones inaccesibles (Englyst *et al.*, 1992; Tovar *et al.*, 1992a), AR2 que está integrado por gránulos nativos de almidón cuya cristalinidad los hace menos susceptibles a la hidrólisis enzimática (Englyst y Cummings, 1987; Faisant *et al.*, 1995) y AR3 que son fracciones de almidón retrogrado, formadas en alimentos cocinados y almacenadas o a temperatura ambiente o baja (Noah *et al.*, 1998). Las leguminosas entre las que se encuentran el frijol contienen cantidades considerables de AR1 y AR3 (Englyst *et al.*, 1992; Tovar *et al.*, 1992a).

La velocidad y tasa de digestión del almidón, así como el contenido de AR en el alimento, afectan diversas funciones fisiológicas como lo son: retraso en el vaciamiento gástrico y disminución de los niveles de glucosa en sangre, lo que repercute en efectos benéficos en la salud como anticancerígeno, hipoglucémico, hipocolesterolémico (Jenkins *et al.*, 1987; Cassidy *et al.*, 1994; De Deckere *et al.*, 1995; Asp *et al.*, 1992).

El frijol cocido contiene cantidades significativas de AR en comparación con los cereales, tubérculos y frutas inmaduras, independientemente del procesamiento (Jenkins *et al.*, 1982; Tovar y Melito, 1996; Velasco *et al.*, 1997). Por tanto, la velocidad de digestión del almidón y la liberación de glucosa a la sangre es lenta después de ingerir el frijol, lo que a su vez reduce la respuesta glucémica e insulinémica después de comer (Jenkins *et al.*, 1982, 1987; Tovar *et al.*, 1992b).

1.3.5 Oligosacáridos

Los oligosacáridos son polímeros de hasta 20 unidades de monosacáridos. La unión de los monosacáridos tiene lugar mediante enlaces glicosídicos. Los más

abundantes son los disacáridos (oligosacáridos formados por dos monosacáridos, iguales o distintos). Los oligosacáridos son parte de los glicolípidos y glicoproteínas que se encuentran en la superficie externa de la membrana plasmática y, por lo tanto, tienen una gran importancia en las funciones de reconocimiento en superficie (Carlsson *et al.*, 1992; Albert *et al.*, 2000).

Los oligosacáridos no son digeribles por las enzimas intestinales presentes en la superficie luminal del intestino delgado, por lo que alcanzan en forma intacta el colon (Coon *et al.*, 1990). En esta categoría se encuentran los fructo-oligosacáridos (FOS), que son oligosacáridos naturales (fibra soluble) que contienen fructosa y se encuentran en una gran variedad de plantas y frutos como el puerro, la cebolla, la achicoria (col), el espárrago, el ajo, la alcachofa, el tomate, la alfalfa, el frijol, el plátano, entre otros (Saini, 1989).

Los oligosacáridos se pueden clasificar en:

- Fructo-oligosacáridos (FOS): kestosa, nistosa, fructofuranosilnístosa
- Galacto-oligosacáridos (GOS)

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa, también conocidos como α -galactósidos, están formados por residuos α -D-galactopiranosil unidos por la unidad glucosa de la sacarosa (Figura 3). Estos compuestos no son digeridos por el hombre debido a la ausencia de la enzima α -1,6-galactosidasa en la mucosa intestinal (Irish *et al.*, 1995). Estos oligosacáridos de la rafinosa pasan al colon y son fermentados por las bacterias intestinales produciendo gran cantidad de gases. A estos compuestos en los noventa se les definió como antinutricios, debido a que reducen la digestibilidad de las proteínas (Vidal-Valverde *et al.*, 1993; Costa de Oliveira *et al.*, 2001).

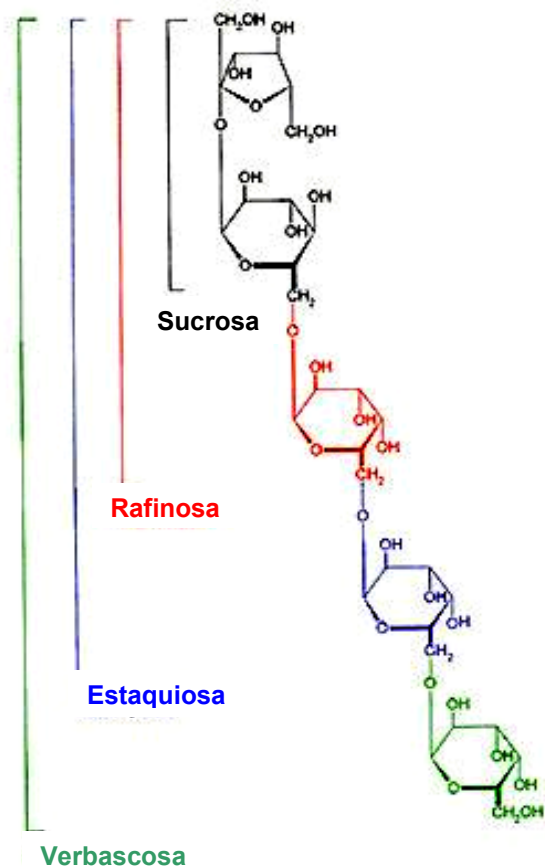


Figura 3. Estructuras de los oligosacáridos (www.cellscience.com)

De acuerdo con Carlsson *et al.* (1992), los α -galactósidos tienen un efecto favorable sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos similar al de la fibra ingerida en la dieta. Sin embargo su efecto fisiológico ha sido poco estudiado.

Actualmente algunos oligosacáridos están siendo muy utilizados como ingredientes alimentarios en formulación de alimentos nutracéuticos y concretamente como ingredientes prebióticos. Estos oligosacáridos con efectos beneficiosos para la salud tienen características específicas en relación con los procesos de digestión, absorción, fermentación y metabolismo:

1. No se digieren y/o absorben en el intestino delgado.

2. Alcanzan el intestino grueso donde llegan disponibles para ser degradados por las bacterias del colon (Howlard *et al.*, 1995; Meyer y Tunland, 2001).

Oligosacáridos, como los fructo-oligosacáridos (FOS), los oligosacáridos de soya (que contienen rafinosa y estaquiosa), los xilooligosacáridos, los galactooligosacáridos y la lactulosa tienen la propiedad de no ser digeridos por lo que alcanzan el intestino grueso donde tienen efecto sobre la microflora intestinal (Rumner y Rowland, 1995).

Las bacterias intestinales metabolizan estos oligosacáridos rápidamente y producen ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como el ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, bióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) e hidrógeno (H₂). Los AGCC son absorbidos por el intestino grueso y posteriormente metabolizados, ocasionando una baja del pH en el lumen del intestino grueso hasta valores más ácidos (Treviño *et al.*, 1990). Este cambio de pH favorece el desarrollo y/o la proliferación de bacterias benéficas, como las especies *Bifidobacterias* y *Lactobacillus*, que son resistentes al medio ácido, mientras que las bacterias perjudiciales, como el *Clostridium*, son sensibles a las condiciones ácidas. Por lo tanto, la proliferación de *Bifidobacterias* y otras bacterias es estimulada y las de las bacterias perjudiciales se ve alterada (Treviño *et al.*, 1990).

Por otra parte, varios estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que la ingestión de carbohidratos no digeribles (FOS y/o inulina) mejoran la absorción de calcio y magnesio (Leske *et al.*, 1993). De acuerdo con los estudios de Wargovich *et al.* (1990) y Pereira *et al.* (1994), la absorción de minerales como el calcio y el magnesio, se asocia con la disminución del pH en el intestino grueso, lo que ayuda a disminuir la formación de fosas crípticas aberrantes (FCA) y tumores en ratas.

Aunque existen investigaciones relacionadas con los beneficios que aportan los oligosacáridos, son escasos los trabajos enfocados a la relación existente entre los oligosacáridos provenientes del frijol (que corresponden aproximadamente al 30%

del total de fibra insoluble) y el cáncer de colon. Por consiguiente hay un considerable interés en conocer la potencialidad de los oligosacáridos para conferir protección contra el cáncer de colon, debido a que estos compuestos incrementan la fermentación de bacterias a lo largo del intestino grueso y con ello generan beneficios contra el cáncer. Es por ello de gran importancia conocer los mecanismos de acción por medio de los cuales estos fitonutrientes presentes en el frijol pueden estar actuando sobre el cáncer de colon.

2. Cáncer

Al cáncer se le puede definir como el trastorno de los mecanismos que controlan la proliferación y la diferenciación de las células en los organismos pluricelulares (Torroella y Villa-Treviño, 1998, Clayson, 2000).

El término cáncer ampara más de 100 formas de la enfermedad, de acuerdo al tejido afectado; incluso dentro de un mismo tejido podemos encontrar diversas variedades de cáncer con distinta morfología y grado de malignidad (Gariglio y Orozco, 2000).

Las células cancerosas están definidas por dos propiedades hereditarias: 1) se reproducen a pesar de las restricciones normales, y 2) invaden y colonizan territorios normalmente reservados para otras células. Una célula anormal aislada que no prolifere más que sus vecinas normales, no produce daño significativo, pero si su proliferación está fuera de control producirá un tumor o neoplasma. Si las células neoplásicas permanecen agrupadas se dice que el tumor es benigno, cuando las células neoplásicas invaden el tejido circundante se considera maligno. La capacidad de invadir implica la habilidad de liberarse, entrar en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos y formar tumores secundarios o generar metástasis en otros lugares (Folkman y Hanahan, 1991; Behrens *et al.*, 1992; Hanahan y Weinberg, 2000; Folkman, 2002).

2.1 Clasificación del cáncer

El cáncer se clasifica de acuerdo con el tejido y el tipo de células de donde se origina: carcinomas de las células epiteliales, sarcomas de las células musculares, leucemias de las células hematopoyéticas, linfomas de las células del sistema inmunitario y gliomas de las células del sistema nervioso central (Albert *et al.*, 2000).

Las mutaciones que afectan la expresión genética se consideran como un rasgo común de todos los cánceres, dando lugar a la existencia de dos tipos de casos: a) los hereditarios si la mutación incide en la línea germinal y se hereda, y b) los esporádicos si la mutación aparece en las células somáticas.

Una única mutación no es suficiente para convertir una célula sana típica en una célula cancerosa que prolifere sin restricciones, porque en realidad la génesis del cáncer requiere que se produzcan en la misma célula varios accidentes independientes y raros. En la mayoría de los tipos de cáncer, la incidencia se incrementa abruptamente con la edad, de modo que conforme el promedio de vida de las personas se incrementa, un mayor número de tumores cancerígenos se desarrollan (Klein, 1998; Chau y Wang, 2003).

El cáncer por consiguiente es un proceso multifase que requiere de varios eventos mutacionales independientes para que suceda una transformación neoplásica (Díaz *et al.*, 1998). Hanahan y Weinberg (2000) consideran que las células cancerosas tienen seis características: ignoran las señales que controlan la proliferación celular, así como las que promueven la diferenciación, adquieren capacidad para sostener la proliferación celular, evaden la apoptosis, poseen capacidad invasiva y angiogénica. Estas características dan como resultado los siguientes eventos: a) iniciación, b) promoción, c) progresión, e d) invasión y metastasis, que son los pasos del proceso de carcinogénesis (Barrera *et al.*, 2003).

2.2 Proceso de carcinogénesis

La carcinogénesis es un proceso complejo de varios pasos, presumiblemente involucrando una gran cantidad de eventos que ocurren a nivel celular, molecular y morfológico. El proceso entero puede ser dividido en varias etapas principales: iniciación, promoción, progresión, invasión y metástasis. La definición exacta de cada etapa podrá ser posible sólo cuando se conozca precisamente los puntos clave que abarca cada etapa. La velocidad con que el proceso de carcinogénesis se desarrolla está dada por los agentes mutagénicos (iniciadores tumorales), así como por ciertos agentes no mutagénicos (promotores tumorales), los cuales afectan a la expresión génica, estimulan la proliferación celular y alteran el equilibrio homeostático de las células mutadas y no mutadas (Sherr, 2000; Mathers, 2002).

Los promotores tumorales pueden ocasionar cáncer con una frecuencia alta, sólo si se aplican después de un tratamiento con un iniciador mutagénico. Los cambios producidos por un iniciador tumoral son irreversibles en la mayoría de los casos y se pueden poner de manifiesto mediante tratamiento con un promotor tumoral incluso después de un largo intervalo de tiempo. Por otra parte, el efecto inmediato del promotor es: a) estimular la división celular; b) la exposición previa al iniciador provoca el crecimiento a partir de una célula mutada. Los promotores pueden ser exógenos como el humo del cigarro o endógenos como ciertas hormonas; la progresión abarca varias etapas en el proceso de carcinogénesis: conversión, invasión y metástasis; c) conversión celular: convierte a las células hasta entonces premalignas en malignas a través de un proceso multifocal donde unas se transforman más rápido que otras; d) estimulación de la angiogénesis, a través de la inducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos, para la obtención de los nutrientes y el oxígeno necesarios; e) invasión y metástasis: la célula de un tumor es capaz de debilitar la adhesión a sus vecinas originarias, escapar del tejido de origen y invadir otros tejidos (Díaz *et al.*, 1998, Díaz, 1999; Hodgson y Smart, 2001; Mathers, 2002).

La metástasis es la formación de un tumor secundario que se inicia cuando la célula transformada cruza la lámina basal y el revestimiento endotelial del vaso, entrando así a la circulación sanguínea, a su salida puede alojarse en un nuevo ambiente donde sobrevive y prolifera. Así, en el desarrollo de un cáncer en particular, contribuyen una gran variedad de factores, algunos de estos son característicos del entorno y del estilo de vida (Reddy y Fialkow, 1988; Díaz *et al.*, 1998). En la Figura 4 se puede observar un esquema que representa de manera general el proceso de carcinogénesis (www.livercancer.com).

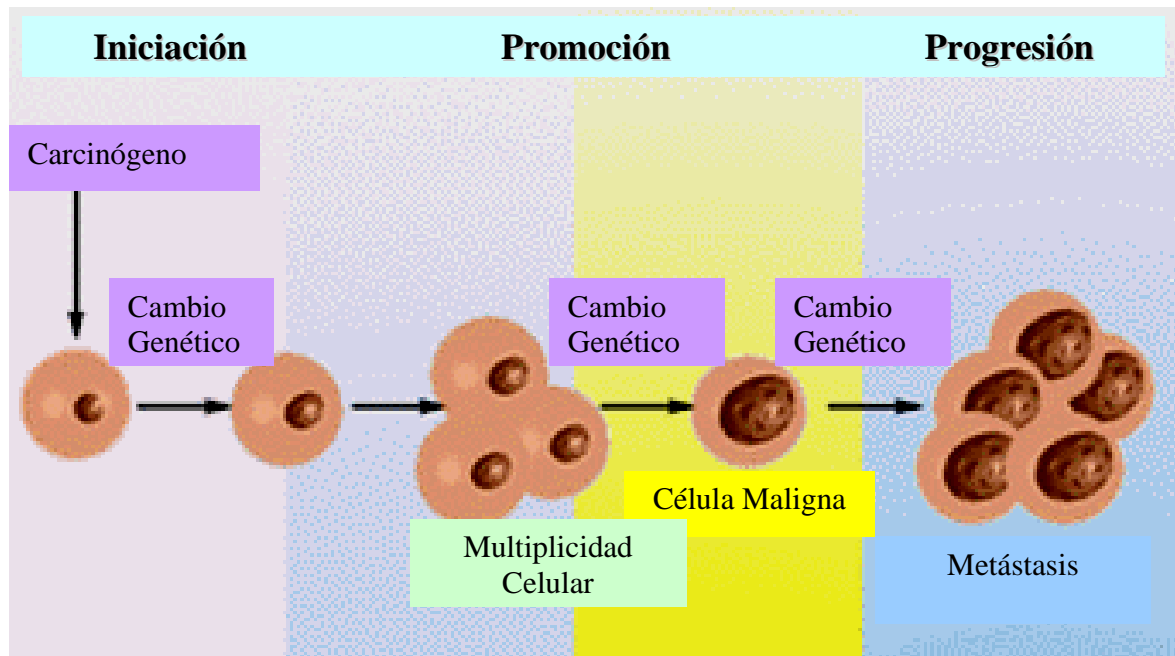


Figura 4. Proceso general de carcinogénesis (www.livercancer.com)

2.3 Genética molecular del cáncer

El cáncer se produce por numerosas alteraciones cromosómicas, generalmente a lo largo de los años. La mayoría de las mutaciones pueden ser translocaciones cromosómicas, deleciones, inversiones, amplificaciones o mutaciones puntuales. Las mutaciones que determinan una nueva función pueden activar a los oncogenes, que son efectores positivos de la transformación. Los productos de los genes de supresión tumoral son reguladores negativos del

crecimiento y la pérdida de su función promueve la carcinogénesis (Perkins y Stern, 2000; Plancarte y Mayer, 2003).

Los genes reguladores normales pueden clasificarse, de forma simple en aquellos cuyos productos ayudan a estimular la proliferación celular y aquellos cuyos productos ayudan a inhibirla. Por lo tanto existen dos caminos en la proliferación celular de células mutadas: la incontrolada y la invasividad, ambas son características del cáncer. En la primera forma, un gen estimulador se vuelve hiperactivo; este tipo de mutación tiene un efecto dominante, es suficiente con que el cambio afecte a una de las dos copias del gen en la célula; el gen alterado se denomina un oncogén (siendo un alelo normal un proto-oncogen). La segunda forma inactiva un gen inhibidor; este tipo de mutación tiene un efecto recesivo y para que la célula quede libre de la inhibición es necesario que las dos copias del gen en la célula estén inactivadas o deleccionadas; llamándose gen supresor de tumores (Hesketh, 1997; Hunter, 1997; Clark *et al.*, 2002; Van't Veer, *et al.*, 2002).

2.3.1 Protooncogenes y oncogenes

Los protooncogenes actúan como importantes reguladores de los procesos biológicos. Por ejemplo estos genes codifican para factores de crecimiento, receptores a dichos factores, transductores de señales y proteínas nucleares que actúan como factores de replicación o de transcripción, activando genes importantes en el crecimiento normal de la célula (Perkins y Stern, 2000).

Cuando existen alteraciones moleculares en los protooncogenes, éstos se transforman en oncogenes activados. Las alteraciones más frecuentes que activan a los protooncogenes son: mutación, rearreglo génico y amplificación genética; frecuentemente un protooncogen puede presentar más de una de estas alteraciones genéticas (Gariglio y Orozco, 2000).

Los oncogenes son versiones mutadas de genes, llamados protooncogenes. Los oncogenes son dominantes pues generalmente se requiere la alteración de sólo uno de los alelos de una célula diploide para inducir transformación celular.

En las mutaciones oncogénicas se produce un desacoplamiento entre la oncoproteína mutante y el proceso de regulación encargado de su activación, provocando la expresión descontrolada y continua de la oncoproteína (Griffiths *et al.*, 2000). Se han identificado aproximadamente 100 oncogenes diferentes en humanos y sus homólogos en animales, de los cuales podemos ver algunos ejemplos en el Cuadro 2 (Griffiths *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2003).

Cuadro 2. Ejemplo de oncogenes, función de su proteína y tipo de neoplasia

ONCOGENES	FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA	NEOPLASIA
<i>sis</i>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	Fibrosarcoma
<i>int-2</i>	Factor de crecimiento de fibroblastos	Mama
<i>trk</i>	Factor de crecimiento de nervios	Neuroblastoma
<i>erb-B1</i>	Receptor de factor de crecimiento epidermal	Carcinoma de células escamosas
<i>erb-B2/HER2/neu</i>	Heregulina	Carcinoma de mama
<i>fms</i>	Factor estimulante de colonias hematopoyetica	Sarcoma
<i>ros</i>	Receptor de insulina	Astrocitoma
<i>bcr-abl</i>	Cinasa de tirosina	Leucemia
<i>scr</i>	Cinasa de tirosina	Colon
<i>lck</i>	Cinasa de tirosina	Colon
<i>raf</i>	Cinasa de serina-treonina	Sarcoma
<i>mos</i>	Cinasa de serina-treonina	Sarcoma
<i>H-ras</i>	GTPasa	Melanoma, pulmón, pancreás
<i>K-ras</i>	GTPasa	Leucemias, colon, pulmón, pancreás
<i>N-ras</i>	GTPasa	Carcinoma de tracto genitourinario y tiroides; melanoma
<i>bcl-2</i>	Proteína antiapoptótica	Linfoma no Hodgkin de células B
<i>myc</i>	Factor de transcripción	Linfoma de Burkitt
<i>jun</i>	Factor de transcripción (AP-1)	Osteosarcoma
<i>fos</i>	Factor de transcripción (AP-1)	Sarcoma

(Martínez *et al.*, 2003)

2.3.1.1 β -Catenina

En 1997 se describió por primera vez que β -catenina podía ser considerada una oncoproteína, puesto que las mutaciones heterocigotas en su gen tienen un efecto similar a la inactivación de APC en el desarrollo del carcinoma de colon (Morin *et al.*, 1997).

β -Catenina, producto del gen *CTNNB1*; es una proteína de 782 aminoácidos (92 kDa) cuya estructura primaria consta de un extremo amino terminal de unos 149 aminoácidos, un cuerpo central de unos 525 aminoácidos que contiene 12 repeticiones de 42 aminoácidos, conocidas como repeticiones armadillo, y una zona carboxilo terminal de unos 108 aminoácidos (Daniels *et al.*, 2001).

Cada una de las repeticiones armadillo forma tres hélices α que a su vez constituyen una gran superhélice cilíndrica confiriendo al conjunto una estructura de gran rigidez como se puede ver en la Figura 5. Las cargas están distribuidas dejando un surco de potencial positivo por donde β -catenina se une a otras proteínas como E-cadherina, APC o hTcf-4.

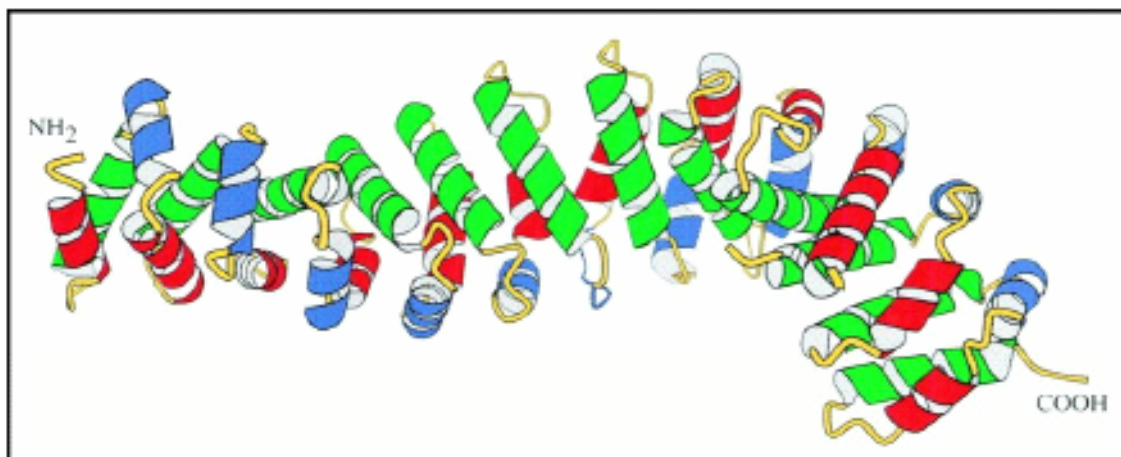


Figura 5. Estructura de doce repeticiones armadillo de β -catenina. Cada repetición armadillo (de 42 aa) forma tres hélices α que se presentan en rojo, verde y azul (Daniels *et al.*, 2001).

Hasta el momento β -catenina ha sido encontrada en tres compartimentos celulares distintos: en membrana (formando parte del complejo de adhesión celular cadherina-cateninas), en el citoplasma (en forma libre o asociada a otras proteínas como APC, axina y GSK3 β) o en el núcleo (unida a factores de transcripción de la familia Tcf/Lef) (Novak y Dedhar, 1999).

La primera función atribuida a β -catenina fue la de proteína estructural constituyente de las uniones adherentes. En estas uniones, interacciona por la región central de repeticiones armadillo con el dominio citosólico de E-cadherina; el dominio N-terminal de β -catenina interacciona a su vez con α -catenina. En esta unión interviene una secuencia de 31 aminoácidos, del 120 al 151, de β -catenina (Daniels *et al.*, 2001).

Por otro lado, β -catenina también actúa como activador transcripcional de genes implicados en el desarrollo tumoral y como componente de la vía de señalización Wnt (wingless). La capacidad de β -catenina de translocarse al núcleo depende de los niveles de esta, en estado libre en el citosol, no asociados a E-cadherina. El control, de los niveles citosólicos de la β -catenina está finamente regulado. Así en una célula normal de colon, la β -catenina que no se encuentra unida a α -catenina y E-cadherina (en los complejos de adhesión celular) se localiza en el citosol formando un complejo con la axina, APC y las Ser/Thr cinasas CKI α (cinasa caseína I alfa) y GSK3 β (cinasa de la sintasa de glucógeno), entre otros factores. En estas condiciones, cuatro residuos del extremo N-terminal de la β -catenina (serinas 33, 37 y 45 y treonina 41) son fosforilados, lo que induce su rápida degradación por el sistema ubiquitin-proteosoma (Novak y Dedhar, 1999; Polakis, 1999; Hecht y Kemler, 2000).

Recientemente se ha descrito otro mecanismo paralelo de degradación de la β -catenina que depende de la actividad del producto del gen *Siah-1*. Esta proteína, cuya expresión es activada por p53, interacciona con el extremo carboxilo terminal de APC y promueve la degradación de β -catenina independientemente de la

fosforilación de β -catenina por GSK3 β y sin requerir la interacción de β -catenina con β -TrCP (Liu *et al.*, 2001).

Cuando este sistema de regulación se altera, la β -catenina no puede ser degradada y se transloca al núcleo por un mecanismo independiente a la acción de importinas/carioferinas que son los clásicos receptores de sustratos con secuencias de localización nuclear (NLS). La β -catenina, que carece de estas secuencias, parece que se une directamente por las repeticiones armadillo a los poros de la membrana. En el núcleo interacciona con factores de transcripción de la familia Tcf/Lef. La interacción de β -catenina con estos factores los convierte en activadores transcripcionales, estimulando la transcripción de genes que contienen secuencias diana para Tcf-4 en sus promotores, tales como *c-myc*, *ciclina D1*, *c-jun*, *fra-1*, *MMP7*, etc (Daniels *et al.*, 2001).

La mutación del gen *CTNNB1* tienen como resultado una falla en un gran número de funciones celulares y esto puede ser importante en el desarrollo del tumor (Ilyas *et al.*, 1997).

En ausencia de una señal extracelular producida por miembros de la familia Wnt (wingless), β -catenina libre en el citoplasma (no unida a los complejos cadherina/cateninas) es fosforilada en residuos de serina-treonina por cinasa de la sintasa de glucógeno (GSK-3 β) que forma un complejo con APC y axina a los cuales también fosforila. La proteína fosforilada es ubiquitinada y degradada en el proteosoma. La unión de factores Wnt sobre receptores específicos inhibe el complejo APC/axina/GSK-3 β , conduce a la acumulación de β -catenina en el citoplasma, favorece su traslocación al núcleo y su unión a factores de transcripción de la familia Tcf/Lef (factor de células T/factor potenciador linfoide) (Kolligs *et al.*, 2002).

La importancia de este nuevo papel de la β -catenina como coactivador transcripcional se atribuye al hecho de que niveles elevados de β -catenina en el

núcleo son una de las alteraciones más habituales en cáncer de colon, cualquiera que sea su estadio. Mutaciones en la proteína acopladora APC, que impide que la β -catenina sea fosforilada y, por tanto, degradada, se detectan en más del 85% de los tumores de colon (Kolligs *et al.*, 2002). En un amplio porcentaje de los tumores restantes, en los que no se han detectado lesión en APC, aparecen mutaciones en β -catenina que impiden que la proteína pueda ser fosforilada en Ser/Thr y, por lo tanto, degradada. Alteraciones en APC o β -catenina que conduce a niveles elevados de esta proteína en el núcleo son detectados también en la práctica de líneas celulares derivadas de tumores de colon (Morin *et al.*, 1997).

Las mutaciones ocurren normalmente en el exón 3 y afectan a los aminoácidos implicados en la fosforilación por GSK-3 β , que son las serinas localizadas en las posiciones 33, 37 y 45 y la treonina 41 (Porción N-terminal de la proteína) (Koesters *et al.*, 1999). Estas mutaciones están asociadas con el desarrollo de una variedad de cánceres entre los que destacan el de piel, hígado, cerebro y colon. Estos cambios se han encontrado en alrededor de 50% de los tumores humanos de colon en los cuales el gen APC no presenta ninguna mutación (Sparks *et al.*, 1998).

Un estudio reportado por Koesters *et al.* (2001) indica la presencia de mutaciones puntuales en el codon 41 (ACC \rightarrow ATC) de β -catenina en el 99% de los tumores de ratas inducidos químicamente con 1,2-dimetilhidrazina (1,2-DMH), precursor del azoximentano (AOM). Estos hallazgos sugieren que la vía de señalización Wnt al sufrir mutaciones en sus genes contribuye en la carcinogénesis de colon en ratas.

2.3.2 Genes supresores de tumores o antioncogenes

Los genes de regulación negativa del crecimiento se llaman genes supresores de tumor o antioncogenes. A diferencia de los oncogenes, estos genes son recesivos ya que se requiere de la inactivación de ambos alelos para que se

manifieste el efecto transformante (Santana y García-Carrancá, 1997; Hodgson y Smart, 2001; Mendelsohn *et al.*, 2001).

Las funciones de los genes supresores de tumores pueden clasificarse en categorías complementarias a la de los protooncogenes. Algunos determinan la síntesis de elementos reguladores negativos del ciclo celular, tal como la proteína Rb (retinoblastoma) o los elementos de la ruta TGF β (factor de crecimiento transformante beta) de transducción de señales. Otros determinan la síntesis de factores reguladores positivos de la apoptosis, mientras que otros actúan indirectamente (Griffiths *et al.*, 2000). En el Cuadro 3 se presentan los genes supresores de tumores, la función de la(s) proteína(s) y el tipo de neoplasia que puede ocasionar.

Cuadro 3. Ejemplo de genes supresores de tumores, función de su proteína y tipo de neoplasia

GEN	FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA	NEOPLASIA
<i>APC</i>	Adhesión celular	Colon
<i>BRCA1</i>	Factor de transcripción	Mama y ovario
<i>BRCA2</i>	Reparación de AND	Mama y ovario
<i>CDK4</i>	Cinasa dependiente de ciclina	Melanoma
<i>hMLH1</i>	Reparación de errores de apareamiento de bases de ADN	HNPCC ^a
<i>hMSH2</i>	Reparación de errores de apareamiento de bases de ADN	HNPCC
<i>hPMS1</i>	Reparación de errores de apareamiento de bases de ADN	HNPCC
<i>hPMS2</i>	Reparación de errores de apareamiento de bases de ADN	HNPCC
<i>MEN1</i> ^b	Receptor Ret	Tiroides
<i>NF1</i>	GTPasa	Neuroblastoma
<i>p53</i>	Factor de transcripción	Colon, pulmón, mama
<i>rb</i>	Control del ciclo celular	Retinoblastoma
<i>WT-1</i>	Factor de transcripción	Riñón infantil

^a Cáncer de colon hereditario no polipoide. ^b Neoplasia endocrina múltiple (Peralta-Zaragza *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2003)

2.3.2.1 Gen retinoblastoma (*rb*)

El producto del gen *rb* es una fosfoproteína nuclear de 105 – 110 kDa (pRb) que controla negativamente el ciclo celular. Al fosforilarse Rb inactiva factores de transcripción tales como E2F, que participa en la transcripción de varios genes requeridos en el ciclo celular. La transcripción de estos genes controla la expresión de numerosos genes involucrados en proliferación celular. La actividad de pRb está también regulada negativamente por fosforilaciones inducidas por cinasas dependientes de ciclinas (cdks) (Peralta-Zaragoza *et al.*, 1997; Rios-Hernández y Hernández-Menéndez, 2001).

Este gen (*rb*), originalmente alterado en individuos con retinoblastoma, es un gen que inhibe la proliferación celular. Esto se ha demostrado en células tumorales que carecen de este gen, y al momento de transfectarlas con pRb, se observa una supresión del potencial tumorigénico (Ookawa *et al.*, 1993). Además, se ha observado que un exceso de pRb puede inhibir la proliferación celular en células normales (Fung *et al.*, 1993). El pRb se expresa constitutivamente en células en división o en estado de reposo. Por lo tanto, la regulación de *rb* ocurre a nivel postranscripcional, por fosforilación de la proteína (pRb). La fosforilación de esta proteína es crucial para su unión con otras proteínas involucradas en la transcripción y en la regulación del ciclo celular (Figura 6) (Zhang *et al.*, 2000).

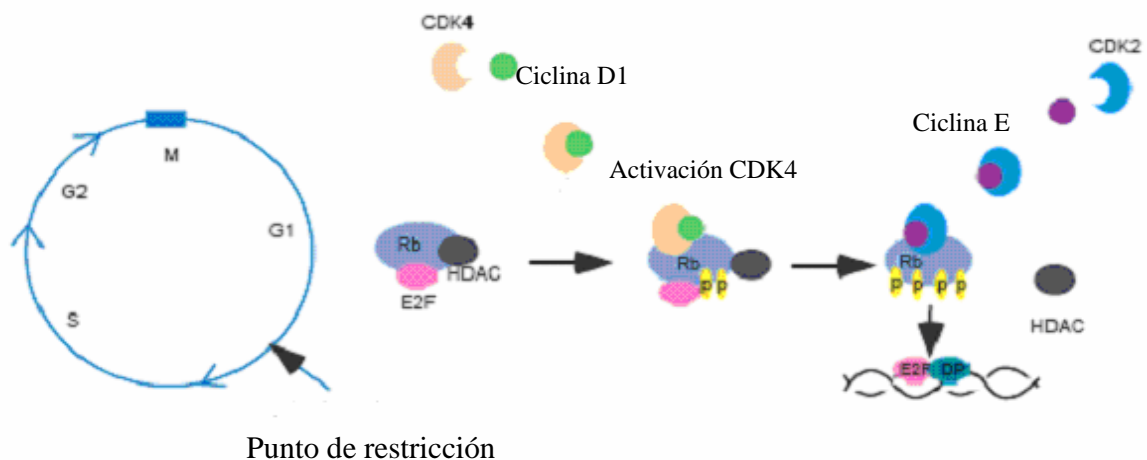


Figura 6. Esquema general de la función de pRb. (Fu *et al.*, 2004)

En las fases G₀ y G₁ del ciclo celular, pRb se encuentra hipofosforilada (forma activa) y asociada al factor transcripcional E2F. La fosforilación de pRb ocurre entre las fases G₁ y S, y aumenta en las fases G₂ y M (forma inactiva). Cuando la célula termina la mitosis, pRb se desfosforila. La actividad de pRb está principalmente asociada a la inhibición en la proliferación celular por contacto célula-célula, por falta de estímulos proliferativos o por la presencia de estímulos antiproliferativos como factor de crecimiento transformante (TGF-β1 o TNF-α) (Luo *et al.*, 1998).

En células con daño genético, la transfección con pRb induce interrupción de la proliferación celular en la fase G₁; sin embargo, al realizar una cotransfección con las ciclinas A o E, se libera el arresto celular inducido por pRb y se produce hiperfosforilación de pRb (Luo *et al.*, 1998; Hanai *et al.*, 2002).

En tumores humanos donde pRb está mutada, ésta se hiperfosforila y pierde la capacidad de suprimir la proliferación celular, por lo que pRb puede actuar como un precursor de tumores al no inducir la interrupción del ciclo celular (Wang *et al.*, 2004).

Además de controlar el ciclo celular, pRb participa en diferenciación celular en tejidos del adulto y durante el desarrollo embrionario; también recientemente se ha observado que pRb puede aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales, disminuir la angiogénesis y suprimir la invasividad del tumor. La pérdida de función del gen *rb* se ha relacionado con la progresión de varios cánceres humanos comunes, tales como vejiga, pulmón, próstata y mamario (Gariglio y Orozco, 2000).

2.3.2.2 Gen p21

La familia CIP/KIP incluye a p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, y p57^{KIP2}. Estas proteínas contienen un dominio inhibidor N-terminal, el cual es necesario y suficiente para unir e inactivar los complejos formados por CDK4 y CDK2 con sus respectivas ciclinas, actuando como inhibidores estequiométricos del ciclo celular. Aún cuando *in vitro*

pueden inhibir todos los complejos de la fase G₁, y en menor extensión, el complejo CDK1-ciclina B, estudios *in vivo* muestran la unión preferencial al complejo CDK2-ciclina E (Vidal y Koff, 2003).

Tanto en respuesta a señales anti-mitogénicas como a daño en el ADN, p21^{CIP1} y p27^{KIP1} se unen a los complejos CDKs-ciclinas inhibiendo su actividad catalítica e induciendo un arresto del ciclo celular. El p21^{CIP1} fue el primer gen supresor de tumores identificado, y se describió como una proteína asociada a CDK2 en un sistema de doble híbrido (Harper *et al.*, 1993), unida al complejo CDK2-ciclina (Xiong *et al.*, 1993), como inhibidor del crecimiento en células senescentes (Noda *et al.*, 1994), o como inhibidor en células donde está activada la vía de p53 (el-Deiry *et al.*, 1995). La regulación de la expresión de p21^{CIP1} es básicamente a nivel transcripcional aunque pueden estar implicados también mecanismos de estabilidad del ARN mensajero (Vidal y Koff, 2003).

La proteína p21^{CIP1} está implicada en el arresto del ciclo celular mediado por p53 en respuesta a daño en el ADN, y se sabe que su promotor posee sitios de unión a p53 implicados en la inducción transcripcional de este inhibidor (el-Deiry *et al.*, 1995). Además, p21^{CIP1} es capaz de asociarse con PCNA, la subunidad delta de la ADN polimerasa, en un mecanismo adicional por el cual puede inhibir la síntesis de ADN (Zhang *et al.*, 2000).

Tanto por su implicación en el punto de restricción de daño al ADN como en su posible papel en la inactivación de PCNA, se plantea como posible papel de p21^{CIP1} el control de la replicación del ADN, siendo este hecho consistente con la observación de que la expresión de este inhibidor se induce con la entrada en el ciclo celular en numerosos tipos celulares (Vidal y Koff, 2003). Entre otras funciones p21^{CIP1} es un regulador positivo del ciclo celular, función que comparte con p27^{KIP1}. Estos inhibidores también facilitan el ensamblaje y la localización nuclear de complejos CDK4-ciclina D, así como el incremento en la estabilidad de las ciclinas D (Sherr y Roberts, 1999).

2.3.2.3 Gen p53

El antioncogén *p53* está localizado en el brazo corto del cromosoma 17. Se ha clasificado como supresor de tumores ya que detiene o revierte la transformación y el crecimiento de una célula blanco. La proteína p53 es una fosfoproteína nuclear capaz de reconocer una secuencia específica de ADN y actuar como factor de transcripción.

La proteína p53 participa en la respuesta celular al daño genético, al menos de dos formas diferentes: 1) deteniendo el ciclo celular en la fase G₁, lo cual permite que se repare el ADN antes de la división celular; 2) causando apoptosis cuando el daño genético ha sido muy importante y no se puede reparar: en este caso la concentración de p53 se mantiene elevada para inducir otras vías de regulación como por ejemplo la apoptosis. Además, la proteína p53 participa directamente en mantener la estabilidad genómica; su función como “guardián del genoma” es inhibida o destruida por deleciones, inserciones y mutaciones puntuales, así como por la formación de complejos inactivos con proteínas endógenas o con oncoproteínas virales (Peralta-Zaragoza *et al.*, 1997).

Algunos estudios señalan que en más del 50% de todos los cánceres humanos, la proteína p53 no es funcional como resultado de mutaciones en el gen (Levine, 1997; Vogelstein *et al.*, 2000).

3. El ciclo celular

El ciclo celular es el conjunto ordenado de procesos que tienen lugar en la célula con la finalidad de dividirse. A pesar de que es un proceso continuo, se puede considerar que consta de diversas fases, siendo las principales la fase S o de replicación del ADN y mitosis o fase M. Entre estas fases hay espacios que se denominan G₁ y G₂, puntos importantes en la regulación del ciclo celular (Figura 7).

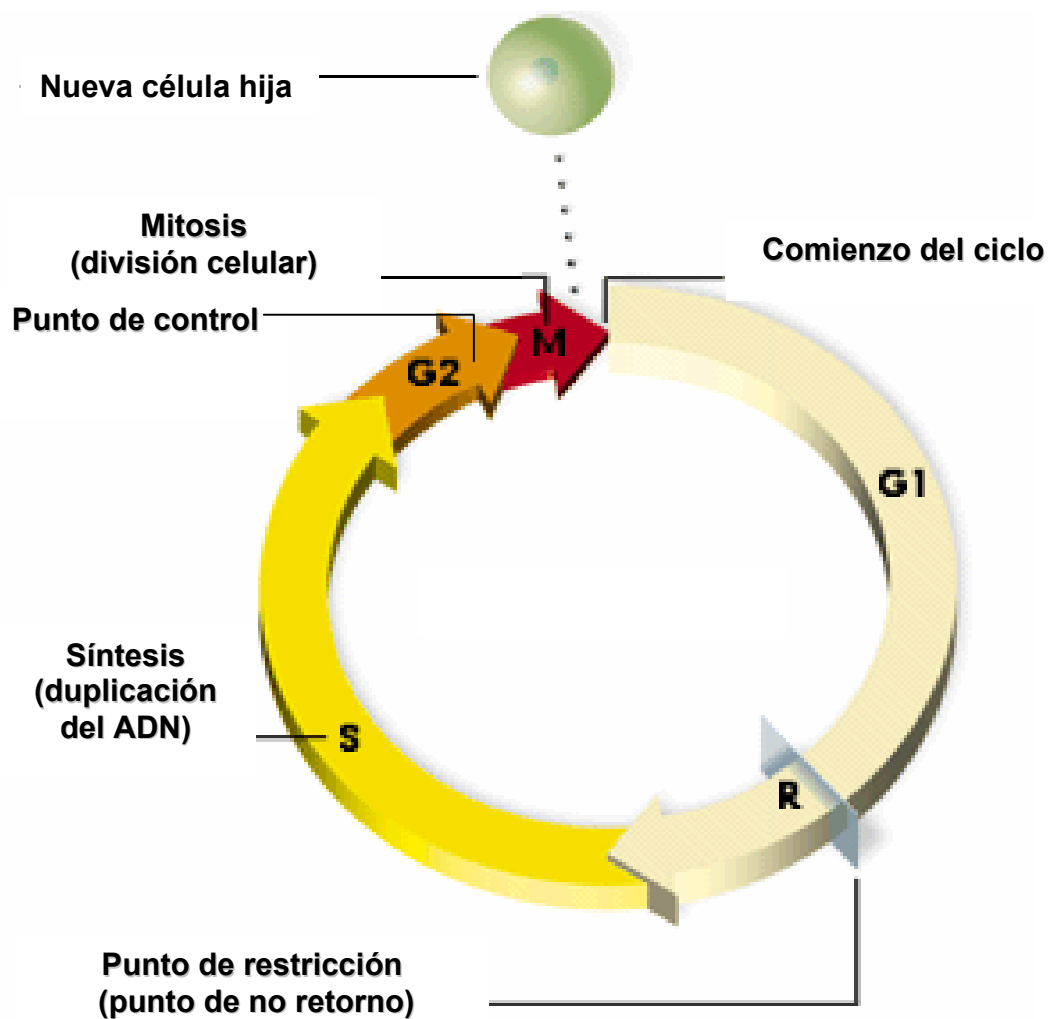


Figura 7. Esquema de las diferentes fases del ciclo celular. En la figura se muestran los diferentes puntos de control del ciclo celular (Muñoz, 1997).

La transición de una fase a otra del ciclo celular es el resultado de la integración de diferentes señales. Por una parte, señales externas que llegan desde el entorno celular como son los factores de crecimiento, citoquinas y hormonas, los contactos intercelulares y la adhesión a la matriz extracelular, y por otra parte, las señales intracelulares, que constituyen los mecanismos de control o vigilancia (*checkpoints* por sus siglas en inglés) de que dispone la célula para evitar el iniciar

una fase si la anterior está incompleta o mal realizada. Estas señales externas, en general, son las que activan las diversas rutas de transducción que, ya sea por cambios en la expresión de ciertos genes o por modificación de moléculas, determinan la entrada/permanencia o salida del ciclo celular (Murray, 1992; Hengst *et al.*, 1994).

La fase G_1 es un período de duración variable que sigue a una división celular y es previo a la síntesis o replicación del ADN. Ésta es la única fase del ciclo celular que esta influenciada por señales externas. Durante esta fase, hay una intensa actividad de síntesis de proteínas y ARN, lo que permite a la célula producir toda la "información" necesaria para la síntesis del ADN. Antes de la transición hacia la fase S existe un punto de control llamado el punto de restricción (R), considerado por muchos investigadores como el más importante del ciclo celular. En el punto R, la célula valora el entorno celular y, si éste es adecuado, reconoce a R como un punto "de no retorno" a partir del cual la progresión del ciclo ocurrirá independientemente de la estimulación por factores de crecimiento extracelulares. En la mayoría de los organismos pluricelulares, las células que están en G_1 , antes de comprometerse hacia la replicación del ADN (o sea, antes de pasar el punto de restricción) entran en un estado de reposo llamado quiescencia o G_0 , en el cual no proliferan; G_0 coincide normalmente con el estado de diferenciación celular en los tejidos (Enoch y Nurse, 1990; Albert *et al.*, 2000).

Existen determinados tipos celulares como las neuronas o las células del músculo estriado, que siempre se encuentran en G_0 de manera irreversible, lo que se ha dado en llamar diferenciación terminal. Otras células como los hepatocitos, de recambio lento, son mayoritariamente quiescentes, pero pueden re-entrar en el ciclo celular en respuesta a determinados estímulos (por ejemplo, durante la regeneración hepática, daño que pudiera ser consecuencia de una cirugía). Finalmente, existen tejidos con poblaciones mixtas, por ejemplo el epitelio intestinal, donde un compartimento proliferante contiene células progenitoras, que se diferencian y salen del ciclo hacia otro compartimento terminalmente diferenciado; la homeostasis celular

se mantiene mediante un proceso de pérdida celular en el compartimento diferenciado (Enoch y Nurse, 1990; Albert *et al.*, 2000).

La fase S (de síntesis del ADN) corresponde al tiempo durante el cual tiene lugar la replicación del ADN. Cada cromosoma pasa a tener dos cromátidas, es decir, dos moléculas de ADN de cadena doble, que son copia una de la otra. El período comprendido entre la finalización de la replicación del ADN y el inicio de la mitosis es la fase G₂. Durante esta fase, las células se preparan para la escisión en dos células hijas. En esta fase, además, existe un punto de control (control G₂-M), donde la célula debe comprobar, como mínimo, dos condiciones antes de dividirse: que ha completado la replicación del ADN y sólo lo ha hecho una vez, y que en el ADN no se han producido errores estructurales (Albert *et al.*, 2000).

Finalmente, las células entran en la fase de mitosis: los cromosomas se condensan haciéndose visibles al microscopio óptico como entidades individuales, y los microtúbulos se organizan a partir de dos cuerpos polares que se sitúan en ambos extremos de la célula y forman el huso acromático que va a servir de guía a los cromosomas. En la profase, primera fase de la mitosis, desaparece la membrana nuclear. A continuación, los cromosomas se unen por los cinetócoros a los microtúbulos en la zona media celular formando la placa ecuatorial (metafase). En este momento otro punto de control (del huso mitótico) permite que se siga adelante sólo si todos los cromosomas están alineados sobre el huso. Si es así, las cromátidas hermanas se separan desplazándose cada una hacia un polo de la célula (anafase). Cuando llegan a los extremos (telofase), la célula comienza a escindirse por la zona media, dando lugar a dos células hijas, proceso conocido como citocinesis. La membrana nuclear vuelve a formarse y los cromosomas a descondensarse, originándose dos células hijas idénticas en principio a la progenitora (Stillman, 1996; Albert *et al.*, 2000).

Los puntos de control del ciclo celular aseguran la fidelidad e integridad de la replicación y segregación genómica. Si estos puntos de control están dañados

(alteración frecuente en células tumorales), las células prosiguen el ciclo celular aún cuando existan errores en la progresión del ciclo (daño en el ADN, por ejemplo), pudiendo originar de esta forma mutaciones que favorecen la evolución de un proceso neoplásico. A este fenómeno se le denomina inestabilidad genómica. El gen supresor tumoral p53, regulador negativo del ciclo celular, se ha considerado por muchos investigadores como el “guardián del genoma”, por su importante papel en la reparación del ADN (Lane, 1992; Biggs *et al.*, 2000; Geoffrey, 2000).

En respuesta a un daño en el ADN hay una activación de p53, que induce el bloqueo del ciclo celular en la fase G₁ y posiblemente en la fase G₂, permitiendo que la reparación del material genético tenga lugar antes del comienzo de la síntesis de ADN y de la mitosis, promoviendo también apoptosis, si el daño ocasionado es muy severo. Se han descrito alteraciones en este gen en diversos tipos de neoplasias, entre ellos en tumores colorrectales, donde más del 50% de estos tumores presentan p53 mutado (Vogelstein, *et al.*, 1989; Iacopetta, 2003).

4. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es una forma de suicidio celular genéticamente definida, que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario. Se caracteriza por daño mitocondrial, ruptura de la membrana, lisis celular y formación de cuerpos apoptóticos (Hodgson y Smart, 2001; Mendelsohn *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004).

La apoptosis es un proceso activo que implica síntesis proteica, en el cual la célula sufre una condensación nuclear y citoplasmática. Sus características morfológicas revelan condensación de la cromatina nuclear, desintegración nucleolar, disminución del tamaño nuclear, compactación del citoplasma y de organelo (excepto mitocondrias y ribosomas), alteraciones del citoesqueleto y aspecto de burbuja de la membrana, aunque no se rompa.

Durante el proceso final, ocurre fragmentación del ADN, así como formación de fragmentos recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos), que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria (Figura 8) (Cohen, 1993; Arango *et al.*, 1997; de la Rosa *et al.*, 2000). Por otro lado, la necrosis es un proceso que lleva a cabo la célula en situaciones patológicas. Una célula necrótica se hincha, explota y libera su contenido citoplásmico, lo que produce una respuesta inflamatoria al atraer células del sistema inmune (de la Rosa *et al.*, 2000) y se puede observar en la figura 8.

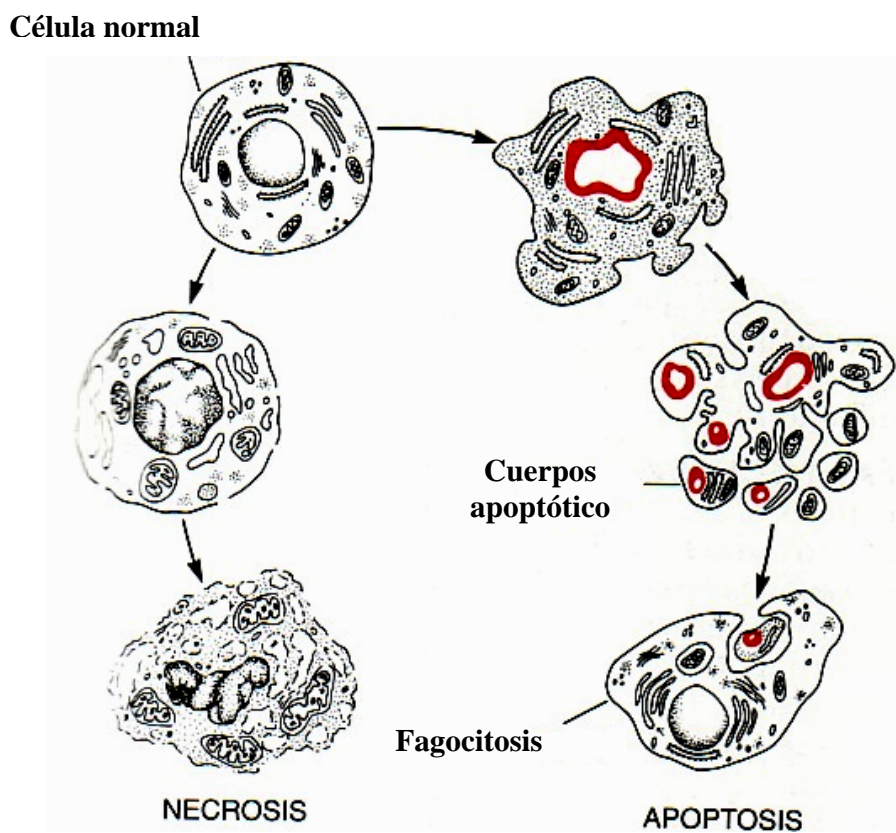


Figura 8. Esquema de los procesos de necrosis y apoptosis de la célula (www.celldeath)

4.1 Receptores de membrana celular que median apoptosis

En la Figura 9, se muestra el proceso de apoptosis y las proteínas involucradas. El proceso de apoptosis puede ser activado por dos vías en células de mamíferos: la vía extrínseca y la vía intrínseca.

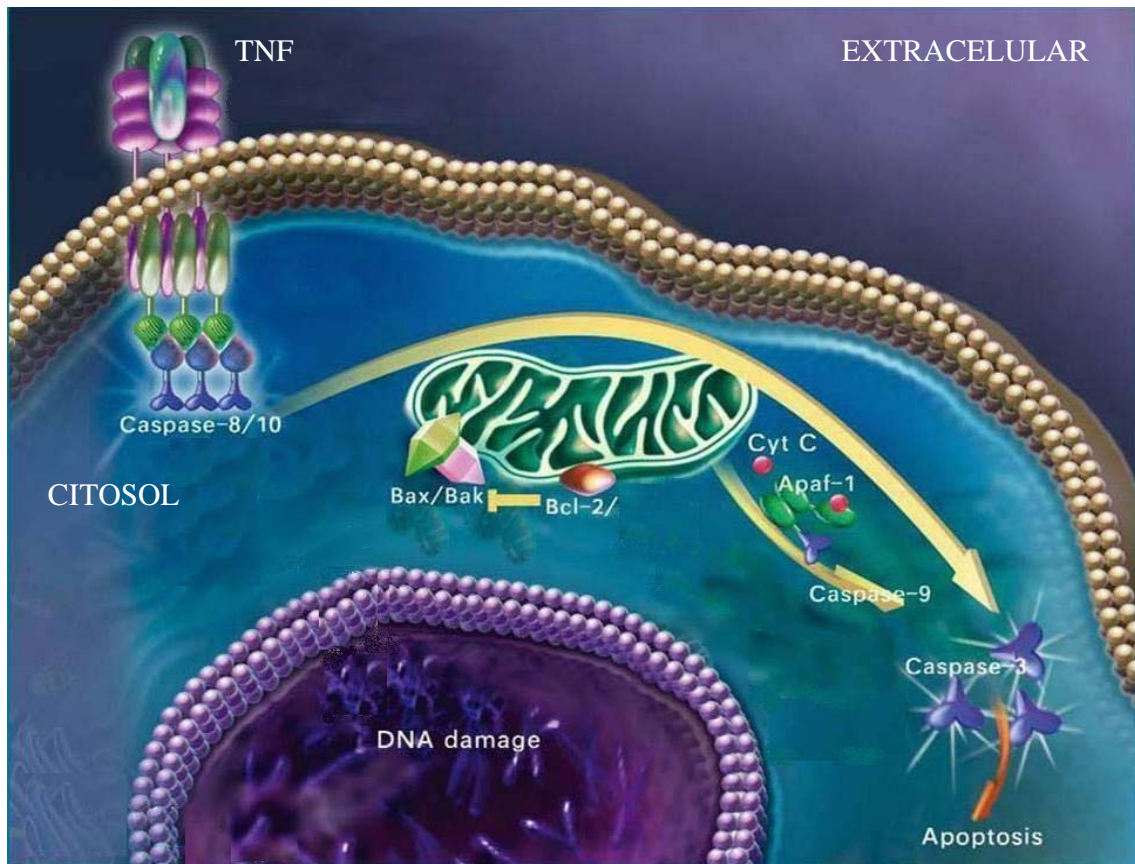


Figura 9. Esquema representativo de las proteínas que intervienen en el proceso de apoptosis (Cecconi y Gruss, 2001).

Factor de Necrosis Tumoral (TNF)., Citocromo C (Cyt C)., Regulador proapoptótico (Bax/Bak); Protooncogen apoptótico (Bcl-2).

La vía extrínseca (activada por receptores de muerte en la membrana celular), es activada por receptores como: Fas o Apo-1 que es una proteína transmembranal tipo II glicosilada, es miembro de la superfamilia de los Factores de Necrosis Tumoral (TNF), entre los que se encuentran los receptores TNF tipo I y II, el

receptor del factor de crecimiento neuronal (NGF), CD40 y CD27 (Itoh *et al.*, 1991; Cecconi, 1999).

El ligando del Fas/Apo-1 es una proteína de membrana tipo II de 40 kD miembro del TNF que está altamente expresado en linfocitos activados. La unión de Fas/Apo-1 con su ligando y con anticuerpos antagonistas, es una de las vías de inicio de señales para la apoptosis (Suda *et al.*, 1993; Cecconi y Gruss, 2001).

El papel de la interacción Fas/Apo-1 y su ligando en cáncer no está bien establecido; sin embargo, su papel en la apoptosis sugiere su participación como supresores de tumores. Por ejemplo, la inactivación de las señales vía Fas debido a la baja expresión de este, puede llevar a la célula a una supervivencia anormal y contribuir al desarrollo y progresión de malignidades (Owen-Schaud *et al.*, 1995). La activación de la vía extrínseca se puede apreciar principalmente en condiciones patológicas, predominantemente con inflamación (Vila y Przedborski, 2003).

La vía intrínseca (vía mitocondrial) es activada por la translocación de moléculas pro-apoptóticas (por ejemplo Bax) a la mitocondria, induciendo cambios conformacionales en la membrana mitocondrial, generados por la detección del daño al ADN principalmente, dando como resultado la liberación de factores apoptogénicos mitocondriales (citocromo C) al citosol. El citocromo C una vez en el citosol, interacciona con el complejo apoptosómico compuesto por Apaf1-Procaspa 9, esta interacción da como resultado la activación de la caspasa iniciadora 9 y posteriormente la vía efectora o de ejecución (caspasas 2, 3, y 7). El estrés del retículo endoplásmico, incluyendo la alteración de la homeostasis del calcio y la acumulación de proteínas mal plegadas, también puede inducir la muerte programada a través de la activación de la caspasa 12 (Vila y Przedborski, 2003).

La activación de la vía extrínseca o de la vía intrínseca genera la activación río abajo de caspasas ejecutoras y la muerte de la célula (Rommy, 2004).

4.2 Mecanismos involucrados en la apoptosis

4.2.1 Gen *bcl-2*

El gen *bcl-2* (por sus siglas en inglés para gen del linfoma de célula B) fue el primer protooncogen detectado y fue asociado con procesos malignos de las células B. Se ha demostrado que la sobreexpresión del gen *bcl-2*, se asocia con la proliferación neoplásica por los efectos inhibitorios de Bcl-2 sobre las vías de apoptosis (Munn *et al.*, 1995). Este gen facilita el aumento de la supervivencia de la célula transformada y de este modo aumenta la posibilidad de futuras aberraciones genéticas que pueden conducir a la progresión maligna (Binder *et al.*, 1995).

La familia Bcl-2 esta integrada por: Bcl-2, Bax, Bad, Bcl-X1, Bcl-Xs, Mcl-1. El destino de una célula de morir o sobrevivir está determinado por las diferencias en la expresión de estas proteínas, actuando algunas como promotoras y otras como inhibidoras de las señales de apoptosis (Boise *et al.*, 1993; Boise *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1995). Por lo tanto, algunos miembros de la familia inhiben la muerte celular (Bcl-2, Bcl-X_L) y otros la activan (Bax, Bad, Bid). Puesto que ambos tipos pueden heterodimerizar, sus concentraciones relativas pueden regular el balance entre muerte y supervivencia celular (Oltvai *et al.*, 1993).

Miembros de la familia *bcl2* pueden preservar o alterar la integridad mitocondrial al regular la liberación de factores apoptogénicos como citocromo C, smac/diablo o factores de inducción de apoptosis (Vila y Przedborski, 2003). Esta liberación de factores apoptogénicos es debido a que muchas de estas proteínas presentan un dominio c-terminal hidrofóbico que les permite anclarse a la cara citoplasmática de las membranas de la mitocondria, retículo endoplásmico y envuelta nuclear, de forma que pueden registrar daños en dichos orgánulos (Green y Reed, 1998). El siguiente nivel de regulación se produce en factor activador de proteasa apoptótica 1 (Apaf-1) (Vila y Przedborski, 2003). Bcl-2 impide la activación del complejo Apaf-1/procaspasa-9 (Hu *et al.*, 1998; Vila y Przedborski, 2003), además de impedir directa o indirectamente la liberación de citocromo C de la mitocondria, lo que a su vez parece ser responsable de un cambio conformacional

en Apaf-1 que le permite procesar a la procaspasa-9 (Li *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997; Green y Reed, 1998). Aún no está claro si la liberación de citocromo C forma parte del mecanismo inicial de activación de las caspasas o es un paso de amplificación de la respuesta apoptótica (Adams y Cory, 1998).

Por consiguiente la proteína Bcl-2 forma parte de un sistema complejo de señalamiento que controla la apoptosis; el papel primordial de Bcl-2 es prevenir la apoptosis. Una elevada expresión de la proteína Bcl-2 puede prevenir la apoptosis en células dañadas. La elevada expresión lleva a una división continua de las células mutadas y eventualmente al desarrollo y metástasis de ciertos cánceres (Fernández *et al.*, 2002).

4.2.2 Gen *bax*

El primer regulador pro-apoptótico identificado, denominado Bax, se encontró asociado a Bcl-2 en extractos de células que expresaban niveles altos de Bcl-2. El análisis de secuencia demostró que la secuencia de Bax se relaciona con el determinante de muerte celular 9 (Ced-9) y Bcl-2, pero la expresión excesiva de Bax induce muerte celular en lugar de proteger a las células de la apoptosis, como ocurre con Ced-9 y Bcl-2. En consecuencia esta familia de proteínas reguladoras homólogas comprende a miembros anti-apoptóticos (Ced-9 y Bcl-2) y pro-apoptóticos (Bax) (Lodish *et al.*, 2002).

Bax es requerida para la inducción de la apoptosis, localizándose en el citosol de las células sanas. Un posible cambio conformacional de Bax, junto con su inserción en la membrana mitocondrial, conduce a la formación de poros que permiten la salida de citocromo C de la mitocondria (Perfettini *et al.*, 2004).

4.2.3 Caspasas

El mecanismo central de la maquinaria de muerte en cualquier célula está constituido por una familia de proteasas, a las que se han denominado caspasas (Alnemri *et al.*, 1996), por ser cistein-proteasas que hidrolizan a su sustrato junto a un

residuo de ácido aspártico. Las caspasas responden al estímulo apoptótico mediante activación de una cascada intracelular proteolítica que ocasiona la activación o inactivación de diferentes sustratos celulares y provoca la muerte celular (Thornberry, 1999; Leist y Jaattela, 2001).

Las caspasas son sintetizadas como proenzimas inactivas, denominadas procaspasas, que, una vez activadas por proteólisis limitada y asociación de subunidades (Stennicke y Salvesen, 1998), adquieren la actividad catalítica para proteolizar a su vez a sus sustratos junto a un residuo de aspártico. Sin embargo, son capaces de reconocer diferentes tetrapeptídicos, lo cual les confiere cierta especificidad de sustrato. Las caspasas inactivas pueden ser sustrato a su vez de las activas, de manera que unas caspasas activan a otras siguiendo un orden jerárquico y una actuación en cascada (Salvesen y Dixit, 1997).

Su activación involucra la fragmentación proteolítica para liberar las subunidades que constituyen una caspasa heterodimérica activa. Las caspasas son activadas en orden jerárquico, las caspasas iniciadoras (por ejemplo: caspasas 6, 8, 9 y 10) son usualmente activadas primero. Las caspasas iniciadoras activan río abajo a las caspasas efectoras (por ejemplo: caspasas 2, 3, y 7), que propagan la cascada de caspasas que conduce a la muerte celular, como se ilustra en la figura 4 (Holcik y Korneluk, 2001).

Las caspasas que participan en apoptosis pueden dividirse en dos grandes grupos: caspasas iniciadoras (8 y 9, y quizás 2 y 10), que se activan en respuesta a señales apoptóticas y activan a las caspasas efectoras (3, 6 y 7), las cuales proteolizan sustratos celulares provocando la desorganización de la célula y los cambios morfológicos típicos de la apoptosis (Thornberry, 1999; Vila y Przedborski, 2003).

Se conocen unos 40 sustratos celulares para las caspasas (Cryns y Yuan, 1998). Entre éstos, se encuentran proteínas que inhiben muerte celular, como Bcl-2

(Cheng *et al.*, 1997), proteínas que participan en la reparación del ADN o en la organización de la cromatina (Kaufmann *et al.*, 1993; Casciola-Rosen *et al.*, 1996), y proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto (Rudel y Bokoch, 1997)

4.2.3.1 Caspasa 3

Las caspasas ejecutoras actúan principalmente río abajo en la cascada y son activadas en parte por caspasas iniciadoras. En la fase de ejecución, la activación de caspasa 3 representa uno de los puntos clave en la transmisión de la señal apoptótica debido a que el rompimiento de caspasa 3 provoca una gran variedad de cambios morfológicos y bioquímicos que se presentan en la apoptosis. Además, la caspasa 3 es capaz de activar otras caspasas ejecutoras del proceso y adicionalmente amplificar la respuesta apoptótica. La caspasa 3 es activada durante la mayoría de los procesos apoptóticos y se cree que es el principal ejecutor de este mecanismo de muerte celular. Se ha demostrado que su activación es esencial para la fragmentación del ADN, así como de la condensación de la cromatina y la formación de burbujas en la membrana celular (Köhler *et al.*, 2002).

Hay dos vías principales por las cuales la procaspasa 3 puede activarse. La primera de ellas es a través de la activación directa de caspasa 8 y la segunda por la activación de caspasa 9 proveniente del complejo conocido como apoptosoma. La caspasa 3 activada se genera a partir de un zimógeno de 32 kDa el cual sufre dos cortes, el primero produce dos fragmentos conocidos como el fragmento pequeño p12 y el péptido p20, el cual es posteriormente procesado generando la subunidad grande madura p17. La enzima activa está compuesta de dos heterodímeros de las subunidades p12 y p17 (Meergans *et al.*, 2000).

5. Métodos utilizados para el análisis del ciclo celular y apoptosis

Existen diversos métodos que permiten el análisis de las diferentes fases del ciclo celular y la apoptosis, entre los que se encuentran la citometría de flujo que permite detectar el contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo celular y el

método de TUNEL que por medio de una tinción visualiza los fragmentos de ADN en estado apoptótico.

5.1 Citometría de flujo

La citometría de flujo (CMF) representa un método rápido objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias, contenido de ADN (ploidía) u otras partículas en suspensión. El principio en el que se basa esta tecnología es simple: hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora (Barrera-Ramírez *et al.*, 2004)

La suspensión celular, convenientemente procesada y teñida, se inyecta en la cámara de flujo del citómetro, que está hidrodinámicamente enfocada para que las células atraviesen de forma individual y sucesiva un punto en el que interaccionan físicamente con un haz de luz monocromática, dispersándola en todas las direcciones. La luz dispersada hacia delante (llamada “forward scatter ó 0 grados”) esta relacionada con el tamaño celular. La luz dispersada a 90° del eje del haz luminosa (“light scatter a 90°) se relaciona con la estructura interna y la complejidad citoplasmática de la suspensión celular (Shapiro, 2003).

La excitación de los fluorocromos se produce en el punto de interacción entre la célula y el haz lumínico, dando como resultado la emisión de una luz de longitud de onda superior ala incidente. Dicha luz es recogida a 90°. Las longitudes de onda seleccionadas para su estudio son dirigidas mediante espejos (dicroicos) adecuados a detectores fotomultiplicadores. Las longitudes de onda no deseadas son bloqueadas por filtros ópticos. Si se dispone de múltiples fluorocromos, excitables con la fuente de luz única, pueden unirse a las células permitiendo de este modo

medidas fluorescentes simultáneas de varios parámetros en una sola célula (Longobardi, 1992)

Las señales eléctricas analógicas son convertidas en señales digitales y procesadas por un software, con el fin de generar histogramas correlacionados con los parámetros deseados y efectuar el análisis de los mismos.

Las ventajas que proporciona CMF frente a otros métodos que emplean fluorocromos incluyen la objetividad, elevada sensibilidad y velocidad de análisis, posibilidad de realizar mediciones simultáneas sobre una sola célula y separación celular en los “sorters”, es por ello que CMF ha sido en el monitoreo del contenido de ADN (Asbury *et al.*, 1996), expresión fenotípica, transporte de drogas, flujo de calcio (Krishan, 1975), proliferación y apoptosis (McCloskey *et al.*, 1994). Las desventajas y limitaciones son los altos costos de instrumentación y la incapacidad de visualizar las células que estamos analizando (Barrera-Ramírez *et al.*, 2004).

5.1.1 Características generales de los citómetros de flujo

Un citómetro de flujo está integrado por cuatro componentes como se muestra en la figura 10.

1. compartimento fluídico o sistema hidráulico
2. fuente luminosa
3. sistema óptico
4. soporte informático para el análisis de datos

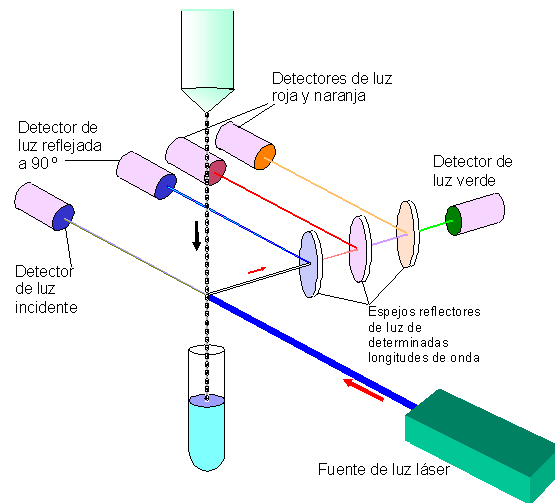


Figura 10. Esquema general de los componentes de la citometría de flujo (www.cnb.csic.es)

5.2 TUNEL

El método de TUNEL (por sus siglas en inglés: *Terminal deoxynucleotidyl transferasa (TdT)- mediated dUTP nick end-labeling*) se basa en la marcación de los extremos cortados de ADN genómico por dUTP marcado por la acción de la enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal. La enzima transferasa terminal es utilizada para agregar dUTP que se encuentra conjugado con una molécula de detección (tal como biotina, digoxigenina o fluoresceína) al extremo 3' terminal de un ADN simple, fragmentado por el proceso de apoptosis. El ADN fragmentado se detecta exponiendo la marca con un anticuerpo anti-biotina o antidigoxigenina o por exposición fluorescente de la fluoresceína. Este método permite la detección específica e inequívoca de células cuyo ADN nuclear se encuentra segmentado por el proceso de apoptosis (Figura 11).

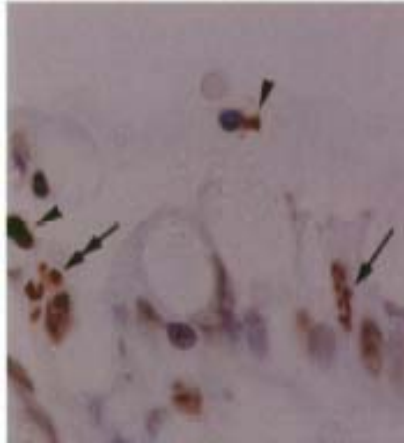


Figura 11. Cortes histológicos de colon tratados con el método de TUNEL, células apoptóticas indicadas por las flechas (Magnificación X630) (Sträter *et al.*, 1995).

6. Cáncer colon-rectal

6.1 Epitelio colónico

La región inferior del tracto gastrointestinal (colon y recto) tiene como principal función la reabsorción de sales y agua, posteriormente a la absorción de la mayor parte de los nutrientes en el intestino delgado. En este proceso, las células del epitelio colónico juegan un papel fundamental (Albert *et al.*, 2000). La pared del colon, (Figura 12A), está compuesta por diferentes capas: mucosa, submucosa, muscular, subserosa y serosa.

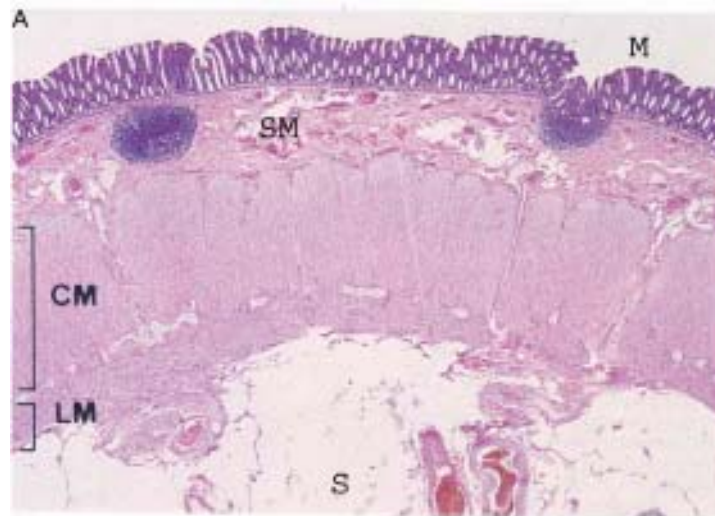


Figura 12. Histología del colon. **A:** Representación de las diferentes capas presentes en la pared del colon (tinción hematoxilina-eosina): mucosa (M), submucosa (SM), capa circular interna (CM) y una capa longitudinal externa (LM) y por último, la serosa (S) (Wheater, 1987)

El epitelio de la mucosa del colon (Figura 13), es un epitelio columnar simple que forma un gran número de profundas invaginaciones hacia el interior de la lámina propia (formada por tejido conectivo laxo) denominadas criptas de *Lieberkühn*. Este epitelio es renovado cada 3-4 días aproximadamente, lo que supone un proceso constante de regeneración de las células que constituyen las criptas (Wheater, 1987; Aloysius-Lambertus, 2001).

Las células absortivas o enterocíticas son, junto con las células caliciformes, las más abundantes en el epitelio colónico, están polarizadas y se caracterizan por la presencia en la membrana apical de microvellosidades que forman un borde en cepillo, y donde se localizan hidrolasas como la sucrasa-isomaltasa (SI), la lactasa, la aminopeptidasa N (APN), la dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV) y la fosfatasa alcalina (AP), las cuales se utilizan como marcadores moleculares propios de este tipo celular.

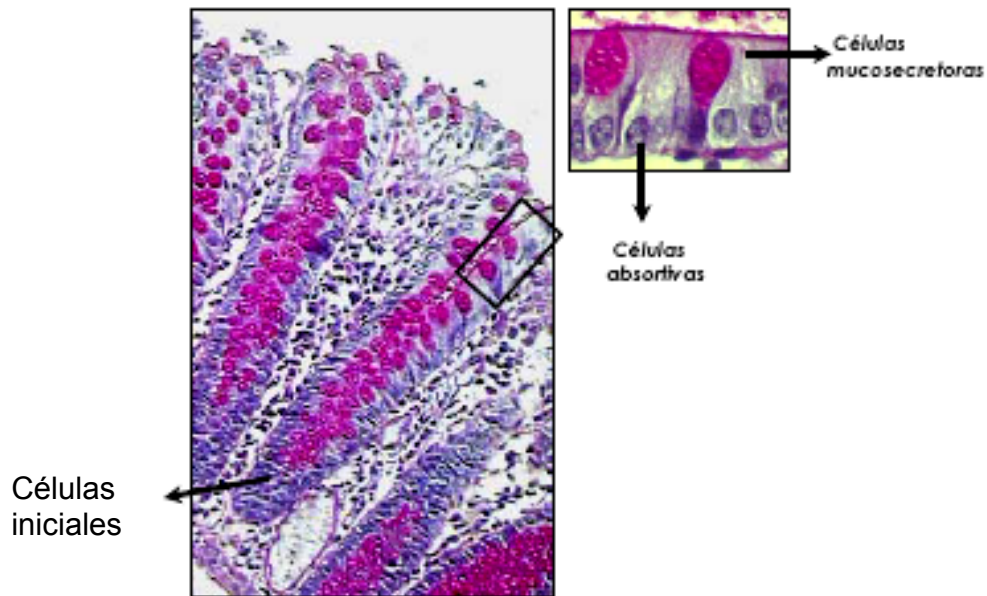


Figura 13. Corte transversal de la mucosa colónica humana donde se observan las criptas de Lieberkühn (tinción hematoxilina-PAS) (Modificado de Wheeler, 1987; Aloysius-Lambertus, 2001)

Las células mucosecretoras o células caliciformes, al igual que las absortivas, son células polarizadas con un núcleo basal. Sin embargo, se caracterizan por la secreción del moco lubricante y protector del epitelio. Este moco está compuesto fundamentalmente por mucinas, siendo MUC2 la mucina predominante del moco secretado por estas células en el colon.

Se postula que en el fondo de la cripta se encuentran las células pluripotentes, células indiferenciadas capaces de dividirse y responsables de la constante renovación del epitelio del colon.

Una de las características que diferencia el epitelio colónico del intestino delgado es la ausencia de células de Paneth (a excepción del colon ascendente), la poca representación de células enteroendócrinas, y su abundancia en células mucosecretoras (Wright, 2000).

6.2. Fosas cripticas

A lo largo del eje basal-apical de las criptas (referido a la posición apical de la luz intestinal), existen dos compartimentos celulares principales: un *compartimento proliferativo* que contiene, a su vez: (1) las células madre (llamadas células iniciales) del epitelio en el fondo de la cripta, y (2) las células proliferantes precursoras de los tipos celulares diferenciados, y un *compartimento no proliferativo terminalmente diferenciado* conteniendo las células absortivas y mucosecretoras maduras en la mitad apical de la cripta (Figura 13, inserto) (Aloysius-Lambertus, 2001).

La homeostasis celular del epitelio colónico es mantenida por un balance dinámico entre la división celular continua y la renovación de células en la superficie de las criptas colónicas: las células precursoras proliferan en la parte baja de la cripta y van migrando de manera continua hacia las zonas más apicales. Durante esta migración tiene lugar una salida del ciclo celular, en paralelo a la activación de programas de expresión génica propios de cada tipo celular diferenciado. El final de este trayecto culmina con la muerte celular por apoptosis y/o desprendimiento de las células hacia el lumen (Kyoung-Mee *et al.*, 2002; Lamprecht y Lipkin, 2002)

6.3 Carcinogéneis del cáncer de colon rectal

6.3.1. Generalidades

El cáncer colon-rectal es una enfermedad maligna que en países desarrollados tiene mayor incidencia debido al tipo de dieta que ingieren (pobre en fibra y rica en grasas) (Casimiro, 2002). En los Estados Unidos de Norte América se diagnostican 142,000 nuevos pacientes de cáncer de colon cada año y genera 57,000 muertes anuales, lo que representa la tercera causa más común de cánceres y ocupa la segunda causa de muerte en el norte de América (Michels, 2005). En México existe un claro ascenso, con marcada diferencia entre los estados del norte de la República donde la tasa de mortalidad estandarizada oscila entre 1.11 y 1.7 por cada 100,000 habitantes y en el 2008 el INEGI reportó que el cáncer de colon representa el 5 y 4.6% de muertes por cáncer en México, para hombres y mujeres respectivamente (Duran *et al.*, 2000; INEGI, 2008).

La carcinogénesis colorrectal (CCR) es un proceso multifactorial influenciado por factores ambientales, genéticos y epigenéticos (Duran *et al.*, 2000; Won *et al.*, 2004). Aunque todavía se conoce poco sobre los mecanismos de control de la diferenciación celular y la homeostasis a lo largo de las criptas colónicas, se cree que las alteraciones que tienen lugar durante la transformación neoplásica ocurren en estadios del proceso de diferenciación donde las células deben decidir su destino en el tejido: continuar en el compartimiento proliferativo *versus* transitar hacia el compartimiento terminalmente diferenciado.

Se conocen dos formas fundamentales de cáncer colorrectal: esporádico y hereditario. La mayoría de tumores colorrectales son considerados como tumores esporádicos, lo cual demuestra que existe un riesgo ambiental muy elevado que incide directamente sobre el desarrollo de este tipo de cáncer (Potter, 1999). Las formas hereditarias de CCR más conocidas son la Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP) y el cáncer colorrectal hereditario no polipoideo (HNPCC), debidas a alteraciones genéticas transmitidas por la línea germinal.

La transformación tumoral se inicia en la mucosa colónica a nivel de las criptas. Durante la progresión tumoral, las células neoplásicas atraviesan la membrana basal e infiltran la capa muscular propia y la serosa. El CCR tiene escasa tendencia al crecimiento longitudinal, excepto si existe infiltración perineural que permite la diseminación a través de la pared intestinal, en algunas ocasiones, más allá de 10 cm del tumor primario. En el colon, el crecimiento se produce hacia el mesocolon y la capa serosa peritoneal, pudiendo invadir órganos y tejidos adyacentes al espacio retroperitoneal.

Los CCR se desarrollan a través de etapas bien definidas a nivel histológico que van desde lesiones en la cripta del colon a través de la formación de pólipos o adenomas hasta la manifestación del cáncer (Figura 14).

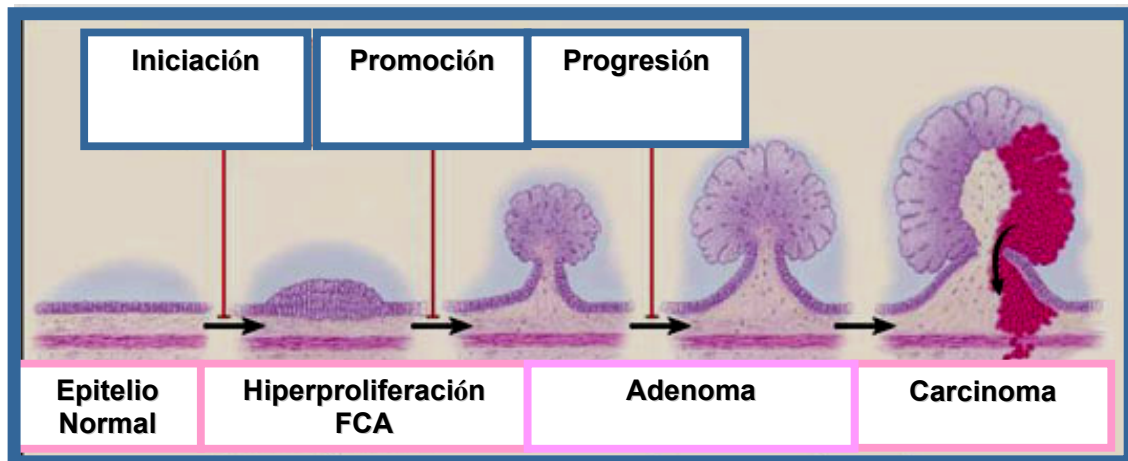


Figura 14. Representación de la carcinogénesis colorrectal, con la secuencia de alteraciones que tienen lugar en la mucosa del colon y que conllevan a la formación del tumor (Kinzler y Vogelstein, 1996).

El adenoma es una neoplasia benigna que tiene lugar en las criptas colónicas, caracterizada por una actividad mitótica continua, donde las células no se diferencian, de manera que el compartimento proliferativo puede llegar a ocupar la cripta completa. Por su parte, dentro de los tipos histológicos de CCR, los adenocarcinomas son los más frecuentes, y se pueden clasificar en tres grados: bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados. Los tumores diferenciados mantienen la estructura glandular con la polaridad del núcleo conservada semejando el epitelio adenomatoso displásico. Los pobremente diferenciados, por el contrario, son estructuras sólidas con pérdida de la polaridad y gran pleomorfismo del núcleo. La división en grados histológicos tiene como principal limitación la subjetividad, ya que dicha clasificación depende, en gran medida, del criterio específico del patólogo. Los adenocarcinomas mucinosos representan el 17% de los tipos de CCR y están caracterizados por la acumulación de mucinas en el espacio extracelular. Normalmente este tipo de tumores tienen un peor pronóstico que los no mucinosos. Un subtipo especialmente agresivo, aunque poco frecuente, es el adenocarcinoma de células en “anillo de sello”, caracterizado por la típica acumulación de mucinas intracitoplasmáticas que desplazan el núcleo a un extremo de la célula. Otros tipos de CCR más infrecuentes son el carcinoma de célula

pequeña (mucho más agresivo que el adenocarcinoma y con tendencia a generar metástasis linfáticas y hepáticas) y el carcinoma adenoescamoso (Duval y Hamelin, 2002).

La secuencia adenoma-carcinoma se caracteriza por la acumulación de múltiples mutaciones que afectan a tres tipos diferentes de genes: a) *los proto-oncogenes*, cuya función es regular positivamente la proliferación celular y cuya activación constitutiva promueve la transformación tumoral; b) *los genes supresores tumorales*, que regulan negativamente la proliferación celular y cuya pérdida de función también promueve la carcinogénesis; y c) *los genes reparadores del ADN*, responsables de corregir los errores producidos durante la replicación del ADN y reparar las alteraciones inducidas en esta molécula por agentes mutagénicos externos (radiaciones UV, agentes químicos, etc). Las alteraciones en este tipo de genes conducen a la aparición de múltiples mutaciones en el genoma (lo que se conoce como *fenotipo mutador*) (Loeb, 2001; Duval y Hamelin, 2002), y acaba afectando a los oncogenes y genes supresores tumorales, contribuyendo a la carcinogénesis. A esta última categoría de genes, podría añadirse los genes implicados en puntos de control del ciclo celular, cuyo estudio ha revelado que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Nigg, 2001). Cada uno de estos eventos mutacionales confiere a las células del tumor una ventaja de crecimiento de forma consecutiva, que trae como resultado la expansión clonal en múltiples etapas y al final, la progresión del tumor (Figura 14).

Los avances de la biología molecular, y en concreto el estudio de las neoplasias, ha permitido establecer posibles vías moleculares por las que se produce la oncogénesis colorrectal (Grife *et al.*, 1998).

Una de estas vías se ha desarrollado apartir de los estudios realizados en los tumores benignos llamados pólipos, que se consideran son los precursores del cáncer de colon-rectal. Estos pólipos forman una masa protuberante que emerge hacia la luz intestinal. Su progresión resulta un proceso en etapas, con alteraciones

en genes supresores y oncogenes, desarrollado lentamente durante varios años (Sasaki *et al.*, 2000).

7. Modelos experimentales de carcinógenos

Una forma de estimar la etiología, el tratamiento y la prevención del cáncer es mediante los modelos experimentales en animales empleando carcinógenos conocidos. Estos modelos permiten al investigador analizar el papel de los factores ambientales, la dieta y algunos parámetros inmunológicos que son importantes en la etiología del cáncer de colon (Bird y Good, 2000; Montenegro *et al.*, 2003).

7.1 Carcinógenos

Los tumores inducidos químicamente en los roedores deben seguir ciertos criterios en su utilización como modelos para su posterior aplicación en estudios epidemiológicos y quimioterapéuticos. Los carcinógenos químicos colónicos pueden clasificarse en siete grupos, basándonos en su estructura química (Cuadro 4) (Piñols-Felis, 1995).

En estudios de carcinogénesis se han identificado varios compuestos (carcinógenos) que son capaces de desarrollar tumores en el colon. El más comúnmente usado ha sido la 1,2-Dimetilhidracina Dihidrocloruro (1,2-DMH) o su metabolito el azoximetano (AOM), ya que son capaces de inducir tumores en el 80 a 100% de los roedores entre 5 y 7 semanas posteriores al inicio del tratamiento (Bland y Britton, 1981; Deasy *et al.*, 1983; Paulsen, 2000; Tao *et al.*, 2004).

Cuadro 4. Clasificación de acuerdo a la estructura química de los carcinógenos colónicos como lo sugiere la Unión Europea (UE) y la Agencia Internacional para Investigación sobre el cáncer

FAMILIA QUÍMICA	CARCINÓGENO
Hidrazina	1,1-Dimetilhidracina (1,1-DMH)
	1,2-Dimetilhidracina dihidrocloruro (1,2-DMH)
	Metilhidracina (MH)
	Acido fórmico 2-4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolilhidracina (FAH)
	Dihidrocloruro 1-Metil-2-butilhidracina (MBH)
Compuestos azoxi	Hidrocloruro trimetilhidracina (TMH)
	Azoximetano (AOM)
	ONN-Metilazxibutano (MAB)
Compuestos N-Nitrosos	Metilazoximetanol glucósido, cicasina (MAMG)
	Metilazoximetanol (MAM)
Dextrano sulfato y polisacáridos relacionados	N-Metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG)
	N-Metilnitrosourea (NMU)
Aminas aromáticas y herocíclicas	N-Nitrosobis (2-hidroxipropil) amina (BHP)
	N-Nitrosobis (2-oxopropil) amina (BOP)
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Asbestos
	3,2'-Dimetil-4-aminobifenilo (DMAD)
	2-amino-3-Metilmidazolquinolina
	3-Metilcolantreno

(IARC, 1999)

7.1.1 Azoximetano (AOM)

El azoximetano (AOM) es un agente químico que induce una alta incidencia de adenomas y adenocarcinomas en intestino grueso y delgado administrado subcutáneamente o por infusión rectal (Toth, 1982). Así mismo, el AOM a una dosis de 10-20 mg/kg produce carcinoma intestinal en el 100% de ratas por vías subcutánea o intramuscular (Williamson *et al.*, 1980). Ratas inyectadas con una dosis relativamente alta (≥ 20 mg/kg) de AOM desarrollan más tumores en duodeno y el colon distal, y aquellas inyectadas con dosis bajas (≤ 10 mg/kg) tienen más tumores en ciego y colon proximal (King y Vorasdi, 1959); mientras que en ratones son más frecuentes las lesiones rectales. El AOM produce una toxicidad hepática de hasta un 20% y los animales fallecen durante el periodo de inducción debido a necrosis hepática (Ward *et al.*, 1974).

El mecanismo de acción del AOM es mediante el proceso de N-hidroxilación convirtiéndose en metilazoximetanol por varios sistemas enzimáticos en el hígado. El metilazoximetanol es inestable a temperatura corporal e *in vitro*, por lo que se descompone y forma el agente alquilante metildiazonio, llamado carcinógeno final. Este último es una sustancia altamente reactiva que forma iones metil-carbonio, los cuales son los responsables de las mutaciones en el ADN tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 15). Por lo tanto, después de la administración el AOM es adsorbido por los capilares y llega al torrente sanguíneo, de esta manera por vía vena porta llega al hígado donde puede conjugarse con ácido glucorónico (enzima de fase II) y de ahí eliminarse vía orina o intestinal. Al ser eliminado por vía intestinal, el conjugado llega al intestino donde puede ser biotransformado por la enzima β -glucuronidasa y generar metilazoximetano y, por su reactividad, producir nuevamente el ión metilcarbonio, causando mutaciones en el ADN de los enterocitos y en consecuencia las fosas cólicas aberrantes (FCA). La alteración de las propiedades de las macromoléculas críticas como ADN, ARN y proteínas, por alquilación y otras reacciones, es un paso esencial en la carcinogénesis química; en el caso del colon la macromolécula que se altera es el ADN de las células epiteliales (Celik *et al.*, 1983; Parkinson, 1996; Negrete *et al.*, 1999; Corpet y Tache, 2002). La activación de este

carcinógeno por el mecanismo previamente descrito lleva a la aparición de tumores de colon en ratas o ratones, muy parecidos a los tumores de colon en humanos (Fiala *et al.*, 1978; Maskens, 1981; Kinzler y Vogelstein, 1996; Sasaki *et al.*, 2000). Por lo tanto, el mejor carcinógeno para la inducción de FCA en modelos animales *in vivo* es el AOM, en tiempos experimentales relativamente cortos (Olivo y Wargovich, 1998).

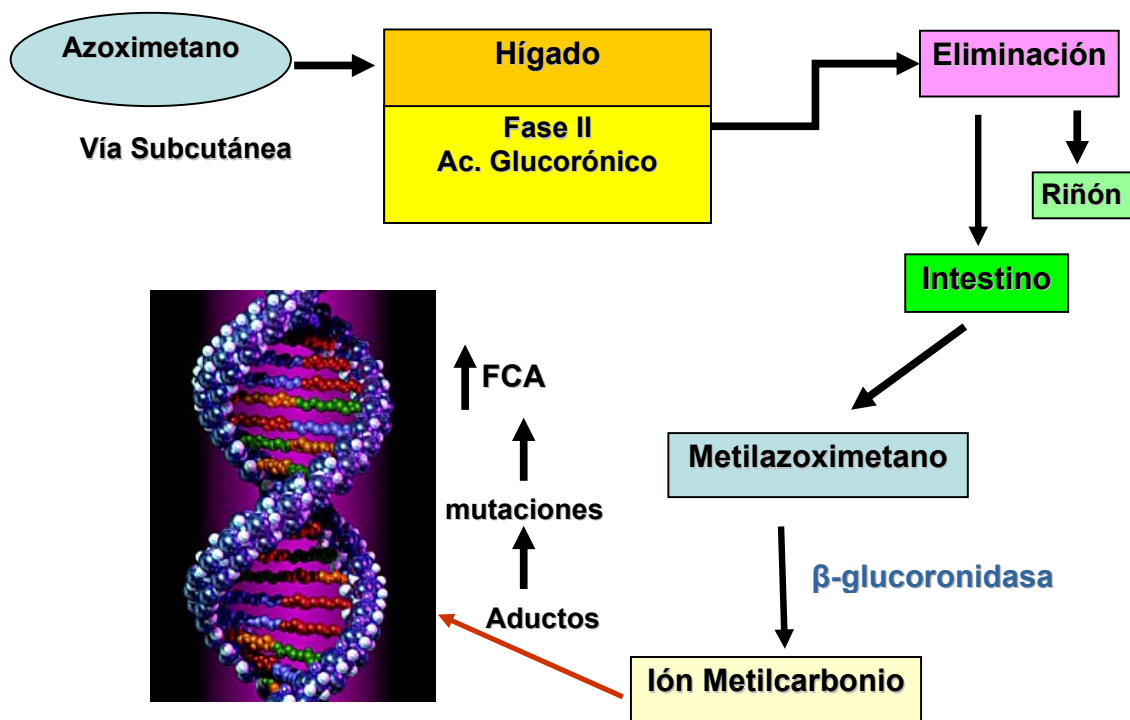


Figura 15. Metabolismo del azoximetano (AOM) (Negrete *et al.*, 1999; Corpet y Tache, 2002).

III. JUSTIFICACION

En México, se consumen una gran variedad de alimentos a los que se les atribuyen propiedades nutraceuticas. Dentro de los alimentos que conforman la dieta del mexicano se encuentran el maíz y el frijol. En este último, el consumo *per capita* ha disminuido en años recientes, disminución que se ve reflejada en un incremento en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas, lo que genera un problema de salud importante en México. Dentro de las enfermedades crónico-degenerativas se encuentra el cáncer y más puntualmente, el cáncer de colon. Las muertes por este cáncer en particular van en aumento a pesar de los esfuerzos del sector salud. La incidencia del cáncer de colon se ha vinculado con la baja ingesta de vegetales, frutas y leguminosas, que aportan diversos nutrientes como proteínas, azúcares y carbohidratos, así como algunos otros compuestos relacionados con efectos benéficos a la salud. Los carbohidratos están conformados por fibra, almidón resistente y oligosacáridos, compuestos que en la dieta del mexicano se consumen al menos en el frijol y que muy seguramente aportan beneficios a la salud. Por otro lado, se ha informado que México cuenta con una gran diversidad de especies de frijol, sin embargo, aun se desconoce los posibles efectos benéficos de esta leguminosa sobre el cáncer, específicamente en el cáncer de colon. Por lo tanto, es importante conocer la relación existente entre el consumo de esta leguminosa, así como un extracto crudo de polisacáridos totales (fibra insoluble, oligosacáridos y almidón resistente), sobre la incidencia del cáncer de colon en modelos experimentales *in vivo* para establecer el posible mecanismo de acción y su posible papel de quimioprotección en esta patología.

IV. HIPÓTESIS

Los polisacáridos presentes en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido inhiben el desarrollo de cáncer de colon en el estadio temprano mediante mecanismos que inducen el arresto celular y/o la apoptosis.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL

Evaluar el efecto protector de los polisacáridos del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025 cocido sobre el estadio temprano de cáncer de colon

B. PARTICULARES

1. Caracterizar químicamente el extracto de polisacáridos (EP) de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido de la variedad Negro 8025
 - 1.1 Extraer y cuantificar la fibra dietaria total (fracción soluble e insoluble)
 - 1.2 Caracterizar la fracción insoluble (oligosacáridos y almidón resistente)
 - 1.3 Determinar el contenido total de taninos condensados y flavonoides

2. Evaluar el efecto del extracto de polisacáridos (EP) y frijol sobre la formación de fosas crípticas aberrantes (FCA) inducidas químicamente con azoximetano (AOM)

3. Elucidar el mecanismo de acción involucrado en la prevención y tratamiento de los estadios tempranos de cáncer de colon (FCA)
 - 3.1 Medir la expresión de las proteínas Caspasa 3, Bcl-2, Bax, p21, p53, Rb como indicadores de apoptosis y proliferación celular
 - 3.2 Cuantificar a nivel transcripcional la expresión de *caspasa 3*, *bax*, *bcl-2*, *p21*, *p53*, *rb*, *β-catenina* y *gadph*
 - 3.3 Cuantificar el efecto del extracto de polisacáridos (EP) sobre la inducción del arresto al ciclo celular por citometría de flujo
 - 3.4 Determinar el efecto del extracto de polisacáridos (EP) sobre el índice de apoptosis por método de TUNEL

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

1. Compuestos Químicos

La α -amilasa, proteasa, amiloglucosidasa, dimetil sulfóxido, ácido tánico, estándares de rafinosa y estaquiosa, la tripcita, Hepes, ortovanodato de sodio, PMSF, leupeptina, el reactivo Folin-Ciocalteu y la estaurosporina, así como el carcinógeno azoximetano (AOM) fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., (USA).

La Acrilamida, bis-acrilamida, tris, SDS, TEMED, persulfato de amonio, mercaptoetanol, azul de Coomassie R-250, glicina, azul de bromofenol, se adquirieron de Bio Rad. El kit de quimioluminiscencia y solución bloqueadora fueron comprados de Roche. El glicerol fue suministrado por la marca Promega. El tween 20 fue adquirido de la marca Hycel de México. El nonidet P-40 de la marca Fluka y, el NaCl, la sacarasa, Tris-HCl, MgCl₂, KCl, acetona, etanol, ácido clorhídrico, acetonitrilo grado HPLC, cloroformo y metanol fueron de la marca J.T. Baker. Por último los anticuerpos para p21, p53, Bax, Bcl-2, Rb-P, Caspasa 3 y Actina fueron adquiridos de la marca Santa Cruz y las películas y soluciones de revelado de la marca Kodak.

2. Material Biológico

Se usaron ratas macho Sprague-Dawley de 4 semanas de edad de la misma línea genética, que fueron adquiridos en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Los animales se aclimataron por una semana en cajas de acrílico, con ciclo de luz-oscuridad 12/12 con libre acceso a agua y alimento (*ad libitum*).

Se utilizó frijol común (*P. vulgaris* L.) de la variedad Negro 8025, el cual fue proporcionado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Centro Experimental Bajío (INIFAP).

B. MÉTODOS

1. Cocción

El frijol fue tratado térmicamente siguiendo el protocolo reportado por Aparicio-Fernández *et al.* (2005). Brevemente, se colocaron cincuenta gramos de frijol en 250 mL de agua destilada. La cocción se llevó a cabo por 2.5 horas a $90 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Con la muestra se formó un homogenado el cual se liofilizó y almacenó a 4°C hasta su uso.

2. Extracción de polisacáridos

La extracción de polisacáridos se realizó con la técnica de Kurtzman y Halbrook (1970). A Trecientos gramos de muestra molida se le adicionaron 1500 mL de agua y se agitó por 1 minuto. Se centrifugó y al precipitado se le adicionó 100 mL de ácido tánico 10% ajustándose el pH a 4. Se sometió a agitación durante 5 minutos y se centrifugó a 9,000 g por 10 minutos. Al precipitado se le adicionó un total de 300 mL de acetona en 3 lavados cada uno de 100 mL, se homogenizó la muestra y se centrifugó a 9,000 g por 10 minutos en una centrifuga Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik, Alemania). El precipitado obtenido son los polisacáridos. El precipitado fue extendido en bandejas y se colocó en la estufa por 24 horas para eliminar los rastros de acetona.

3. Análisis químico proximal

Este análisis incluyó la determinación de cenizas, humedad, proteína y fibra dietética total. Estos análisis se realizaron empleando las metodologías descritas por la Asociación Americana de Químicos Analistas (AOAC, 2002).

3.1 Determinación de cenizas

Las cenizas de la muestra se determinaron siguiendo el método descrito por la AOAC, 2002, con la técnica No. 945.46. Se pesaron 2 g de muestra en un crisol de porcelana a peso constante, se calcinó durante 3 horas en una mufla precalentada a $550\text{-}600^{\circ}\text{C}$. Se enfrió el crisol en desecador y se pesó para calcular el porcentaje de cenizas hasta la primera cifra decimal.

CÁLCULOS:

$$[(W1 + M1) - (M2 - W1)] \times 100 = \% \text{ Cenizas.}$$

Donde:

W1 = Peso del crisol; M1 = Peso de la muestra; M2 = Peso de la muestra calcinada

3.2 Determinación de humedad

La humedad se determinó de acuerdo a la técnica No. 925.23, descrita por la AOAC (2002). Brevemente, se pesaron exactamente 5 g de muestra, en una cápsula de humedad previamente colocada a peso constante. Se colocó la muestra en la estufa por 30 minutos a 100°C, se secó y enfrió en un desecador a temperatura ambiente y se pesó.

CÁLCULOS:

$$\% \text{ de humedad y material volátil} = (W2 - W1) \times 100 / W \text{ Muestra}$$

Donde:

W2 = Peso de la cápsula + muestra; W1 = Peso de la cápsula + muestra (después de secado).

3.3 Determinación de proteína total

La proteína total se determinó utilizando el método 920.105 (Kjeldhal), descrito por la AOAC (2002). Se colocaron 1-2 g de muestra en un matraz de digestión Kjeldhal. Se agregaron 3.5 g de sulfato de sodio y 0.4 g de sulfato de cobre, más 10 mL de ácido sulfúrico. Se colocó en el digestor durante aproximadamente una hora, a que el contenido tomará un color verde claro, se dejó enfriar un poco y se colocó el tubo en el destilador, donde se le adicionaron agua destilada e hidróxido de sodio al 40%. El destilado se recibió en un matraz que contenía 25 mL de ácido bórico y como indicador rojo de metilo y verde de bromocresol. Posteriormente, se tituló con ácido clorhídrico 0.08 N. Se determinó nitrógeno (N) total multiplicado por un factor de conversión equivalente al % de proteína presente en el alimento.

CÁLCULOS:

$$\% N = (A - B) * C * D * 100$$

$$\% P = \% N (6.25)$$

Donde:

A = mL solución gastados en la muestra problema; B = mL solución gastados del blanco; C = meq N₂ 0.014; D = Normalidad del ácido; M = Peso de la muestra

3.4 Determinación de fibra total

La fibra total se determinó siguiendo la técnica No. 991.43, descrita por la AOAC (2002). A 2 g de muestra desgrasada con hexano se le añadieron 200 mL de ácido sulfúrico al 1.25%, se cubrió con un vidrio de reloj y se dejó hervir por 30 minutos, compensando las pérdidas de volumen que se produjeron durante la ebullición con agua destilada. Se filtró la solución a través de un papel filtro No. 1 y se lavó el residuo con agua destilada. El residuo se arrastró a un vaso con ayuda de un total de 100 mL de agua destilada caliente, se añadieron 100 mL de hidróxido de sodio al 2.5%, se hirvió por 30 minutos reponiendo las pérdidas de volumen con agua destilada. Se filtró en papel Whatman No. 1, para posteriormente pasarlo a una cápsula, se desecó por 3 horas a 115°C y finalmente se pesó.

CÁLCULOS:

$$\% \text{ Fibra total} = W4 - (W1 + W2 + W3) * 100/W3$$

Donde:

W1 = Cápsula 115°C; W2 = Papel filtro a peso constante; W3 = Muestra; W4 = Crisol + muestra + papel después de la calcinación

4. Extracción de fibra insoluble

La extracción de fibra insoluble se realizó siguiendo el método descrito por Shiga *et al.* (2003). Por cada gramo de frijol previamente cocido, liofilizado y pulverizado, se adicionaron 50 mL de solución amortiguadora de fosfato 0.08 mM a pH 6, (50 mL de hidróxido de Na 0.275 N y/o 50 mL de solución de HCl 0.375 N), seguida de 100 µL α-amilasa (0.1 mL) tapando el frasco y protegiendo de la luz. Se

incubó en baño María a 95°C por 30 minutos, agitando cada 5 minutos, se atemperó y se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 0.275N.

Posteriormente, se adicionaron 0.1 mL de proteasa (5 mg/mL) y se incubó en baño María a 60°C por 30 minutos con agitación continua, la muestra se atemperó y se ajustó el pH a 4-4.6 con HCl. Se adicionaron 0.3 mL de amiloglucosidasa, incubándose nuevamente en baño María por 30 minutos a 60°C con agitación continua. Al término de la incubación, la muestra se centrifugó a 9500 g por 20 minutos, en una centrífuga Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik, Alemania), se realizaron dos lavados con agua a 60°C (10 mL por lavado) y se agitó la muestra en vortex. Se volvió a centrifugar la muestra a 9500 g por 10 minutos, en una centrífuga Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik, Alemania), se decantó el sobrenadante y se almacenó a -70°C. Por último, la muestra se sometió al proceso de liofilización, se pesó y almacenó hasta su uso.

5. Cuantificación de oligosacáridos

5.1 Extracción etanólica

Siguiendo la metodología descrita por Gulewicz *et al.*, (2000) y Brenes *et al.*, (2003) se pesaron 10 g de muestra (polisacáridos y/o harina de frijol), se adicionaron 50 mL de etanol al 80% y la muestra se colocó en un plato caliente con agitación para someterse a flujo en un soxleth por 1 hora. Posteriormente, la muestra se atemperó, se centrifugó a 5000 g por 5 minutos, en una centrífuga Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik, Alemania) y al sobrenadante se le eliminó el etanol por rotoevaporación a 45°C; se liofilizó y se almacenó hasta su análisis.

5.1 Cuantificación de oligosacáridos

La cuantificación se realizó de acuerdo a las modificaciones hechas por Dubois *et al.*, (1956). Brevemente, partiendo de la extracción realizada en el inciso 5, se mezcló 10 mg del homogenado de la muestra más 10 mL de etanol al 80%. Se agitó por 5 minutos e inmediatamente después se centrifugó a 5000 g por 5 minutos, en una centrífuga Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik, Alemania) y el

sobrenadante se separó. Se tomó 1 mL del sobrenadante (por triplicado) y se colocó en un tubo de ensayo al cual se le adicionaron 25 μ L de fenol al 80% y se agitó. Inmediatamente después se adicionaron 2.5 mL de H₂SO₄ concentrado sobre la muestra y se agitó. La muestra se dejó interaccionar por 10 min, y se incubó en baño María a 25-35°C por 15 minutos. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 490 nm comparando contra una curva estándar en un intervalo de 10 a 100 μ L de los oligosacáridos de interés (rafinosa).

6. Cuantificación de fenoles

6.1 Extracción metanólica

La extracción se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Cardador-Martínez *et al.*, (2002). Brevemente, 200 g de muestra liofilizada se colocaron en un matraz y se mezcló con 50 mL de metanol. El matraz se protegió de la luz y se mantuvo en agitación (HAAKE modelo SWB20 a 40 rpm) por 24 horas a 25°C. Después se centrifugó a 4000 g por 10 minutos, en una centrífuga Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik, Alemania), mientras que el metanol se removió por rotaevaporación. Las muestras fueron liofilizadas y almacenadas en la oscuridad a -70°C hasta su análisis.

6.2 Cuantificación de taninos condensados

Los taninos condensados se cuantificaron de acuerdo a la metodología descrita por Desphanden y Cheryan (1985, 1987) con algunas modificaciones para su adaptación a microplaca. Se expresaron como mg equivalentes de (+)-catequina por gramo de muestra. Brevemente, 250 μ L de reactivo de vainillina-HCL (1:1) (vainillina 1% : HCl 4%) se adicionaron a 50 μ L del extracto metanólico (inciso anterior 6.1) y se analizaron en microplata, las muestras se evaluaron por triplicado. Los taninos condensados se cuantificaron en microplaca a una absorbancia de 495 y 540 nm en Multiskan (Thermo Electron Corporation, Multiskan Ascent^R, Model 51118307) comparando contra una curva estándar de (+)-catequina con un intervalo de 0 a 1 mg/mL del estandar de referencia.

6.3 Cuantificación de flavonoides

El contenido de flavonoides se cuantificaron por el método sugerido por Oomah *et al.* (2005). El método consiste en mezclar 50 μL del extracto metanólico (inciso 6.1) con 180 μL de agua destilada y 20 μL de solución de 2-aminoetildifenilborato (10%) en los pozos de la microplaca. Los pozos se leyeron a una absorbancia de 404 nm en el Multiskan (Thermo Electron Corporation, Multiskan Ascent^R, Model 51118307). El estándar de rutina se preparó en metanol 80%, la absorbancia del extracto se comparó con una curva estándar de rutina con un intervalo de 0 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los flavonoides se expresaron como mg equivalentes de rutina por gramo de muestra.

7. Extracción y cuantificación de almidón resistente.

Se partió de la fracción insoluble de la muestra y de acuerdo con el protocolo descrito por Shiga *et al.* (2003) y Saura-Calixto *et al.* (1993), a 100 mg de muestra se le adicionaron 6 mL de una solución de KOH (2 M) con agitación continua por 30 minutos a una temperatura de 25°C. Se adicionaron 3 mL de solución amortiguadora de acetatos (0.4 M, pH 4.75) y 5 mL de HCl (2 N). El pH se ajustó a 4.74 y posteriormente se adicionó 60 μL de amiloglucosidasa, se homogenizó e incubó por 30 minutos a 60°C en baño María con agitación continua. Las muestras se centrifugaron a 3000 *g* por 15 minutos en una centrifuga Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik, Alemania) y se colectó el sobrenadante. El residuo remanente se resuspendió con 10 mL de agua destilada y se repitió la centrifugación. El residuo obtenido es el almidón resistente, la muestra se liofilizó y pesó. La cuantificación se realizó por diferencia de pesos con respecto a la fracción insoluble de la muestra.

8. Bioensayo

8.1. Estrategia general

Se extrajeron los polisacáridos presentes en el frijol común (*P. vulgaris* L.) como se describe en el inciso 2, al que se denominó extracto de polisacáridos (EP). El EP se caracterizó en cuanto a su contenido de fibra dietética total, así como de oligosacáridos, taninos condensados, flavonoides y almidón resistente de acuerdo a

lo descrito en los incisos 4, 5, 6 y 7 respectivamente. El efecto del EP se analizó en dos bioensayos por separado: 1) realizado en la Universidad Autónoma de Querétaro, Posgrado en Ciencia de los Alimentos (PROPAC), Fac. de Química y 2) realizado en la Universidad de Lleida, Cataluña, España, como parte del programa de estancias en el extranjero para la formación de Doctores promovido por el CONACYT.

8.1.1. Primer bioensayo

En el bioensayo se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de cuatro semanas de edad los cuales se mantuvieron en jaulas metálicas, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y temperatura de 25°C. Se les suministró agua y alimento (2018S Harlan Tekland) *ad libitum* y semanalmente se monitoreó su peso y consumo de alimento. El frijol cocido, el EP y NaBu (como control anticancerígeno) se administró diariamente en una sola toma vía sonda intragástrica. El azoximetano (AOM) se administró vía subcutánea a una dosis de 15 mg/Kg por dos semanas (primera y segunda semana de tratamiento). Después de una semana de aclimatación, las ratas se dividieron en 8 grupos (n = 10). 1) Grupo control, dieta basal y agua *ad libitum*; 2) Grupo de frijol, dieta basal más el frijol cocido (3.2 g/Kg de peso corporal); 3) Grupo de EP, dieta basal más el EP (1.84 g/Kg de peso corporal); 4) Grupo AOM, dieta basal más AOM; 5) y 6) Grupos de Frijol cocido y EP más AOM, respectivamente; 7) Grupo NaBu, dieta basal más NaBu (1.2 mM) y 8) Grupo NaBu más AOM, dieta basal mas NaBu y AOM. (Figura 16). El tratamiento tuvo duración de siete semanas, recolectandose semanalmente las heces de cada uno de los tratamientos, para determinar la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Los animales se sacrificaron, se disectó el colon y se recolectó el contenido cecal, colónico y heces, para determinar en cada uno de ellos la concentración de AGCC. El colon se dividió en zona proximal y distal, se fijó y congeló el tejido para análisis histológicos y la expresión de genes y proteínas.

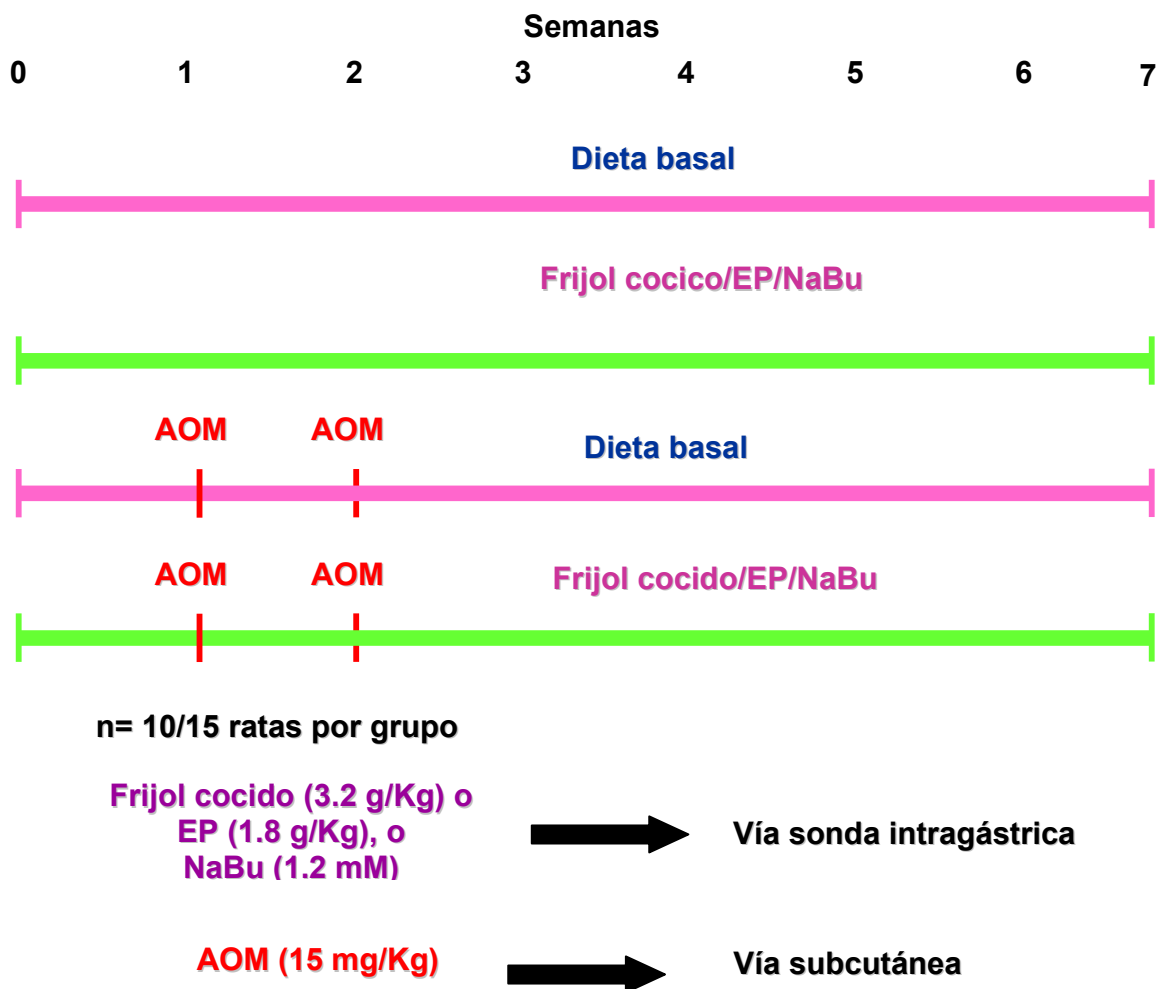


Figura 16. Estrategia general del modelo *in vivo*

8.1.2. Segundo bioensayo

De igual manera que en el inciso anterior, se utilizaron ratas macho Sprague Dawley con las mismas características de edad y condición de manutención. Se siguió el diseño experimental descrito anteriormente para evaluar el efecto quimioprotector del EP con algunas modificaciones. Los animales se dividieron en 4 grupos (n = 15). 1) Grupo Control, dieta basal y agua *ad libitum*; 2) Grupo EP, dieta basal más el EP 1.84 g/Kg de peso corporal); 3) Grupo AOM, dieta basal más AOM una vez a la semana durante dos semanas vía subcutanea (15 mg/Kg de peso corporal) y 4) Grupo EP más AOM, dieta basal más EP y AOM. Al final del periodo experimental de 7 semanas los animales se sacrificaron y se disectó el colon

9. Medición del pH

Como una medida indirecta del contenido de ácidos grasos de cadena en el contenido cecal, colónico y heces, se midió el pH de acuerdo a procedimiento descrito por Nakanishi *et al.* (2003). Un gramo de contenido cecal, ó contenido colónico ó heces (cada una de la muestras por tres repeticiones) se resuspendió en agua (5 veces su volumen), se homogenizó y midió el pH.

10. Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

La concentración de ácidos grasos de cadena corta en el contenido cecal, colónico y heces, se llevó a cabo de acuerdo a la técnica descrita por Zhao *et al.* (2006) con modificaciones. Un gramo de contenido cecal, colónico y heces, se suspendieron en agua (5 veces su volumen), y se homogenizaron. La suspensión se centrifugó a 8,000 g por 10 minutos a 4°C en una centrífuga Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik, Alemania) y se ajustó el pH (2-3) con HCl 0.1 M. El sobrenadante se filtró con una membrana (0.45 µm) y se inyectó para su análisis en el cromatógrafo de gases (CG).

Se inyectó 1.5 µL de la muestra en un equipo Hp 6890 Plus acoplado a un detector de flama (Hp 30 M, CARBOWAX 30 M, columna capillary 25.0 m x 320 µm x 0.30 µm nominal). Se empleó como gas acarreador helio a un flujo de 0.5 mL/min. La temperatura inicial del horno fue de 95°C, la cual se mantuvo por 2 minutos y se elevó a 140°C a 20°C/min. Los ácidos acético, propiónico y butírico fueron empleados como estándares externos (0-100 mM/mL) para cuantificar los AGCC en los productos de la fermentación.

En la figura 17 se muestran los cromatogramas representativos de la mezcla de estándares y de una muestra.

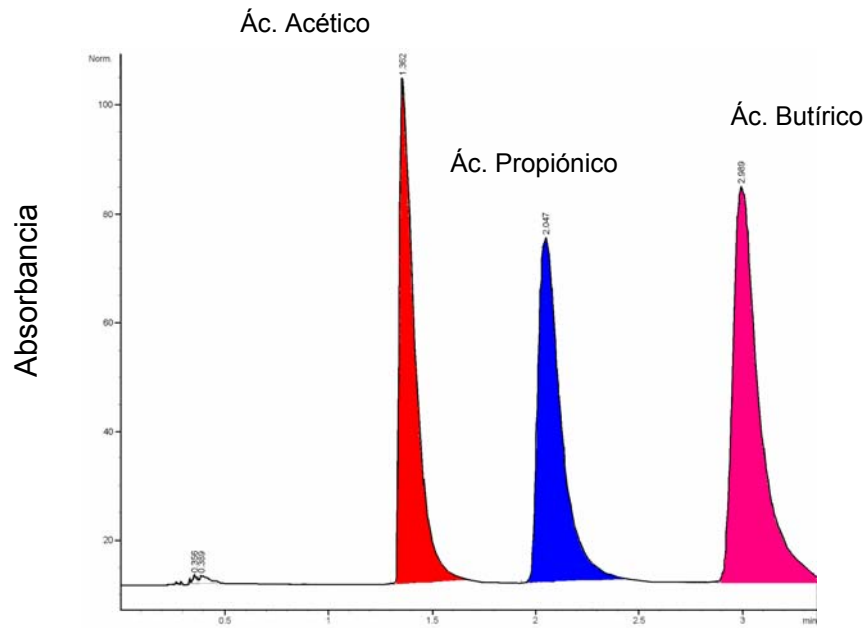
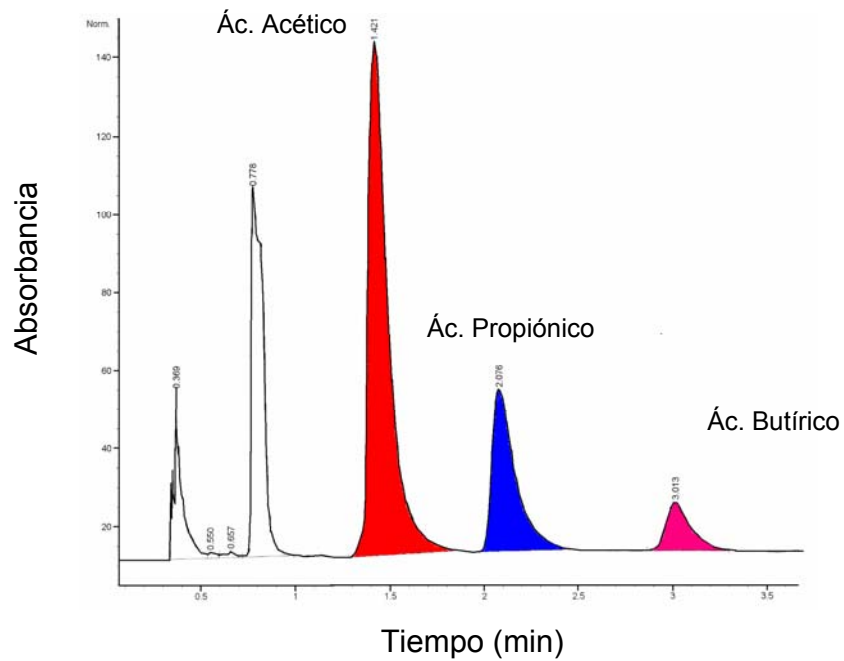
A**B**

Figura 17. Identificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por cromatografía de gases. **A.** Mezcla de estándares de AGCC. **B.** Muestra de heces de rata alimentadas con polisacáridos de frijol. Tiempos de retención: Ácido acético (1.3 a 1.4 minutos), ácido propiónico (2 a 2.1 minutos) y ácido butírico (2.9 a 3 minutos).

11. Determinación de fosas crípticas aberrantes (FCA)

La frecuencia de FCA se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Bird (1987), así como mediante las tinciones de Dapi (Tanaka *et al.*, 1997) con algunas modificaciones, y hematoxilina y eosina. Brevemente, los animales una vez sacrificados se les disectó el colon, se abrió longitudinalmente y se lavó con solución amortiguadora de fosfatos de potasio (20 mM) estéril y fría. El colón se dividió en la zona proximal (3 a 5 cm a partir de la base ciego-colon) y zona distal (7 cm a partir de la base anal), la parte entre la zona proximal y distal se consideró la zona media del colon (Figura 18).

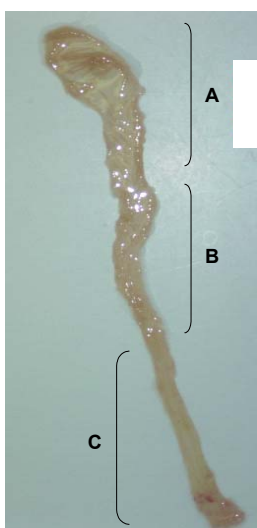


Figura 18. Fotografía representativa de las diferentes zonas de colon de rata. **A.** Zona proximal (ciego y parte del colon ascendente), **B.** Zona media (colon ascendente y porción del colon descendente) y **C.** Zona distal (colon descendente hasta el ano).

11.1 Azul de metileno

Una vez obtenidas las zonas colónicas de interés (proximal y distal), estas se fijaron en paraformaldehído 10% por 24 horas. Después de la fijación el colon se tiñó con azul de metileno 0.2% por 10 minutos y posteriormente se lavó con solución amortiguadora de fosfatos de potasio (20 mM) y agua destilada para quitar el excedente de azul de metileno. Las zonas se analizó con un estéreo microscopio. Las

FCA se distinguen del tejido normal por su deformidad en el tamaño y forma, agrandamiento hacia la superficial mucosa, agrupamiento de núcleos en la zona apical de la cripta colónica de acuerdo al método usado por Bird (1987).

11.2 Tinción con Dapi y/o hematoxilina y eosina (H&E)

La zona colónica fue fijada con paraformaldehído al 4% amortiguado y se realizaron cortes en criostato (12 micras) se montaron y tiñeron con Dapi, se observaron al microscopio 20X (Magnificación 200).

En el caso de H&E, posterior a la fijación, las muestras se deshidrataron con gradientes de alcohol-xilol y se parafinaron. Se realizaron cortes en microtomo (5 μ m) (con orientación de tejido vertical y horizontal), se tiñeron con H&E. Las muestras se observaron al microscopio 20X y 40X (Magnificación 200 y 400).

12. Expresión de genes por RT-PCR

12.1 Extracción de ARN.

La extracción de ARN se realizó de acuerdo a las instrucciones propuestas en el manual RNeasy; (QIAGEN, 2001). Para la extracción de ARN total del tejido proximal y distal se eligió este método por que tener la propiedad de poder aislar mayor cantidad de ARNm, debido a que combina la tecnología micro-spin en la cual una de las propiedades es la unión selectiva de la membrana de sílica gel de la columna provista en el protocolo y la velocidad de centrifugación. Con este procedimiento todas las moléculas ≥ 200 nucleótidos pueden ser aisladas, es decir los ARNm, que son necesarios para la síntesis de ADNc de cadena sencilla, ya que contienen en su extremo 3' una secuencia poli A por lo que pueden ser seleccionados con un oligo dT y empleados como templados para dicha síntesis.

1. Se pesaron 100 mg de tejido congelado, por separado tanto de la zona proximal como de la zona distal del colon.

2. Enseguida se colocó la muestra en un mortero estéril previamente congelado, y se le adicionó nitrógeno líquido para pulverizar completamente el tejido, teniendo especial cuidado en no dejar que éste se descongelara.
3. Se decantó el polvo en un tubo de microcentrífuga de 2 mL libre de ARNasas y se congeló en nitrógeno líquido, permitiendo que el nitrógeno se evaporara pero que el tejido no se descongelara.
4. Inmediatamente se adicionaron 500 μ L de regulador (solución amortiguadora de lisis) RLT (por cada mL se adicionan 10 μ L de mercapto etanol), se agitó en aparato vortex vigorosamente durante 1 min.
5. Se incubaron los tubos por 3 minutos a 65°C.
6. El lisado se pasó directamente en la columna lila (QIAShedder Mini Column) la cual se colocó sobre un tubo colector de 2 mL y se centrifugó a 12,000 g por 2 minutos. Cuidadosamente se transfirió el filtrado a un nuevo tubo de 1.5 mL sin tocar la pastilla formada en el fondo del tubo colector.
7. Se adicionaron 225 μ L de etanol (96-100%) frío para limpiar el lisado y se mezcló lentamente por pipeteo.
8. La muestra, incluyendo el precipitado en caso de que se haya formado, se pasó a una columna rosa (RNeasy Mini Column) conectada a un tubo colector de 2 mL, la columna se cerró suavemente para centrifugar a 10,000 g por 15 segundos y posteriormente se descartó el filtrado.
9. Se adicionó 700 μ L del regulador (solución amortiguadora de lavado 1) RW1 a la columna rosa (Rneasy Mini Column) y se centrifugó a 10,000 g por 15 segundos y se descartó el filtrado.
10. Se preparó en un tubo por separado la siguiente mezcla de: 4 μ L de ADNasa I solución stock y 70 μ L de regulador (solución amortiguadora de resuspensión) RDD, se mezcló con precaución para evitar la desnaturalización de ADNasa I, por lo que el mezclado se realizó por inversión del tubo únicamente.
11. Se adicionó la mezcla de ADNasa I (74 μ L) directamente sobre la membrana de sílica-gel de la columna rosa y se incubó de 20-30°C por 15 minutos, teniendo especial cuidado en que la mezcla cayera sobre la membrana y no en las paredes.

12. Se adicionó 350 μL de regulador (solución amortiguadora de lavado 1) RW1 en la columna rosa y se centrifugó a 10,000 g por 15 segundos, y se descartó el filtrado.
13. La columna rosa se transfirió a un nuevo tubo colector limpio de 2 mL y se adicionaron 500 μL de regulador (solución amortiguadora de lavado PE) RPE directamente a la columna; se cerró suavemente y se centrifugó a 10,000 g 15 segundos para lavar la columna se descartó el fluido.
14. Se adicionaron otros 500 μL de regulador RPE a la columna, para un segundo lavado, y se centrifugó a 10,000 g por 2 minutos para secar la membrana de sílica gel.
15. Se transfirió la columna rosa a un tubo colector nuevo de 2 mL y centrifugó a 12,000 g por 1 minuto (para eliminar posibles trazas de regulador RPE).
16. Para la elución del ARN, se transfirió la columna a un nuevo tubo colector de 1.5 mL y se adicionó 50 μL de agua libre de ARNasas directamente a la membrana de sílica gel, se cerró el tubo y se centrifugó a 12000 g por 1 minuto para fluir.
17. Como el rendimiento esperado de ARN fue $>20 \mu\text{g}$, se repitió el paso de elución (paso 16); adicionando un segundo volumen de agua libre de ARNasa. Se fluyó en el mismo tubo colector.
18. Para obtener una mayor concentración de ARN total, ésta segunda elución se realizó empleando el primer eluido del paso 1, el rendimiento fue del 15 al 30% menos que el rendimiento obtenido usando un segundo volumen de agua libre de ARNasa, pero la concentración final fue mayor.

Para corroborar la extracción de ARN total se realizó una electroforesis del producto de la extracción en gel de agarosa desnaturalizante, el cual se preparó de la siguiente forma:

12.2 Detección y evaluación de la calidad del ARN

La agarosa desnaturizante se preparó mezclando:

- 0.96 g agarosa
- 8 mL de MOPS 10X
- 2.4 mL Formaldehído 37%
- 69.6 mL agua destilada estéril con DEPC

El procedimiento fue:

1. Se fundió la agarosa en el agua con DEPC
2. Se enfrió hasta aproximadamente 42°C.
3. Se adicionó MOPS 10X
4. Se adicionó formaldehído
5. Se adicionó 1µL de bromuro de etidio.

Se vació la agarosa en la cámara de electroforesis colocando el peine con el tamaño de pozo adecuado para el volumen de nuestras muestras, se esperó a que se solidificará, se retiró el peine y se adicionó a la cámara el regulador de corrida MOPS 1X, el cual se preparó a partir de MOPS 10X para la dilución se utilizó agua tratada con DEPC hasta alcanzar la concentración 1X. El volumen del regulador de corrida en la cámara de electroforesis fue tal que cubrió la superficie del gel, posteriormente se cargaron las muestras de ARN mezcladas con el regulador de carga el cual proporciona mayor densidad a las muestras para que éstas permanezcan dentro del pozo y además para observar el avance de la electroforesis.

12.3 Cuantificación de ARN

El ARN se cuantificó utilizando dos métodos:

- 1) Biofotómetro Marca eppendorf. Este método nos permite cuantificar el ARN adicionando a una pequeña cantidad de muestra (2 µL) agua grado HPLC. Es uno de los métodos más exactos y permite un análisis rápido y sencillo.
- 2) Fluorómetro TBS-380, Marca Turner Biosystems. Es un método a microescala permite la cuantificación de muestras con poca cantidad (1 µL), utilizando

soluciones especiales de fluorescencia (TE 1X, Ribogreen), es un método exacto, con alta sensibilidad, rápido y sencillo.

12.4. Obtención de ADNc

12.4.1 Síntesis de ADNc de cadena sencilla

La síntesis de ADNc de cadena sencilla se llevó a cabo de acuerdo con el manual SMART PCR cDNA síntesis y la enzima SUPER SCRIPT II, para posteriormente emplearlo en la técnica de hibridación substractiva.

La enzima SUPER SCRIPT II (Life Technologies), tiene la capacidad de aumentar la probabilidad de que los mensajes sean transcritos completamente, debido a que posee actividad de transferasa terminal, la cual añade algunos nucleótidos de deoxicitidina al extremo 3' del ADNc, lo que permite que el oligonuclótido SMART II A, se acople creando un templado extendido, asegurando así la transcripción del mensaje completo (Clontech, 2001). Además, esta enzima está genéticamente diseñada mediante la introducción de mutaciones puntuales, en lugar de la delección del centro activo de la ARNasa H, por lo que reduce de 10^6 a 10^7 veces la actividad ARNasa H y las mutaciones selectivas producidas en el centro activo mantienen completa la actividad polimerasa. Esto permite mejorar la calidad y rendimiento de la síntesis de ADNc de cadena sencilla.

A partir de una concentración de 185.13 ng se realizaron alícuotas en cada una de las muestras para utilizar 3 μ L de ARN total como templado para la síntesis de ADNc de cadena sencilla.

1. Para cada muestra control y problema de ARN de estudio se mezclaron los siguientes reactivos en un tubo eppendorf estériles de 0.5 mL respectivamente:

	3 μ L	de ARN Total
+	1 μ L	3' oligonucleótido II A SMART CDS (10 μ M)
	<u>1 μL</u>	<u>Oligonucleótido SMART II A (10 μM)</u>
	5 μ L	Volumen Total

2. Se mezcló y centrifugó brevemente a velocidad máxima por 5-6 segundos en una microcentrífuga de mesa.
3. Se incubó la reacción a 70°C en un termociclador por 2 minutos.
4. Se centrifugó brevemente para coleccionar los contenidos en la tapa.
5. Se añadieron los siguientes reactivos a cada tubo de reacción:
 - 2 µL Regulador de primera cadena 5X
 - 1 µL DTT (20 mM)
 - 1 µL dNTP 50X (10 mM)
 - 1 µL Transcriptasa reversa SuperScript II.
6. Se mezcló en vortex y se centrifugaron los tubos brevemente.
7. Se incubaron los tubos a 42°C por 1 hora en un termociclador.
8. Se diluyó el producto de la reacción de primera cadena adicionando 40 µL de regulador TE (10 mM Tris [pH 7.6], 1 mM EDTA).
9. Se calentaron los tubos a 72°C por 7 min.
10. Las muestras pueden almacenarse hasta por tres meses a -20°C.

12.4.2 Síntesis de ADNc de doble cadena

El ADNc de cadena sencilla tiene en sus extremos secuencias que sirven como sitios de reconocimiento para que el oligonucleótido PCR se una y se inicie con la amplificación por PCR, por lo cual es necesario determinar el número de ciclos óptimo de PCR necesarios para obtener un ADNc de doble cadena que mejor represente los ARNm presentes en cada condición. La optimización del número de ciclos óptimo para la amplificación de la segunda cadena es importante debido a que esto asegura que los ADNc se encuentran en su fase exponencial de amplificación; es decir todos los ADNc provenientes de los ARNm se encuentran expresados.

Se llevó a cabo un barrido de ciclos de PCR: 15, 18, 21, 24, 27 y 30 como se muestra a continuación:

Para cada muestra control y problema, se adicionó un tubo extra de reacción para determinar el número óptimo de ciclos de PCR, debido a que es necesario llevar

la amplificación de ADNc de doble cadena a la fase exponencial. El protocolo se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se calentó el termociclador a 95°C.
2. Para cada reacción, se empleó 4µL de ADNc de cadena sencilla
3. Se preparó la mezcla de reacción para todos los tubos, más un tubo adicional, se mezclaron los siguientes componentes en el orden en que se enlistan a continuación:

Para cada reacción:

78.5 µL Agua desionizada
0.5 µL Taq Platinum
10.0 µL Regulador 10X Minus Advantage 2 PCR
+ 2.0 µL dNTP 50X (10 mM)
2.0 µL Oligonucleótido 5' PCR Primer II A (10 µM)
3.0 µL Mezcla Advantage MgCl₂
96.0 µL Volumen total

4. Se mezcló en vortex y se centrifugó brevemente a velocidad máxima por 5-6 segundos en una centrífuga de mesa.
5. Se colocaron 96 µL de la mezcla anterior y se adicionaron al tubo del paso 2
6. La mezcla se dividió en dos tubos uno con 75 µL y otro con 25 µL, se cerraron los tubos y se colocaron en el termociclador precalentado.
7. Se inició la amplificación por PCR utilizando el programa para el termociclador PE9700: el paquete proporciona las condiciones adecuadas dependiendo del termociclador con que se cuente.

PE9700

- ❖ 95°C 1 min
- ❖ x ciclos
- 95°C 5 s
- 65°C 5 s
- 68°C 6 min

Se llevaron todos los tubos a 15 ciclos y el tubo con 75 μL se almacenó a 4°C. Para determinar el número óptimo de ciclos de PCR, como se describe a continuación:

8. Para cada tubo extra (25 μL) se determinó el número óptimo de ciclos de PCR
 - a. Se transfirieron 5 μL de cada tubo a los 15 ciclos en tubo nuevo.
 - b. Se corrieron tres ciclos adicionales para un total de 18 ciclos con los 25 μL de cada tubo extra.
 - c. Se transfirieron 5 μL del tubo de los 18 ciclos a un tubo nuevo
 - d. Se corrieron tres ciclos adicionales para un total de 21 ciclos con los 20 μL restantes de la mezcla de PCR.
 - e. Se transfirieron 5 μL de los 21 ciclos a un tubo nuevo
 - f. Se corrieron tres ciclos adicionales para un total de 24 ciclos con los 15 μL restantes de la mezcla de PCR.
 - g. Se transfirieron 5 μL de los 24 ciclos a un tubo nuevo
 - h. Se corrieron tres ciclos adicionales para un total de 27 con los 10 μL restantes de la mezcla de PCR.
 - i. Se transfirieron 5 μL de los 27 ciclos a un tubo nuevo
 - j. Se corrieron tres ciclos adicionales para un total de 30 con los 5 μL restantes de la mezcla de PCR.
9. Se llevó a cabo una electroforesis de 5 μL de cada tubo de reacción de PCR junto a 0.1 μL de marcador de ADN de 1.0 kb en un gel de agarosa al 1.2%/EtBr en solución reguladora TAE 1X.
10. Los tubos de 15 ciclos de PCR almacenados a 4°C fse colocaron en el termociclador, para llevar a cabo los ciclos adicionales, hasta que se alcanzó el número óptimo de ciclos.
11. Cuando el número de ciclos se completó, se analizaron 5 μL de la muestra junto a 0.1 μL de marcador de tamaño 1 kb en un gel de agarosa al 1.2%/EtBr en solución reguladora TAE 1X.
12. Se adicionaron 2 μL de EDTA 0.5 M a cada tubo para terminar la reacción.
13. Los productos de PCR para cada una de las muestras se almacenaron a -20°C.

12.4.3 Detección de ADNc de doble cadena sintetizado

Para iniciar con el análisis de la síntesis de ADNc de doble cadena fue necesario llevar a cabo una electroforesis en gel de agarosa como se indica (Cuadro 23, Anexos):

Se pesaron 1.2 g de agarosa y se adicionaron 2 mL de TAE 50X más 98 ml de agua destilada estéril en un matraz, después se mezcló y se calentó en horno de microondas 1.5 minutos, se dejó enfriar y se adicionó 1 μ L de bromuro de etidio.

1. Se vació la agarosa dentro del molde de la cámara de electroforesis, colocando un separador en un extremo del molde para generar pozos, se esperó a que solidificase la agarosa, con precaución el separador fue retirado y se adicionó regulador de corrida TAE 1X hasta cubrir la superficie del gel perfectamente.
2. Se adicionaron 3 μ L de marcador de tamaño molecular 1.0 kb al carril 1.
3. Empleando una punta estéril se tomaron 5 μ L de ADNc de doble cadena y 2 μ L de regulador de carga, se mezclaron por pipeteo y se depositaron los 7 μ L en el siguiente pozo del gel.
4. Se aplicaron 86 volts durante 45 minutos ó hasta antes que las bandas del regulador de carga alcanzaran el final del gel.
5. Se observó el gel con una lámpara de luz ultravioleta, empleando el software BioCaptMW Versión 10.02, la imagen se guardó en formato TIF o JPG.

12.5 RT-PCR

Para la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR) se utilizó la formulación indicada en el cuadro 24 (Anexos) y los productos de la amplificación pueden ser visualizados en el gel de agarosa y la expresión de genes en el software (Larrick y Siebert, 1995).

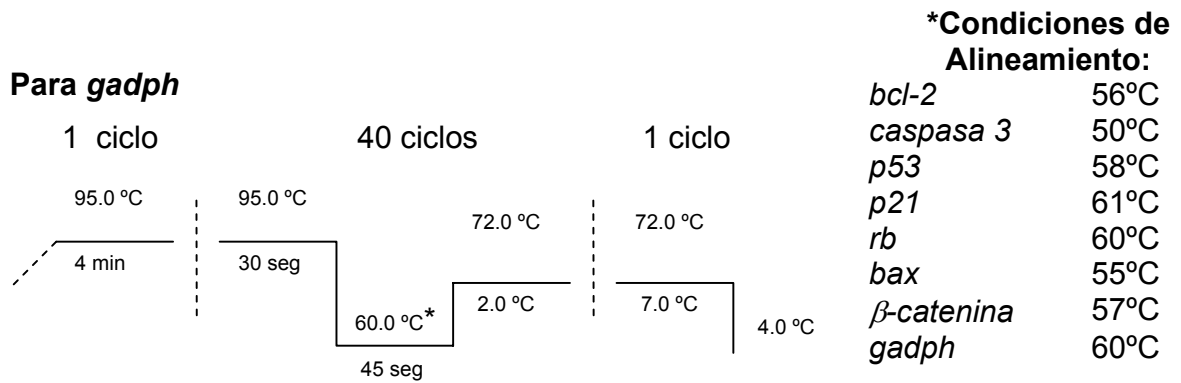
En la reacción en cadena RT-PCR, se utilizarán oligonucleótidos específicos que permiten visualizar la expresión de los genes involucrados en la carcinogénesis y

poder comparar con un control y los tratamientos. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía Invitrogen (Cuadro 5).

Una vez mezclados los reactivos para la amplificación del gene por RT-PCR se siguieron los siguientes pasos:

1. Los reactivos, se colocaron en un tubo de centrifugación de 500 μL.
2. Se agregó 1 μL del ADNc
3. Se colocaron en el termociclador y se ejecutaron por separado los programas de corrida para cada uno de los genes de interés.

Ejemplo de las condiciones de corrida para RT-PCR de cada uno de los genes de interés.



Cuadro 5. Oligonucleotidos de los diferentes genes involucrados en el proceso de carcinogénesis de colon

GEN	NO. ACCESO	SECUENCIA	(pb)
<i>Caspasa 3</i>	XR_009516	Sentido: TTCATCATTGACACCTGC Anti-sentido: ACGGGTAAGGATGTGCATGAAT	247pb
<i>p21</i>	U24174	Sentido: GGACAGTGAGCAGTTGAGC Anti-sentido: GAGTGCAAGACAGCGACAAGG	288pb
<i>p53</i>	NM_030989	Sentido: GCAGCACAGGAACCTGGAAC Anti-sentido: ATGATGGTAAGGATGGGC	582pb
<i>bcl-2</i>	NM_016993	Sentido: GGGAGAACAGGGTATGATAAC Anti-sentido: GCAGATGCCGGTTCAGGTACT	540pb
<i>bax</i>	NM_017059	Sentido: GGCCCACCAGCTCTGAACAGT Anti-sentido: TCAGCTCGGGCACTTTAG	370pb
<i>rb</i>	L07126	Sentido: CAGATTTTCATACCTCAGACCCTCT Anti-sentido: ACACTTGTATGAGGGAAAAC	364pb
<i>β-Catenina</i>	XM_001137591.1	Sentido: GCTGACGTCGTACTIONCAGGCA Anti-sentido: TCCACATCCTCTTCCTCAGG	211pb
<i>gadph</i>	NM_017008	Sentido: GCTCCTACCATTGCTGACA Anti-sentido: TCAAGACGAATAAACTCATCG	291pb

(www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)

12.5.1 Detección de los productos de RT-PCR

Se pesaron 1.2 g de agarosa y se adicionaron 100 mL de TAE 1X en un matraz, después se mezcló y se calentó en horno de microondas 1.5 minutos, se dejó enfriar y se adicionó 1 μ L de bromuro de etidio.

El procedimiento paso a paso fue:

1. Se vació la agarosa dentro del molde de la cámara de electroforesis, colocando un separador en un extremo del molde para generar pozos, se esperó a que solidificara la agarosa. El separador fue retirado con precaución y se adicionó regulador de corrida TAE 1X hasta cubrir la superficie del gel perfectamente.
2. Se adicionaron 0.5 μ L y 1 μ L de marcador de tamaño molecular 1.0 kb al carril 1 y 9, respectivamente
3. Empleando una punta estéril se tomaron 5 μ L de los productos de RT-PCR y 2 μ L de regulador de carga, se mezclaron por pipeteo y se depositaron los 7 μ L en el siguiente pozo del gel.
4. Se aplicaron 86 volts durante 45 minutos ó hasta antes que las bandas del regulador de carga alcanzaran el final del gel.
5. Se observó el gel con una lámpara de luz ultravioleta, empleando el software BioCaptMW Versión 10.02, la imagen se guardó en formato TIF o JPG.
6. Se llevó a cabo la cuantificación de la expresión de cada uno de los genes con los diferentes tratamientos, mediante el software de análisis Quantity One Marca Bio-Rad.

13. Expresión de proteínas involucradas en arresto al ciclo celular y apoptosis

13.1 Extracción de proteína

Se tomaron 500 mg de tejido congelado (zona proximal y distal del colon) y se trituraron en mortero previamente congelado y en presencia de nitrógeno líquido. Las muestras se colocaron en tubos cónicos y se adicionaron cuatro volúmenes de solución amortiguadora pH 7.5. Posteriormente, las muestras se homogenizaron con un politrón (Cinemática, Suiza) hasta que no fue visible ningún grumo de tejido. Los homogenizados se incubaron por 45 minutos a 4°C con agitación y se centrifugaron

por 15 minutos a 10,000 g a 4°C en una centrífuga Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik, Alemania). Al término, se removió el sobrenadante con la ayuda de una pipeta pasteur y se transfirió en tubos, los cuales se centrifugaron por una hora a 100,000 g a 4°C en una ultracentrífuga Beckman Optima L-90K (Beckman, EUA). La fracción microsomal se encuentra en la pastilla y el citosol se removió con la ayuda de una pipeta pasteur. Los extractos citosólicos (proteína) se almacenaron en tubos eppendorf a -70°C hasta su análisis.

13.2 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas de los extractos citosólicos se realizó por el método Lowry, utilizando albúmina bovina como estándar (curva de calibración 0 a 100 µg). Se realizó una dilución 1:1 de los extractos citosólicos de la zona proximal y distal del colon, con solución digestora. Posteriormente, se colocaron 200 µL de cada una de las muestras y se les agregó 1 mL de la solución C (Mezcla de la solución A y B de Lowry 1:20). Se adicionó 100 µL de reactivo de Folin (1:1) y se mezcló en vortex por 5-15 segundos. Se dejó incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se leyó a una longitud de onda de 660 nm en un espectrofotometro y se calculó la concentración de proteínas.

13.3 Análisis de Western Blot

El análisis de Western blot se utilizó para medir los niveles de expresión de las proteínas: p53, p21, Rb, Bax, Bcl-2 y caspasa 3, de acuerdo a lo descrito por Lakshman *et al.* (2004). Estas proteínas se separaron por electroforesis de acuerdo a su peso molecular en una matriz desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE), después se transfirió a una membrana y finalmente se incubó con el anticuerpo que reconoce la proteína de interés.

13.3.1 Electroforesis SDS-PAGE

Los tejidos de la zona proximal y distal del colon se disectaron para obtener los extractos de proteínas. Las muestras se desnaturizaron con solución digestora que contiene β-mercaptoetanol en baño maría a 60°C por 20 minutos. Las muestras

se cargaron (100 μg de proteína) en un gel al 10% (SDS-PAGE) con un espesor de 1 mm (Cuadro 26, Anexos) y se separaron a través de un sistema Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad Laboratories) durante 95 minutos a 120 Volts con una temperatura de 4°C (Figura 19)

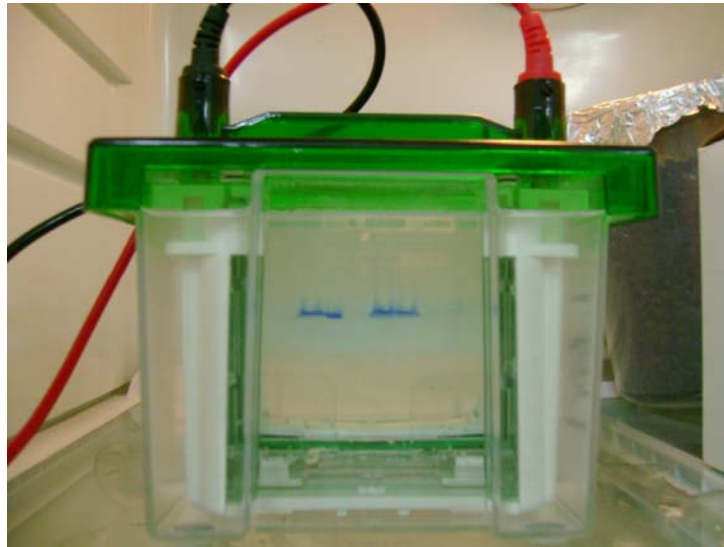


Figura 19. Ejemplo representativo del corrimiento de las proteínas por electroforesis SDS-PAGE

13.3.2 Inmunoblot

Una vez separadas las proteínas, se transfirieron 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 tiñiendo la membrana 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 (1:2000) a temperatura ambiente con agitación constante. Los anticuerpos se disolvieron 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 de interés (1:2000) 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 (Roche Molecular Biochemicals) en la oscuridad y se expuso a una película fotográfica Kodak BioMax Light (Eastman Kodak Company, Rochester, NY) a diferentes tiempos. Para el revelado y fijación de la película se emplearon soluciones comerciales (Kodak). Las bandas se cuantificaron con software ImagenJ versión 1.39, los valores se expresaron como porcentaje de intensidad de pixeles.

14. Citometría de flujo

Una vez sacrificados los animales, el colon se disectó y limpió con solución amortiguadora de fosfatos de potasio (20 mM) estéril y fría, se tomaron muestras de

aproximadamente 1.5 cm de las zonas de interés (proximal y distal) y se siguió el siguiente procedimiento:

- 1.- Se limpió la mucosa del colon con bisturí raspado el tejido con una solución de PBS.
- 2.- Posteriormente, se realizó una disgregación tisular hasta obtener una suspensión celular monodispersa pasando el fluido a través de una aguja intramuscular de 21 G, ajustando la concentración a 1×10^6 células/mL de acuerdo con la densidad de la solución.
- 3.- Se procedió seguidamente a su filtrado con malla de nylon de 50 μm de poro y centrifugado a temperatura ambiente durante 10 minutos a 2,000 g. en centrífuga clínica.
- 4.- Se decantó el sobrenadante y el pastilla se resuspendió en 100 μL de solución de lisis (DNA-prep, Coulter[®]) durante 8 segundos.
- 5.- Se tomaron 100 μL de la suspensión y se incubaron con una solución de yoduro de propidio añadiendo ARNasa comercial (DNA-prep, Coulter[®]) durante 15-20 minutos en oscuridad y después se procedió a su lectura con citómetro de flujo EPIC PROFILE.
- 6.- El análisis de los resultados se realizó mediante el software CYTOWIN, Multicycle y para visualización de los histogramas se empleó el software WINDI 2.9

15. Determinación de núcleos apoptóticos (TUNEL)

Se trabajó con muestras embebidas en parafina de las zonas colónicas de interés (proximal y distal) que fueron cortadas en microtomo a 5 μm .

- 1.- Se llevó a cabo la desparafinación de la muestra e hidratación de la misma con ayuda de estufa a 60°C y solventes xilol-alcohol-agua-H₂O₂
- 2.- Se sumergieron las muestras en solución TdT por 5 minutos (TdT-Frag Kit de detección de la fragmentación del ADN (Oncogene Research Products, San Diego, CA)
3. Se adicionaron 1.2 mL de la solución de reacción de TUNEL a las muestras y se dejó actuar por 1 hora a 37°C en cámara húmeda.

La reacción contenía:

1060 µL de Agua bidestilada	125 µL de Solución stock de TdT
12.5 µL de Bio-dUTP	3.75 µL de Terminal transferasa (TdT)

4.- La reacción se detuvo sumergiendo las muestras en solución stop durante 15 minutos. La solución stop contiene: (300 mM de ClNa y 30 mM de citrato sódico)

5.- Se realizaron lavados con PBS 0.1 M durante 5 minutos.

6.- Se realizó un lavado con PBS suplementado con 1% de albúmina bovina durante 10 minutos.

7.- Las muestras se hicieron reaccionar con el kit de detección de la fragmentación del ADN TdT Fragel durante 30 minutos en oscuridad (Kit comercial QIA33, Oncogene Research Products, San Diego, CA)

8.- Se lavaron las muestras dos veces con PBS.

9.- Las muestras interaccionaron con DAB (Diaminobencidina) en PBS.

10.- Posteriormente, se realizaron lavados con agua bidestilada y se tiñeron las muestras con Hematoxilina Mayer por 2 minutos.

11.- Se lavaron las muestras con alcohol ácido por 5 segundos y agua destilada corriente por 10 minutos.

12.- Se deshidrataron las muestras con gradientes de alcohol-xilol-eucaliptol y se montaron.

16. Análisis estadístico

Los valores se expresaron como la media \pm error estándar seguido de la prueba de Tukey y Dunnett con el programa JMP5.1.1

El análisis bromatológico, la cuantificación de azúcares, fenoles totales, polisacáridos, fibra total, contenido de oligosacáridos y ácidos grasos de cadena corta se realizó tres réplicas con dos repeticiones cada una, obteniéndose la media y el error estándar como medida de dispersión de los datos.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. FRIJOL

1.1 Análisis bromatológico del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025

Con la finalidad de conocer las características de la variedad de prueba se realizó el análisis bromatológico (proteínas, carbohidratos, fibra, grasa, humedad, cenizas y sodio) en el frijol común (*P. vulgaris* L.) variedad Negro 8025 crudo y cocido (cocimiento tradicional reportado por Aparicio-Fernández *et al.*, 2005). Los resultados del análisis de las muestras se presentan en el cuadro 6.

El análisis estadístico muestra que los tratamientos influyen directamente sobre la concentración de diferentes compuestos, presentando diferencia significativa, entre éstos. Sin embargo, algunos parámetros como la humedad y cenizas se mantienen constantes entre la muestra de harina de frijol crudo y cocido.

Por consiguiente, el contenido de humedad de las muestras analizadas varió de 10% a 4.25% en la muestra liofilizada; estos resultados nos indican que el proceso cumple con su objetivo, que es eliminar el mayor contenido de agua presente en la muestra. Sin embargo, la humedad reportada en este trabajo para la muestra liofilizada (4.25%) difiere de la reportada por Costa de Oliveira *et al.* (2001), donde reportan una humedad para muestra liofilizada de frijol común de 1.5%, diferencia que se le puede atribuir a que se llevaron a cabo a diferentes altitudes a nivel del mar, tiempo de liofilización así como el tiempo de congelamiento previo a la muestra.

Cuadro 6. Análisis bromatológico de muestras de harina de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025

	FRIJOL CRUDO	FRIJOL COCIDO	FRIJOL COCIDO Y LIOFILIZADO
Proteína	20.99 ± 0.43 ^a	23.96 ± 0.38 ^b	23.15 ± 0.07 ^b
Carbohidrato	59.83 ± 0.27 ^a	52.80 ± 0.13 ^b	71.85 ± 0.22 ^c
Fibra Cruda	3.01 ± 0.06 ^a	6.31 ± 0.04 ^b	5.95 ± 2.4 ^c
Grasas	1.54 ± 0.06 ^a	1.59 ± 0.04 ^b	1.41 ± 0.01 ^a
Humedad	10.30 ± 0.17 ^a	10.06 ± 0.10 ^a	4.25 ± 0.07 ^b
Cenizas	4.32 ± 0.005 ^a	4.41 ± 0.05 ^a	4.14 ± 0.15 ^b
Sodio	0.005 ± 0.41 ^a	0.003 ± 0.0006 ^b	0.01 ± 0.0008 ^c

Los resultados representan la media de dos réplicas con tres repeticiones ± error estándar, y se expresan en porcentaje. Letras diferentes por renglón expresan diferencia significativa mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

En cuanto al contenido de proteína, las muestras liofilizada y cocida muestran valores similares (23.15% y 23.96%, respectivamente), mientras que en el frijol crudo fue de 20.99%. Estos valores se encuentran dentro de los intervalos ya reportados por otros autores, por ejemplo, Reyes-Moreno y Paredes-López (1993) reportan una concentración de 20.3 a 29%, De Almeida Costa *et al.* (2006) reporta un intervalo de 20.9 a 22.1% para proteína tanto para frijol crudo como cocido, y Costa de Oliveira *et al.* (2001) mencionan una concentración de 19.8% para proteína en la muestras de frijol liofilizada.

La cantidad de grasa presente en el frijol es importante y se relaciona con los complejos almidón-lípidos que pueden formar, fenómeno que disminuye el proceso de retrogradación y la formación de almidón resistente (AR). En este estudio se encontraron valores de 1.59 y 1.41% para las muestras cocida y liofilizada, respectivamente. Diversos autores reportan una concentración de 2.09 a 2.21% (De Almeida Costa *et al.*, 2006). Mientras que Costa de Oliveira *et al.* (2001) reportan una concentración de 2.5% para muestras liofilizadas.

El porcentaje de carbohidratos muestra un incremento de la muestra de frijol crudo (59.83%) y cocido (52.8%) a 71.85% en la muestra de frijol liofilizado. Éste resultado es mayor al reportado por Costa de Oliveira *et al.* (2001) (69.2%) para los carbohidratos de una muestra de frijol liofilizado. Sin embargo, este incremento (frijol crudo a frijol liofilizado) en el valor de los carbohidratos ya ha sido reportado por varios autores, entre ellos Ratnayake *et al.*, (2001), Osório-Díaz *et al.*, (2003) y Tharanathan y Mahadevamma, (2003), quienes atribuyen al proceso térmico el incremento en los valores de almidón resistente generado por la amilasa retrógrada. Por otra parte, la molienda de los frijoles antes de secarse o deshidratarse puede incrementar la exposición física de la amilasa y la amilopectina para interactuar con otros constituyentes y de esta manera incrementar el contenido de los carbohidratos (Preston, 1998; Osorio-Díaz *et al.*, 2003).

Por último, en lo que se refiere a la fibra, observamos que el valor encontrado de 5.95% en la muestra liofilizada se sitúa dentro de los valores reportados por otros autores. Por ejemplo, Costa de Oliveira *et al.* (2001) reportan un valor de 5.7% y De Almeida Costa *et al.* (2006) reportan 6.26% para muestras liofilizadas de frijol.

1.2 Contenido de polisacáridos y oligosacáridos totales presentes en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025

El frijol contiene una gran cantidad de compuestos entre los que destacan los carbohidratos, representando del 55 al 65% del peso seco del grano y que de acuerdo con diversos estudios, aportan beneficios hacia la salud, principalmente como preventivos de enfermedades crónico degenerativas (Hunges *et al.*, 1997; Hangen y Benkini, 2002). En el cuadro 7, se muestra el rendimiento de polisacáridos y oligosacáridos totales de frijol después del tratamiento térmico.

Cabe destacar que los resultados obtenidos en el presente estudio representan el primer reporte en la literatura acerca del rendimiento de los polisacáridos presentes en el frijol variedad Negro 8025.

Los oligosacáridos se cuantificaron por interpolación en una curva de estándar de rafinosa (Figura 49, Anexos). El objetivo de extraer y cuantificar los oligosacáridos es debió a que diversos autores hacen referencia que éstos compuestos no sufren una degradación en el tracto gastrointestinal, por lo cual llegan intactos al colon donde pueden ser fermentados por la microflora colónica, originándose ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como: el acético, propiónico y butírico, entre otros (Cummins, 1984; Mateu de Antonio, 2004; Kles y Chang, 2006). Los AGCC se ha relacionado con la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, entre ellas el cáncer de colon (Bravo *et al.*, 2000).

En el cuadro 7, se muestra la concentración de oligosacáridos totales en el extracto de polisacáridos obtenido a partir de frijol común cocido variedad Negro 8025

Del frijol y extracto de polisacáridos se obtuvieron 6.8 y 10 mg eq de rafinosa, respectivamente, diferencia considerable del contenido de oligosacáridos que han informado otros autores, por ejemplo Granito *et al.* (2001), reportan una concentración de 17 mg por gramo de muestra seca para una variedad de frijol negro; mientras que la concentración obtenida para el frijol cocido es ligeramente superior a lo reportado por Guillon y Champ (2002), quienes informan un intervalo de 2.6 a 6.6 mg/g muestra seca para frijol común. Las diferencias pueden atribuirse a diversos factores, entre ellos el origen del frijol y el método de extracción.

Cuadro 7. Rendimiento de polisacáridos totales y contenido de oligosacáridos en el extracto de polisacáridos (EP) de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Negro 8025.

	POLISACÁRIDOS (%)	OLIGOSACÁRIDOS (mg equivalentes de Rafinosa/g mtra)
FRIJOL	57.5 ± 0.05	6.8 ± 0.05
EP		10.0 ± 0.48

EP = Extracto de polisacáridos

Cada valor representa la media de tres réplicas con tres repeticiones ± error estándar.

1.3 Cuantificación de fibra total

El porcentaje obtenido de fibra dietética total para el frijol en estudio, así como los porcentajes de fibra soluble e insoluble, se muestran en el cuadro 8.

El incremento en la fracción soluble de la fibra dietaria total de frijol crudo a cocido fue de 1.8 veces. Estos resultados coinciden con los reportados por Granito *et al.* (2001) para frijol negro con tratamiento térmico proveniente de Venezuela.

Por otra parte, la fracción insoluble también coincide con lo informado por Alfonso-González (2000), quien reporta una concentración de 20% para esta fracción. Este punto es de gran interés debido a que la fracción insoluble de fibra dietaria contiene compuestos como el almidón resistente y los oligosacáridos que son indigeribles por las enzimas del tracto digestivo. A estos compuestos en conjunto se les han atribuido beneficios hacia la salud por servir como sustrato a las bacterias colónicas y de esa forma generar AGCC. Por otra parte, los datos mostrados en este trabajo se encuentran dentro del intervalo de concentración de 19.9 – 22.6%, reportado por De Almeida Costa *et al.* (2006) para esta misma fracción.

Estos resultados sugieren que el frijol común de la variedad Negro 8025 es una buena alternativa como fuente de fibra.

1.4 Cuantificación de almidón resistente (AR)

Otro de los componentes de la fracción insoluble de los polisacáridos presentes en el frijol común (*P vulgaris* L.) es el almidón resistente (AR) que se define como el almidón y productos de la degradación del almidón no absorbidos en el intestino delgado (Asp, 1996). Este componente adquiere relevancia por considerarse uno de los sustratos principales para la producción de AGCC por las bacterias colónicas (Osorio-Díaz *et al.*, 2005). Las leguminosas contienen cantidades considerables de almidón resistente principalmente tipo 1 (AR1) y tipo 3 (AR2) (Tovar *et al.*, 1992; Noah *et al.*, 1998).

Cuadro 8. Proporción de fibra dietética total en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad Negro 8025

NEGRO 8025	FIBRA DIETÉTICA TOTAL (%)		
	FI	FS	FT
Crudo	25.1 ± 0.03 ^a	3.3 ± 0.29 ^a	28.4 ± 0.31 ^a
Cocido	20.0 ± 0.03 ^b	6.0 ± 0.01 ^b	26.0 ± 0.04 ^b

Fibra Insoluble (FI), Fibra Soluble (FS) y Fibra Total (FT). Cada valor representa la media de 3 réplicas con tres repeticiones ± error estándar. Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa con $\alpha=0.05$ prueba de Tukey.

Los resultados obtenidos en este estudio con respecto al almidón resistente (Cuadro 9) en frijol crudo y cocido (33 y 30%, respectivamente) no presentan diferencia estadística; por efecto del tratamiento. Estos porcentajes son muy similares a lo reportado por otros autores como por ejemplo Shiga *et al.* (2003), quienes reportan un intervalo de 33 a 35%, mismo intervalo que es reportado por Guillon y Champ (2002) tanto para muestras crudas como cocidas. Otros autores como Rehman *et al.* (2004) reportan un 30.9% para una variedad negra de frijol cocido. Osorio-Díaz *et al.* (2003) extrajeron y cuantificaron almidón resistente utilizando también el método de Saura-Calixto *et al.* (1993), reportando una concentración de 30.2%, muy semejante a los datos obtenidos en este trabajo.

El contenido de AR no fue estadísticamente diferente entre frijol crudo y cocido. En el extracto de polisacáridos, el contenido de AR fue de 39.32%. El incremento en el contenido de AR presentado en el extracto de polisacáridos puede ser atribuido a un efecto de retrogradación, mismo que se ha sido observado por autores como Osorio Díaz *et al.* (2003), quienes informaron que niveles de almidón resistente en una variedad negra incrementan por el tratamiento térmico. Otros autores como Guillon y Champ (2002), han observado un aumento en la concentración de AR al incrementar los procesos de cocción ya sea en tiempo o bien al proceso de cocer-enfriar-rehidratar. Estos cambios generan redes de cristalización que dan por consiguiente un aumento en la cantidad de AR total lo cual se ha comprobado por difracción de rayos X. Este efecto también es reportado por Rehman *et al.* (2001) para procesos de sancochado, con tiempos largos de cocción y cocción a presión del frijol común rojo y blanco de la variedad Kidney.

Cuadro 9. Contenido de almidón resistente total en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad Negro 8025

ALMIDÓN RESISTENTE	
Negro 8025	(%)
Frijol Crudo	33.0 ± 0.01^a
Frijol Cocido	30.8 ± 0.02^a
EP	39.3 ± 0.15^b

EP = Extracto de polisacáridos

Cada valor representa la media de 3 réplicas con tres repeticiones ± error estándar. Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa con $\alpha=0.05$ prueba de Tukey.

1.5 Cuantificación de compuestos fenólicos

1.5.1 Taninos condensados

Dado la pigmentación que presentó el extracto de polisacáridos se determinó el contenido de taninos condensados (TC) en dicho extracto, en frijol crudo y cocido, así como en un extracto metanólico de la testa de frijol crudo (Aparicio-Fernández *et al.*, 2005), en microplaca de 96 pozos (Cuadro 10), extrapolando los resultados a una curva de (+)-catequina (Figura 50 de Anexos). De acuerdo al porcentaje de recuperación se logró la validación del método en microplaca.

Los datos indican una disminución en el contenido de taninos condensados una vez que el frijol común se ha sometido a cocimiento. La disminución puede atribuirse al acopleamiento entre taninos y proteínas y/o carbohidratos. Posiblemente debido a los diversos procesos de obtención ya que primero se coció el frijol, después se llevó a cabo la extracción de polisacáridos y de éstos a su vez se extrajeron los taninos, sin embargo, las muestras sin enriquecer no muestran diferencia estadística entre ellas, a excepción del extracto metabólico, mientras que en las muestras enriquecidas con (+)-catequina, sí hay diferencia estadística.

Guzmán-Maldonado *et al.* (1996) informan una concentración de 26.5 mg eq. (+)-catequina por gramo de frijol entero en la variedad Feb174 cultivada en Aguascalientes, cantidad ligeramente mayor a la reportada por nosotros para la harina de frijol crudo de la variedad Negro 8025 (21.04 ± 1.89 mg eq (+)-catequina. Por otra parte, Manzo-Bonilla (2001) reporta una concentración de taninos condensados de 13.76 ± 1.16 mg eq (+)-catequina por gramo de muestra en el frijol entero de la variedad Negro Jamapa; mientras que Oomah *et al.* (2005) informan una concentración de 3.38 mg eq (+)-catequina para una variedad negra de frijol. Las diferencias se pueden atribuir a las condiciones climáticas, al tipo de suelo donde se cultivaron y al tipo que a pesar de ser negro, la variedad es diferente. Hasta donde tenemos conocimiento nuestros datos serían los primeros que informan la concentración de taninos condensados en un extracto de polisacáridos.

Cuadro 10 Cuantificación y validación de fenoles totales en diferentes extractos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025

TANINOS CONDENSADOS			
	SIN ENRIQUECER	ENRIQUECIDO	RECUPERACIÓN (%)
Frijol Crudo ¹	21.04 ± 1.89 ^b	48.18 ± 2.51 ^b	80 ^c
Frijol Cocido ²	15.15 ± 1.53 ^c	42.78 ± 1.31 ^c	79 ^d
EP ³	9.11 ± 0.27 ^d	14.43 ± 2.32 ^d	80.4 ^b
Extracto Metanólico ⁴	858.25 ± 37.63 ^a	887.82 ± 4.89 ^a	94.79 ^a

EP = Extracto de polisacáridos., Extracto metanólico de cascarilla de frijol negro Jamapa crudo
 Los valores son expresados como mg eq (+)-catequina/ g mtra
 Las muestras fueron enriquecidas con: ¹ 39.18, ² 39.01, ³ 8.84, ⁴ 78.37 mg eq de (+)-catequina. Cada valor representa la media de cuatro réplicas con tres repeticiones ± error estándar. Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa con $\alpha=0.05$ prueba de Tukey.

1.5.2 Flavonoides totales

Los flavonoides totales también se cuantificaron utilizando la metodología descrita por Hairi *et al.* (1991) y modificaciones realizadas por Oomah *et al.* (2005) en su implementación en microplaca, utilizando una curva estandarizada de rutina (Figura 51 de Anexos). El cuadro 11, se muestra la concentración y validación de flavonoides. No hubo diferencia estadística entre las muestras. Sin embargo, los flavonoides totales obtenidos para harina de frijol crudo son mayores a los reportados por Oomah *et al.* (2005) para una variedad negra. Diferencia que también puede atribuirse al tipo de cultivo (variedad), condiciones ambientales, así como al tiempo de almacenamiento.

Cuadro 11. Cuantificación y validación del método de flavonoides totales en diferentes muestras de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025

FLAVONOIDES TOTALES			
	SIN ENRIQUECER	ENRIQUECIDO	RECUPERACIÓN (%)
*Harina Frijol Crudo	1.9 ± 0.5 ^a	35.4 ± 1.6 ^a	94.0 ^a
*Harina Frijol Cocidoa	1.8 ± 0.1 ^a	35.4 ± 1.7 ^a	94.1 ^a
Extractos de Polisacáridos*	1.6 ± 0.4 ^a	34.6 ± 1.2 ^a	92.6 ^a

Los valores expresados como mg eq de rutina/ g de mtra

* Las muestras fueron enriquecidas con 35.8 mg eq de rutina en cada uno de los casos. Cada valor representa la media de cuadro réplicas con tres repeticiones ± error estándar. Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa con $\alpha=0.05$ por la prueba de Tukey.

2. Inducción de fosas crípticas aberrantes (FCA)

2.1 Estandarización de la inducción de fosas crípticas aberrantes (FCA) por azoximetano (AOM) en ratas macho Sprague Dawley

Con la finalidad de emplear al butirato de sodio (NaBu) como control de anticarcinogénesis se evaluó el efecto de éste sobre la inducción de FCA a 2.4 y 7.2 mM de acuerdo a lo informado por Li y Elsasser (2005). Dosis aproximada producida por los compuestos indigeribles del frijol en base al promedio de lo reportado para el consumo *per capita* de la zona rural por Del Razo *et al.* (2002) (234 Kg por año) y el Consejo Mexicano del Frijol (2005) (146 Kg por año) considerándose un promedio de 190 Kg por año. El efecto del azoximetano (AOM) sobre la inducción de FCA y el efecto del NaBu, se muestran en el cuadro 12.

La inducción de FCA por el AOM administrado una vez a la semana durante dos semanas a una concentración de 15 mg/Kg de peso, fue eficaz por lo que se podría considerar un buen modelo para el estudio de los estadios tempranos del cáncer de colon. En este estudio se puede observar que la formación de FCA fue tanto en la zona proximal como en la distal. La zona exacta de localización de formación de las FCA ha generado controversia como se ha observado en estudios reportados por Ghirardi *et al.* (1999) y Hata *et al.* (2004), quienes han informado que existe una mayor formación de FCA en la bolsa cecal y zona proximal del colon, mientras que autores como McLellan y Bird (1988), y Verghese *et al.* (2002) informan que las FCA son predominantes del segmento distal del colon. Por otra parte, Alrawi *et al.* (2006) y Humphries y Wright (2008) mencionan que las FCA se localizan a todo lo largo del colon y que el incremento en su manifestación se debe principalmente a cambios en el pH, alteración de la población bacteriana del colon, acumulación de alteraciones bioquímicas y mutaciones, mismas alteraciones que se han reportado al administrarse AOM a una concentración de 10 a 20 mg/Kg de peso. Debido a la controversia de la localización de las FCA, se decidió analizar ambas zonas del colon. Por otra parte, se observó que a administración de NaBu (compuesto con características anticarcinogénicas) en presencia del AOM a la concentración de 2.4 mM disminuye el número de FCA en ambas zonas colónicas (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis de la inducción de fosas crípticas aberrantes (FCA) con azoximetano (AOM) y el efecto del butirato de sodio (NaBu) sobre estas.

GRUPO	<i>n</i>	FCA			
		AZUL DE METILENO		HISTOLÓGICA	
		PROXIMAL	DISTAL	PROXIMAL	DISTAL
Control negativo	2	---	---	---	---
AOM	4	+++	+	+++	---
NaBu 2.4 + AOM	3	+	+	+	---
NaBu 7.2 + AOM	3	+	+	++	---

(-) Control negativo (Solución salina donde se disolvió el carcinógeno), Azoximetano (AOM), Butirato de Sodio (NaBu)

--- Fosas crípticas normales

+ Muy poca presencia de Fosas Crípticas Aberrantes (FCA)

++ Presencia de FCA (lesión celular presente sin deformidad)

+++ Gran cantidad de FCA (daño celular muy manifestado con abultamiento y deformidad de núcleo)

El consumo de alimento y agua, así como el peso corporal, se evaluó y los datos se muestran en los cuadros 13 y 14, respectivamente. El consumo de alimento varió dependiendo del tratamiento y como era de esperarse en el grupo de animales del control de carcinogénesis (AOM) fue el de menor consumo, seguido por el tratamiento de NaBu + AOM a la mayor concentración de NaBu (7.2 mM), atribuyendo este menor consumo al proceso toxicológico provocado por el AOM. Por otra parte, el consumo de agua se manifiesta a la inversa, es decir el tratamiento de AOM es aquel que consume mayor cantidad de agua, comportamiento que se podría explicar ya que existen procesos de detoxificación generados por el mismo organismo; dentro de estos procesos se lleva a cabo la eliminación de toxinas generadas por el individuo, así como aquellas sustancias que son introducidas al organismo por diferentes vías (alimentos, aire, agua, etc.) son eliminadas por el sudor, las heces, la orina e incluso en casos extremos el vómito. Cada uno de estos procesos de eliminación principalmente el sudor, la orina y el vómito provoca una descompensación electrolítica en el organismo, generando mayor requerimiento de agua para compensar estas necesidades.

Cuadro 13. Consumo de agua y alimento de los grupos experimentales de butirato de sodio (NaBu) inducidos químicamente con azoximetano (AOM).

GRUPO	<i>n</i>	AOM	ADMINISTRACIÓN	¹ CONSUMO DE ALIMENTO g/día	¹ CONSUMO DE AGUA mL/día
Control	2	-	Solución salina	30.51 ± 0.9 ^{ac}	38.20 ± 2.0 ^d
AOM	4	+	-----	24.17 ± 0.3 ^b	67.20 ± 0.9 ^a
NaBu 2.4 + AOM	3	+	NaBu 2.4 mM	27.38 ± 0.7 ^c	25.19 ± 0.7 ^b
NaBu 7.2 + AOM	3	+	NaBu 7.2 mM	25.38 ± 0.4 ^{bc}	22.31 ± 0.9 ^b

Butirato de Sodio (NaBu) y Azoximetano (AOM). ¹Delta representativa del promedio de cada grupo ± error estándar. Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Análisis con $\alpha=0.05$ por la prueba de Tukey.

Cuadro 14. Ganancia de peso en los grupos experimentales de butirato de sodio (NaBu) inducidos químicamente con azoximetano (AOM).

GRUPO	<i>n</i>	AOM	ADMINISTRACIÓN	GANANCIA DE PESO g/5 semanas
Control	2	-	Solución salina	210.96 ± 10.45 ^b
AOM	4	+	-----	192.92 ± 24.12 ^b
NaBu 2.4 + AOM	3	+	NaBu 2.4 mM	175.15 ± 2.19 ^b
NaBu 7.2 + AOM	3	+	NaBu 7.2 mM	132.3 ± 19.57 ^a

Butirato de sodio (NaBu) y Azoximetano (AOM). La ganancia de peso se representa por la diferencia en gramos ± desviación estándar. Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Análisis estadístico con $\alpha=0.05$ prueba de Tukey.

Los datos mostrados en el cuadro 14 indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos en relación a la ganancia de peso a excepción del grupo con administración de Butirato de Sodio (NaBu) (7.2 mM) y presencia del carcinógeno. Esta disminución en el peso probablemente se deba a que NaBu tiene un olor y sabor característicos que genera repulsión por el alimento, fenómeno que también fue reportado por Deschner *et al.* (1990).

3. Butirato de sodio (NaBu)

3.1 Curva dosis-respuesta de butirato de sodio (NaBu)

Debido a que los resultados de este estudio muestran que la mayor concentración de NaBu (7.2 mM) causó la formación de FCA y daño morfológico (datos no mostrados) similares a los presentados por el tratamiento con AOM se procedió a llevar a cabo una curva dosis respuesta de NaBu (1.2, 2.4, 4.8, 7.2 y 10 mM) y poder establecer la máxima concentración de este compuesto que no genere daño al tejido o inducción de FCA. Midiendo también el consumo de alimento y agua, así como la ganancia de peso (Cuadro 15 y 16, respectivamente).

En el consumo de alimento el contro negativo presentó diferencia estadística con respecto a todas las concentraciones NaBu y dicho efecto fue inversamente proporcional a la concentración de NaBu. Mientras que el consumo de agua no se vio afectado por el tratamiento.

Cuadro 15. Consumo de agua y alimento de los diferentes tratamientos de butirato de sodio (NaBu)

GRUPO	<i>n</i>	ADMINISTRACIÓN	¹ CONSUMO DE ALIMENTO g/día	¹ CONSUMO DE AGUA mL/día
Control	2	Solución salina	30.3 ± 1.37 ^a	24.7 ± 1.17 ^a
NaBu 1.2 mM	4	NaBu	21.3 ± 0.70 ^{bc}	23.8 ± 0.77 ^a
NaBu 2.4 mM	4	NaBu	22.6 ± 0.79 ^b	24.7 ± 0.67 ^a
NaBu 4.8 mM	4	NaBu	20.3 ± 0.52 ^{bc}	24.5 ± 0.98 ^a
NaBu 7.2 mM	4	NaBu	18.7 ± 0.54 ^c	21.9 ± 0.55 ^a
NaBu 10 mM	4	NaBu	18.5 ± 0.71 ^c	23.8 ± 0.77 ^a

Butirato de Sodio (NaBu) ¹Delta representativa del promedio de cada grupo ± error estándar. Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Todos los análisis con $\alpha=0.05$ por la prueba de Tukey

Cuadro 16. Ganancia de peso de las ratas con tratamiento de NaBu a diferentes concentraciones

GRUPO	<i>N</i>	ADMINISTRACIÓN	¹ GANANCIA DE PESO g/5 semanas
Control	2	Solución salina	205 ± 15.0 ^a
NaBu 1.2 mM	4	NaBu	200 ± 12.2 ^a
NaBu 2.4 mM	4	NaBu	200 ± 8.2 ^a
NaBu 4.8 mM	4	NaBu	202 ± 6.3 ^a
NaBu 7.2 mM	4	NaBu	187 ± 14.4 ^a
NaBu 10 mM	4	NaBu	190 ± 14.7 ^a

Butirato de Sodio (NaBu) ¹Delta representativa del promedio de cada grupo ± error estándar. Letras diferentes por columna indican diferencia estadística. Análisis estadístico con $\alpha=0.05$ por la prueba de Tukey

Los resultados indican que no existe diferencia estadística respecto a la ganancia de peso en los diferentes tratamientos, a pesar de que se aprecia una ligera disminución en el peso de los animales tratados con las dos concentraciones más altas de NaBu (7.2 y 10 mM respectivamente). Estos datos sugieren que el butirato de sodio no afecta el desarrollo normal de los animales de igual manera como lo menciona Lupton (2004) que indica que el butirato de sodio tiene un efecto preventivo en la carcinogénesis y que éste no afecta los procesos fisiológicos del animal. Ohkawara *et al.* (2005) informan que la administración de butirato no produce ninguna alteración en el crecimiento y ganancia de peso, así como, en las funciones motoras de los animales.

Se ha informado que el pH en heces fecales es una medida indirecta de la formación de AGCC. Por lo que se midió el pH en heces, contenido cecal y colónico (Cuadro 17). Los resultados indican que no existe diferencia estadística entre los diferentes tratamientos en cada tipo de muestra; éstos datos concuerdan con los datos reportados por Nakanishi *et al.* (2003), quienes reportan que los diferentes tratamientos: esporas de bacterias ácido lácticas y una dieta rica en fibra que asemeja las condiciones a las cuales sometimos a los animales por la cantidad de butirato administrada, no presentan diferencias estadísticas en el pH de las diferentes zonas (cecal, colónico y heces) entre los tratamientos. Por otra parte, el pH del tratamiento de 10 mM, fue el único que presentó diferencia estadística entre el pH del contenido colónico y el pH de heces.

Cuadro 17. Efecto del NaBu sobre el pH del contenido colónico, cecal y heces de ratas Sprague Dawley

GRUPO	<i>n</i>	pH		
		CONTENIDO CECAL	CONTENIDO COLÓNICO	HECES
Control	2	6.40 ± 0.09 ^{aA}	6.37 ± 0.14 ^{aA}	6.87 ± 0.14 ^{aA}
NaBu 1.2 mM	4	6.82 ± 0.19 ^{aA}	6.85 ± 0.25 ^{aA}	6.76 ± 0.23 ^{aA}
NaBu 2.4 mM	4	6.73 ± 0.12 ^{aA}	6.93 ± 0.17 ^{aA}	6.93 ± 0.11 ^{aA}
NaBu 4.8 mM	4	6.80 ± 0.05 ^{aA}	7.16 ± 0.21 ^{aA}	6.99 ± 0.21 ^{aA}
NaBu 7.2 mM	4	7.00 ± 0.19 ^{aA}	7.11 ± 0.06 ^{aA}	7.33 ± 0.15 ^{aA}
NaBu 10 mM	4	6.81 ± 0.03 ^{aAB}	6.42 ± 0.08 ^{aB}	7.22 ± 0.18 ^{aA}

Butirato de Sodio (NaBu) Los datos representan el promedio de tres mediciones independientes ± error estándar. Letras minúsculas diferentes por columna expresan diferencia significativa con $\alpha=0.05$ prueba de Tukey. Letras mayúsculas diferentes por renglón expresan diferencia significativa con $\alpha=0.05$ prueba de Tukey.

Los resultados histológicos indican diferencias morfológicas entre los tratamientos, mismas que se muestran en la figura 20.

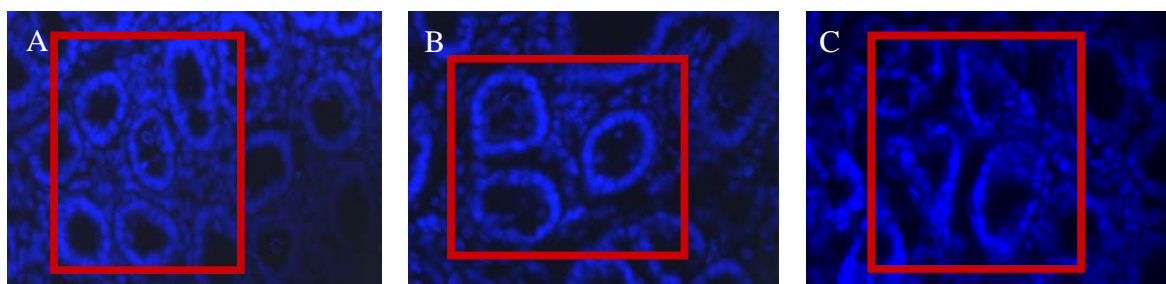


Figura 20. Cortes histológicos de la zona proximal de colon. En el recuadro se delimitan las fosas crípticas de cada uno de los grupos. A) Grupo control, B) Concentración de 1.2 mM de NaBu y C) Concentración de 10 mM de NaBu.

Visualización de las fosas crípticas de la porción colónica con diferentes tratamientos (Figura 20). En la sección A se puede observar las características morfológicas de una fosa críptica normal ya que esta corresponde a un control negativo, las fosas crípticas se caracterizan por tener una forma completamente delimitada, sin alteraciones en el núcleo o en la membrana celular, tienden a ser circulares con ligeras alteraciones ovoidales y no forman abultamientos en el lumen (Bird *et al.*, 1989). En el recuadro B, podemos observar que a la concentración de 1.2 mM de NaBu, no se induce alteración morfológica sobre las fosas crípticas de la zona colónica, ya que conservan su forma circular delimitada y no se aprecia daño a nivel nuclear. Sin embargo en el recuadro C, la forma de la cripta es irregular, con alteraciones en la membrana celular, el núcleo no se encuentra definido por lo que se podría considerar como una fosa críptica aberrante, ya que esta descripción forma parte de las características morfológicas que presentan las fosas crípticas aberrantes, además de que estas presentan abultamiento hacia el lumen de la cavidad colónica, múltiples núcleos dentro de una misma cripta, así como aperturas o ausencia de

pared celular (Bird *et al.*, 1989; Bird, 1995; Bird y Good, 2000; Papanikolaou *et al.*, 2000).

Apartir de estos resultados se eligió la concentración de 1.2 mM de NaBu, como control de anticarcinogénesis.

3.2 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en la administración de NaBu a diferentes concentraciones

En el cuadro 18, se presenta la producción de ácidos grasos de cadena corta durante la administración de NaBu a diferentes concentraciones, expresados como mM de ácido acético, propiónico y butírico, respectivamente por gramo de heces, estos datos se obtuvieron por interpolación a una curva de calibración para cada uno de los ácidos grasos (Figura 52 de Anexos).

El análisis estadístico indica una producción de ácido acético no estadísticamente diferente en las concentraciones (0, 1.2 mM, 10 mM) en las tres zonas estudiadas, con excepción de la porción cecal. En el ácido propiónico se muestra una clara diferencia estadística entre los grupos control y 10 mM en las porciones colónica y heces, no mostrando esta tendencia en el contenido cecal. Este mismo comportamiento se observó en el ácido butírico donde es superior la concentración de este ácido en el tratamiento de 10 mM con respecto al control en el contenido colónico y heces, no así en la porción cecal. Efecto posiblemente generado por las diferentes características de absorción e interacción bacteriana a lo largo del colon. Hasta el momento no se tienen estudios referentes a la producción de AGCC durante la administración de NaBu.

Cuadro 18. Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos por la administración de NaBu a diferentes concentraciones.

CONCENTRACIÓN ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA (AGCC) (mM /g de muestra)									
GRUPO	CECAL			COLÓNICO			HECES		
	Acético	Propiónico	Butírico	Acético	Propiónico	Butírico	Acético	Propiónico	Butírico
Control	31.2 ± 1.27 ^a	6.9 ± 0.17 ^a	6.6 ± 0.10 ^a	29.2 ± 0.51 ^a	5.7 ± 0.04 ^a	4.0 ± 0.01 ^a	30.2 ± 3.5 ^a	4.4 ± 0.63 ^a	3.9 ± 0.19 ^a
1.2 mM	24.9 ± 0.40 ^b	4.4 ± 0.02 ^b	4.4 ± 0.01 ^b	24.3 ± 0.99 ^a	4.2 ± 0.05 ^b	3.9 ± 0.02 ^a	23.2 ± 0.6 ^a	4.7 ± 0.11 ^a	3.7 ± 0.05 ^a
10 mM	28.5 ± 2.10 ^c	6.9 ± 0.13 ^a	4.8 ± 0.08 ^c	28.9 ± 2.1 ^a	6.9 ± 0.13 ^c	4.8 ± 0.08 ^b	32.7 ± 1.3 ^a	6.7 ± 0.26 ^b	4.8 ± 0.16 ^b

Valores expresados como mM/g de muestra

Cada valor representa la media de tres réplicas con tres repeticiones ± error estándar. Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa con $\alpha=0.05$ prueba de Tukey.

Ácido acético = $C_2H_4O_2$; ácido propiónico = $C_3H_6O_2$ y ácido butírico = $C_4H_8O_2$

4. Efecto del extracto de polisacáridos (EP) y frijol común variedad Negro 8025 sobre el estadio temprano de cáncer de colon

4.1 Consumo de agua y alimento

Se evaluaron los efectos de frijol cocido, el EP (ambos en base al consumo de frijol de una persona de 70 Kg de la zona rural (190 Kg anuales aproximadamente) y un compuesto anticancerígeno (NaBu 1.2 mM) sobre el estadio temprano de cáncer de colon medido como número de FCA. Se registró el consumo de agua, alimento y ganancia de peso semanalmente a todos los grupos de tratamientos. Además, se cuantificaron los AGCC de contenido cecal, colónico y heces.

En el cuadro 19, se muestra el consumo de alimento y agua, para los diferentes tratamientos.

Se observó que el grupo de EP presenta menor consumo de alimento con respecto al grupo control. Mientras que en el consumo de agua, el grupo control muestra diferencia significativa con todos los grupos a excepción del grupo de AOM. Sin embargo, cabe destacar que el grupo de AOM fue el que presentó mayor consumo tanto en alimento como en agua (228.1 g/día y 566.67 mL/día, respectivamente), lo que sugiere un mayor gasto de energía por parte del animal y por consiguiente un aumento en el requerimiento calórico por la presencia de sustancias o agentes potencialmente tóxicos en este caso AOM.

Cuadro 19. Consumo de agua y alimento de los diferentes tratamientos de frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu con y sin AOM

GRUPO	<i>n</i>	AOM	ADMINISTRACIÓN	¹ CONSUMO DE ALIMENTO g/día	¹ CONSUMO DE AGUA mL/día
Control	10	--	Solución salina	206.58 ± 29.54 ^{ab}	613.33 ± 6.66 ^a
Frijol	10	--	Frijol	146.66 ± 24.56 ^{ab}	490.0 ± 20.0 ^{bc}
EP	10	--	EP	107.0 ± 17.35 ^b	330.0 ± 11.54 ^{de}
NaBu	10	--	NaBu 1.2 mM	120.0 ± 30.43 ^{ab}	240.0 ± 10.0 ^e
AOM	10	++	-----	228.1 ± 26.12 ^a	566.67 ± 17.63 ^{ab}
Frijol + AOM	10	++	Frijol	124.66 ± 22.4 ^{ab}	450.0 ± 11.55 ^c
EP + AOM	10	++	EP	130.0 ± 20.81 ^{ab}	396.66 ± 52.38 ^{cd}
NaBu + AOM	10	++	NaBu 1.2 mM	130.23 ± 9.07 ^{ab}	380.0 ± 20.0 ^{cd}

Butirato de Sodio (NaBu), Azoximetano (AOM) y Extracto de Polisacáridos (EP). ¹Delta representativa del promedio de cada grupo ± error estándar. Letras diferentes por columna indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ prueba de Tukey.

4.2 Ganancia de peso

En el cuadro 20, se observa la ganancia de peso de los diferentes tratamientos evaluados. El grupo de AOM es el que obtuvo mayor ganancia de peso (208 ± 7.42 g/5 semana), seguido del grupo control (194 ± 6.53 g/5 semana), no presentando diferencia estadística entre ellos. Este fenómeno ha sido reportado por autores como Verghese *et al.* (2002) quienes no encontraron diferencia estadística entre el grupo control y el tratamiento de AOM a una dosis similar (16 mg/Kg de peso) a la utilizada en este trabajo. Mientras que, el grupo que presenta menor ganancia de peso al término del experimento fue el del tratamiento con frijol + AOM (145 ± 3.75 g/5 semana). Esta disminución en el peso puede deberse a la consistencia del frijol al ser administrado ya que este tratamiento (frijol + AOM) no presenta diferencia estadística con respecto al tratamiento de frijol (166 ± 6.18 g/5 semana); sin embargo ambos tratamientos (frijol + AOM y frijol) son estadísticamente diferentes del grupo control. Estos datos concuerdan con lo reportado por Hangen y Bennink (2002) quienes informan que al incorporar un alto porcentaje (75%) de frijol Negro y/o Blanco a la dieta, las ratas ganan menos peso que puede ser atribuido a menor consumo de alimento. Celleno *et al.* (2007), sugieren que el frijol puede disminuir el peso corporal de un individuo al ser administrado en la dieta como suplemento de la misma por inhibición de la actividad de la enzima digestiva α -amilasa, lo que da como resultado una menor disponibilidad de los carbohidratos y por consiguiente una menor adsorción, así como una mayor saciedad.

4.3 pH

Se ha informado que los compuestos insolubles al ser fermentados por las bacterias colónicas generan acidificación del medio, por lo que el pH es una medida indirecta de la producción de AGCC (Kulkarni y Reddy, 1994). En el cuadro 21, se muestra el efecto de los diferentes tratamientos sobre el pH de heces, contenido colónico y cecal.

Cuadro 20. Ganancia de peso de las ratas con tratamiento de frijol, extracto de polisacáridos (EP), NaBu con y sin azoximetano (AOM)

GRUPO	<i>n</i>	AOM	ADMINISTRACIÓN	¹ GANANCIA DE PESO g/5 semana
Control	10	--	Solución salina	194.0 ± 6.53 ^{ab}
Frijol	10	--	Frijol	166.0 ± 6.18 ^{cd}
EP	10	--	EP	173.0 ± 8.69 ^{bc}
NaBu	10	--	NaBu 1.2 mM	174.0 ± 4.54 ^{bc}
AOM	10	++	-----	208.0 ± 7.42 ^a
Frijol + AOM	10	++	Frijol	145.0 ± 3.75 ^d
EP + AOM	10	++	EP	162.0 ± 4.16 ^{cd}
NaBu + AOM	10	++	NaBu 1.2 mM	171.0 ± 6.90 ^{bcd}

Extracto de Polisacáridos (EP), Butirato de Sodio (NaBu) y Azoximetano (AOM) Letras diferentes indican diferencia estadística. ¹Delta representativa del promedio de cada grupo ± error estándar. Análisis con $\alpha=0.05$ prueba de Tukey.

Cuadro 21. Efecto del frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu sobre el pH de contenido cecal, colónico y heces de ratas Sprague Dawley.

GRUPO	<i>n</i>	pH		
		CONTENIDO CECAL	CONTENIDO COLONICO	HECES
Control	10	6.60 ± 0.003 ^d	6.50 ± 0.005 ^b	8.92 ± 0.01 ^b
Frijol	10	6.59 ± 0.003 ^d	6.87 ± 0.005 ^a	9.26 ± 0.008 ^a
EP	10	6.64 ± 0.03 ^{cd}	6.51 ± 0.003 ^{bc}	8.89 ± 0.02 ^b
NaBu 1.2 mM	10	6.99 ± 0.04 ^a	6.42 ± 0.03 ^d	6.46 ± 0.02 ^f
AOM	10	6.85 ± 0.008 ^{ab}	6.67 ± 0.005 ^{cd}	8.33 ± 0.01 ^d
Frijol + AOM	10	5.61 ± 0.09 ^e	6.60 ± 0.05 ^{bc}	8.51 ± 0.008 ^c
EP + AOM	10	6.80 ± 0.02 ^{abc}	6.61 ± 0.003 ^{bc}	7.57 ± 0.01 ^e
NaBu + AOM	10	6.73 ± 0.01 ^{bcd}	5.95 ± 0.05 ^e	8.31 ± 0.005 ^d

Extracto de Polisacáridos (EP), Butirato de Sodio (NaBu) y Azoximetano (AOM). Los datos representan el promedio de tres réplicas ± error estándar. Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa con $\alpha=0.05$ prueba de Tukey.

Los resultados indican que el pH del contenido cecal, colónico y heces varía con respecto a lo descrito por Smith (1965), quien reportó un pH de 6.8, 6.6 y 6.9 para el contenido cecal, colónico y de heces, respectivamente. Otros investigadores informan que el pH en modelos *in vivo* puede variar en las diversas zonas del colon de forma dependiente de la producción de AGCC (Jacobs y Lupton, 1982; Newmark y Lupton, 1990; Lupton, 2004). El pH en heces para el grupo de frijol fue el que presentó un valor más alto (9.26) con respecto a los otros grupos, mientras que el menor valor lo presenta el grupo de NaBu (6.42). El valor de pH en las heces del grupo control difiere de lo encontrado por otros autores como por ejemplo Le-Leu *et al.* (2005), quienes reportan un valor de 7.5 para heces, mientras que el valor en esta investigación fue más alto (8.92).

El pH del contenido cecal presenta diferencia estadística para el grupo de frijol + AOM con respecto a los otros tratamientos. Los valores de pH para los grupos de frijol y EP, se encuentran dentro del intervalo reportado por Le-Leu *et al.* (2003) para una dieta adicionada con almidón resistente de maíz al 10%. Lo que sugiere que en los resultados obtenidos en este trabajo para esta zona, el AR pudiera contribuir en las modificaciones del pH, ya que el frijol y el EP presentaron concentraciones de 30.8 ± 0.02 y $39.3 \pm 0.15\%$ de AR, respectivamente. El grupo de frijol es estadísticamente diferente a los otros grupos, presentando mayor valor de pH (6.87) mientras que el grupo de NaBu + AOM es el grupo que tiene el menor valor de pH (5.95). Los valores obtenidos para el grupo de frijol y polisacáridos del frijol difieren de los valores de pH reportados para almidón resistente de maíz (6.4) para esta zona (Nakanishi *et al.*, 2003). Hasta el momento no se tienen informes sobre el efecto del frijol y el EP en el pH de las diferentes zonas del colon, por lo que este trabajo sería de los pioneros al respecto.

4.4 Histología de las fosas crípticas aberrantes (FCA) obtenidas de los tratamientos con frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu

Para evaluar el efecto de frijol, EP y NaBu sobre las FCA inducidas químicamente con AOM en la región colónica, se utilizaron técnicas histológicas

como lo es la tinción con azul de metileno que proporcionan parámetros macroscópicos de las posibles lesiones en las diferentes regiones del colon (Bird, 1987). Una vez disectado el colon, se dividió en dos porciones, la porción proximal situada cerca del ciego y la porción distal que incluye el ano. Tanto la zona proximal como la distal se tiñeron con azul de metileno. Los tejidos fueron visualizados al microscopio invertido y se cuantificó el número de lesiones o criptas aberrantes localizados en la región evaluada (Figura 21).

Como se ha mencionado con anterioridad, existe controversia con respecto a la región colónica donde existe mayor predominancia a la formación de FCA, por ejemplo Guidardi *et al.* (1999) aseguran mayor formación de FCA en la zona proximal, mientras que Rodríguez *et al.* (2002) en la región distal. En el presente estudio se puede apreciar mayor número de FCA inducidas con AOM (Control positivo) en la región distal (35 FCA/región colónica) que en la porción proximal (22 FCA/región colónica), sin embargo no existe diferencia estadística entre ambas regiones. Resultados que concuerdan con los de Rodríguez *et al.* (2002) quienes informan, un aumento en el número de FCA en la porción distal con respecto a la proximal en tiempos cortos (4-5 semanas) sin considerarse estadísticamente significativo, diferencia que va en aumento a tiempos largos (30 semanas) de exposición del carcinógeno.

Los resultados de la porción colónica proximal indican que existe un mayor número de fosas crípticas aberrantes en el tratamiento de frijol + AOM (88 criptas/región colónica) presentando diferencia estadística con el resto de los tratamientos, aumento generado posiblemente por la diversidad de compuestos presentes en el frijol como por ejemplo el ácido fítico y componentes de la fibra que se han relacionado con proliferación celular, y que puede generar un efecto sinérgico con el carcinógeno (AOM) induciendo de esta manera un aumento de FCA. Sin embargo también se ha reportado que la regeneración de esta zona colónica (proximal) está relacionada con una alta proliferación y por consiguiente las

FCA generadas en la zona proximal tienen un bajo porcentaje (<25%) de desarrollo a cáncer (Wong y Gibson, 2003; Zhang *et al.*, 2005),

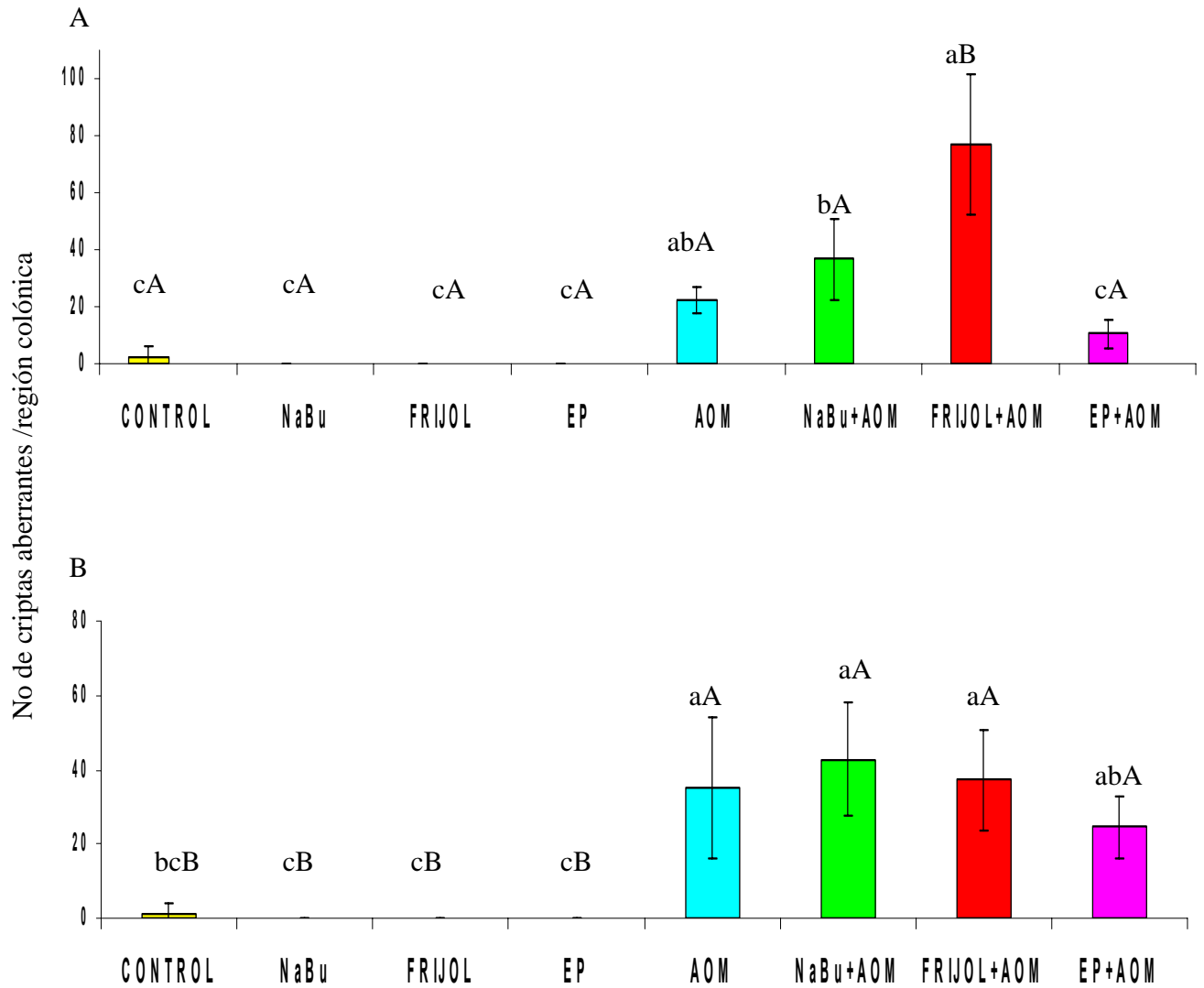


Figura 21. Número de fosas crípticas aberrantes (FCA) en las diferentes zonas colónicas. **A.** Zona proximal y **B.** Zona distal, con azul de metileno.

AOM = Azoximetano, EP = Extracto de polisacáridos, NaBu = Butirato de Sodio. Cada valor representa la media de 5 muestras de colon independientes \pm Desviación estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ prueba de Tukey. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ prueba de Dunnett's

También es posible apreciar que los tratamientos de frijol cocido, EP y NaBu no presentan FCA. El tratamiento de EP + AOM disminuye el número de FCA (10 criptas/ región evaluada) en comparación con el control positivo (AOM) (22 criptas/ región evaluada). Efecto similar al reportado por Verghese *et al.* (2002), quienes administraron inulina (oligosacárido no digerible que estimula selectivamente el crecimiento de bifidobacterias) a diferentes concentraciones (2.5%, 5% y 10%) inhibiendo en mayor proporción el número de FCA en la zona proximal (29.8, 19.3 y 14.3 FCA, respectivamente) con respecto al control (43.8 FCA) que la zona distal.

En la porción distal se aprecia la misma tendencia para los tratamientos de frijol cocido, EP y NaBu que en la zona proximal. Mientras, los tratamientos de EP + AOM, NaBu + AOM, frijol + AOM y AOM no presentan diferencia estadística entre ellos. Sin embargo, sí existe diferencia estadística entre el control positivo y el control negativo (35 y 1.2 criptas/ región evaluada).

La presencia de fosas crípticas aberrantes ha generado controversia en varios estudios si se considera como un marcador temprano del cáncer de colon (Kinzler y Vogelstein, 1996; Duval y Hamelin, 2002, Luo *et al.*, 2006), asumiendo que esta lesión puede proliferar a cáncer de colon. Sin embargo, también existen investigadores que indican que si bien existe un gran porcentaje de fosas crípticas aberrantes que evolucionan a neoplasia, también existen fosas crípticas aberrantes que se pueden considerar como benignas ya que éstas son generadas por diversos factores de la dieta que inducen proliferación celular en la cripta pero que no llegan a inducir una neoplasia (Park *et al.*, 1997; McCullough *et al.*, 1998; Wong y Gibson, 2003). Cabe señalar que en esta parte, los estudios solo se enfocan a nivel morfológico sin tomar en cuenta el daño del núcleo o la presencia de mutaciones que puedan llevar a generar la presencia de cáncer de colon

Ejemplos representativos de la visualización de las fosas crípticas aberrantes con azul de metileno se muestran en la figura 22. Es posible apreciar que las fosas crípticas normales no presentan cúmulos celulares, mientras la exposición al agente

carcinogénico (AOM) induce la formación de cúmulos celulares de mayor proporción en la zona proximal que en la zona distal, mismos que son fácilmente localizados y visualizados al microscopio.



Figura 22. Visualización de fosas crípticas aberrantes (FCA) con azul de metileno. **A.** Fosa críptica normal del grupo control, **B.** Fosa críptica aberrante de la zona proximal inducida con AOM y **C.** Fosa críptica aberrante de la zona distal inducida con AOM

La figura 23 muestra la evaluación realizada a la zona proximal con la tinción de Dapi, donde se puede apreciar que tanto el frijol como el EP no presentan efecto protector sobre esta zona. El extracto de frijol y EP en presencia de AOM (3 y 2.2 FCA totales respectivamente) no presenta diferencia estadística con respecto al número de FCA que presenta el control positivo (1.8 FCA totales). El control negativo presenta un menor número de FCA con respecto del grupo AOM (1.2 y 1.8 FCA totales, respectivamente). Los diferentes grupos no presentan diferencia estadística entre ellos con excepción del grupo control.

La presencia de FCA en los tratamientos de frijol y EP pudiera deberse a la presencia de diversos compuestos propios de la fibra ya que de acuerdo con un estudio realizado por Wong y Gibson (2003), quienes sugieren que diferentes componentes de la fibra al ser incorporados a la dieta inducen un aumento en la hiperproliferación celular dando por consiguiente mayor número de fosas crípticas

que pudieran asemejar fosas crípticas aberrantes sin llegar éstas a desarrollar cáncer de colon.

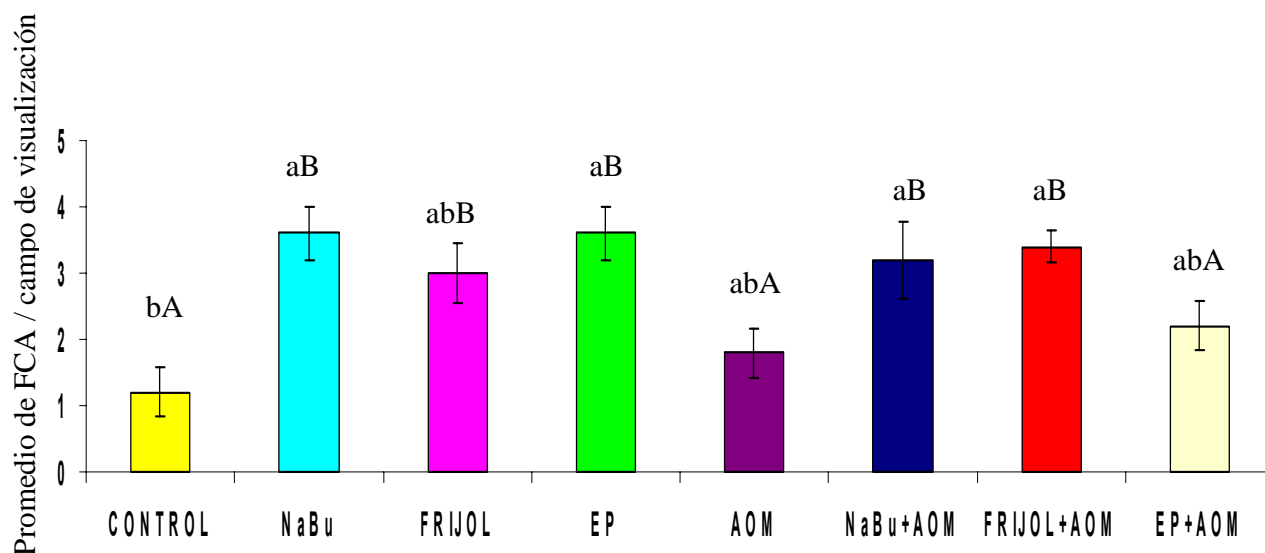


Figura 23. Efecto del frijol común (*P vulgaris* L.) cocido variedad Negro 8025, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu sobre fosas crípticas aberrantes (FCA) inducidas químicamente con azoximetano (AOM) en la zona proximal de colon.

AOM = Azoximetano, EP = Extracto de polisacáridos, NaBu = Butirato de Sodio. Cada valor representa la media de 5 muestras de colon independientes con 20 cortes cada uno \pm Desviación estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ prueba de Tukey. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ prueba de Dunnett's

Mientras, en la región distal (Figura 24), el control positivo presenta mayor número de FCA (4.2 FCA totales) presentando diferencia estadística con respecto al control negativo (0.6 FCA totales), EP (1.2 FCA totales), frijol (1.2 FCA totales) y NaBu en presencia y ausencia de AOM (1.0 y 1.2 FCA totales). Sugiriendo que el frijol y EP en presencia de AOM disminuyen el número de FCA en esta porción colónica, cuantificados mediante este método de tinción. Estos resultados concuerdan con algunos estudios donde se sugiere que la mayor producción de ácidos grasos de cadena corta e interacción de estos compuestos con el colon se da en la porción distal (Goodlad, 2001, Sengupta *et al.*, 2001). A pesar de que no se

tienen informes hasta el momento sobre el efecto del frijol y sus polisacáridos sobre las FCA inducidas con agentes químicos (AOM), si se tienen informes de que la adición de frijol negro a la dieta disminuye hasta en un 54% el número total de tumores en colon distal de ratas inducidas químicamente con AOM (Hangen y Bennink, 2002). Estos datos sugieren que el efecto protector del frijol negro 8025 es en la región distal del colon y que es probable que su mecanismo protector pueda actuar en etapas tempranas del cáncer de colon.

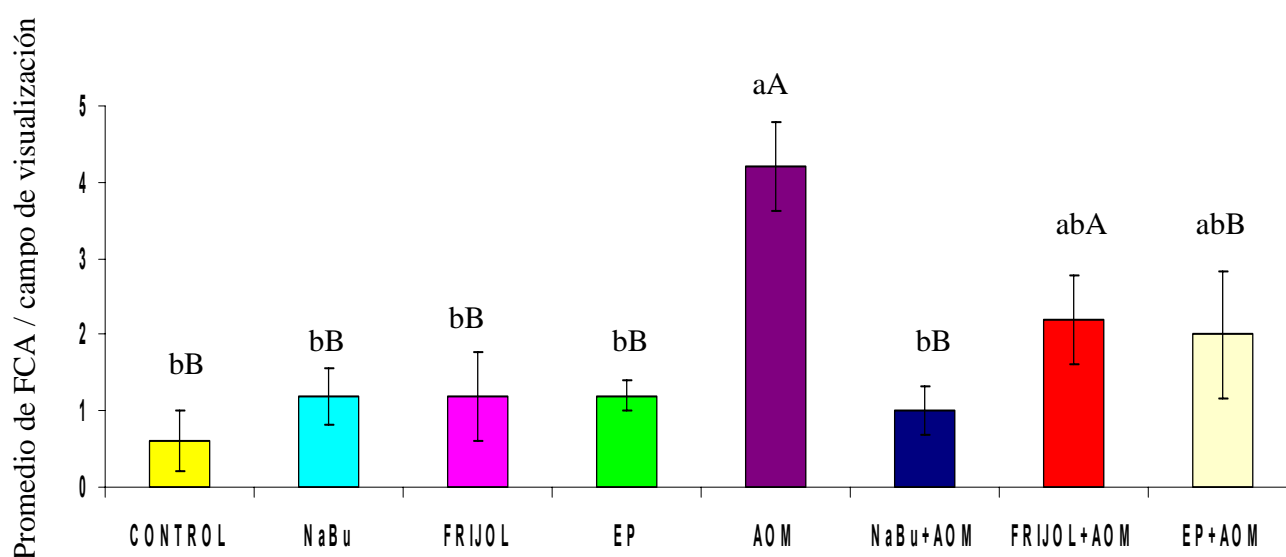


Figura 24. Efecto del frijol común (*P vulgaris* L.) variedad Negro 8025 cocido, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu sobre fosas crípticas aberrantes (FCA) inducidas químicamente con azoximetano (AOM), en la porción distal de colon.

AOM = Azoximetano, EP = Extracto de Polisacáridos, NaBu = Butirato de Sodio. Cada valor representa la media de 5 muestras de colon independientes con 20 cortes cada uno \pm Desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ prueba de Tukey. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ prueba de Dunnett's

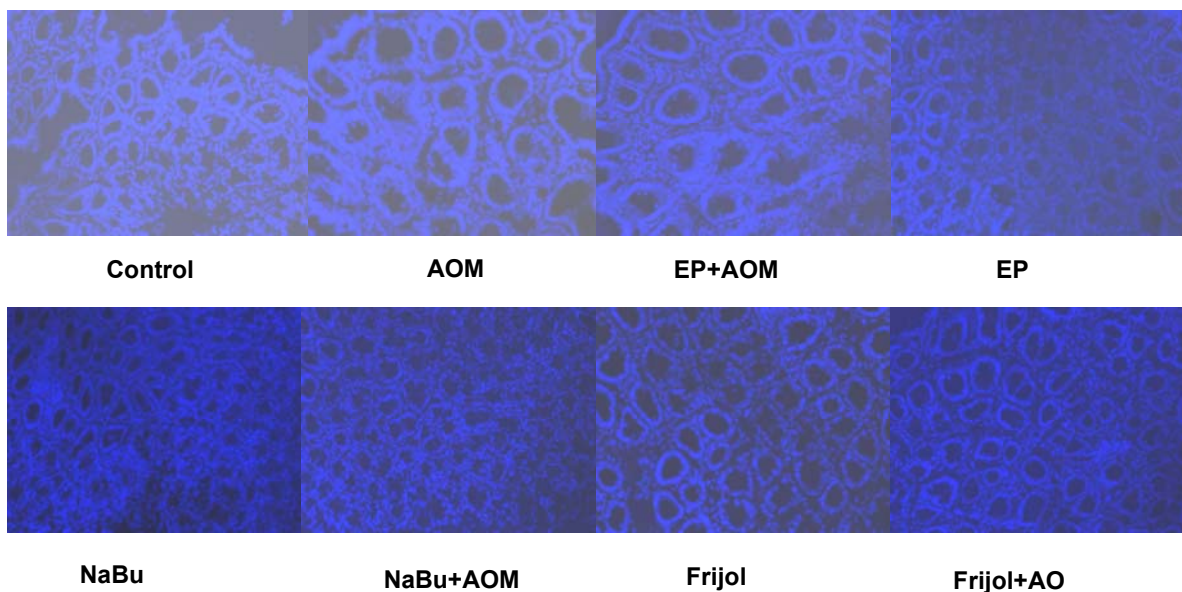
Cabe destacar que tampoco se tienen informes con respecto al efecto de los polisacáridos sobre las FCA, pero sí se tienen estudios con respecto a algunos componentes que forman parte de los polisacáridos como por ejemplo oligosacáridos que de acuerdo con Buecher *et al.* (2003) al ser adicionados a la dieta disminuyen el número de FCA hasta en un 20%. Nakanishi *et al.* (2003) informan una disminución

en el número de FCA al adicionar almidón resistente de maíz a la dieta en tiempos cortos de experimentación (5 semanas). Tomando en consideración estos reportes se puede sugerir que los resultados obtenidos para el EP concuerdan con la literatura, ya que como se mencionó anteriormente tanto los oligosacáridos, la fibra y el almidón resistente conforman a los polisacáridos evaluados en este trabajo.

En la figura 25 se muestran los tratamientos de frijol, EP y NaBu de la región colónica proximal y distal con tinción de Dapi, donde es posible apreciar las características morfológicas de una fosa críptica normal con una forma completamente delimitada, sin alteraciones en el núcleo o en la membrana celular, tendiendo a ser circulares con ligeras alteraciones ovoidales (Bird *et al.*, 1989). Mientras que en la fosa críptica aberrante se puede apreciar alteraciones en la membrana celular, con un núcleo no bien definido, pueden presentar abultamiento hacía el lumen de la cavidad colónica, diversos núcleos dentro de una misma cripta, así como aperturas o ausencia de pared celular (Bird *et al.*, 1989; Bird, 1995; Bird y Good, 2000; Papanikolaou *et al.*, 2000).

Los cortes histológicos indican que cada uno de los tratamientos influye en la disminución o formación de fosas crípticas aberrantes según sea el caso de forma diferente para la zona proximal y la zona distal. Esta diferencia es interesante ya que cada una de estas regiones colónicas cumple con funciones biológicas diferentes, por ejemplo la porción proximal del colon tiene como principal función la absorción de agua y de ciertos electrolitos, así como la fermentación de compuestos insolubles por la microflora colónica (Atuma *et al.*, 2001; Musch *et al.*, 2002; Tyagi *et al.*, 2002), mientras que en la porción distal, la principal función es la de formación del bolo fecal, así como la interacción de AGCC con los colonocitos (Charney *et al.*, 1998). También se sabe que en la porción distal es donde se encuentra en mayor concentración la enzima β -glucuronidasa que se encarga de reactivar al metilazoximetano para obtener el carcinógeno final, el ión metilcarbonio principal responsable de la formación de aductos en el ADN (Corpet y Tache, 2002)

A. Zona colónica proximal



B. Zona colónica distal

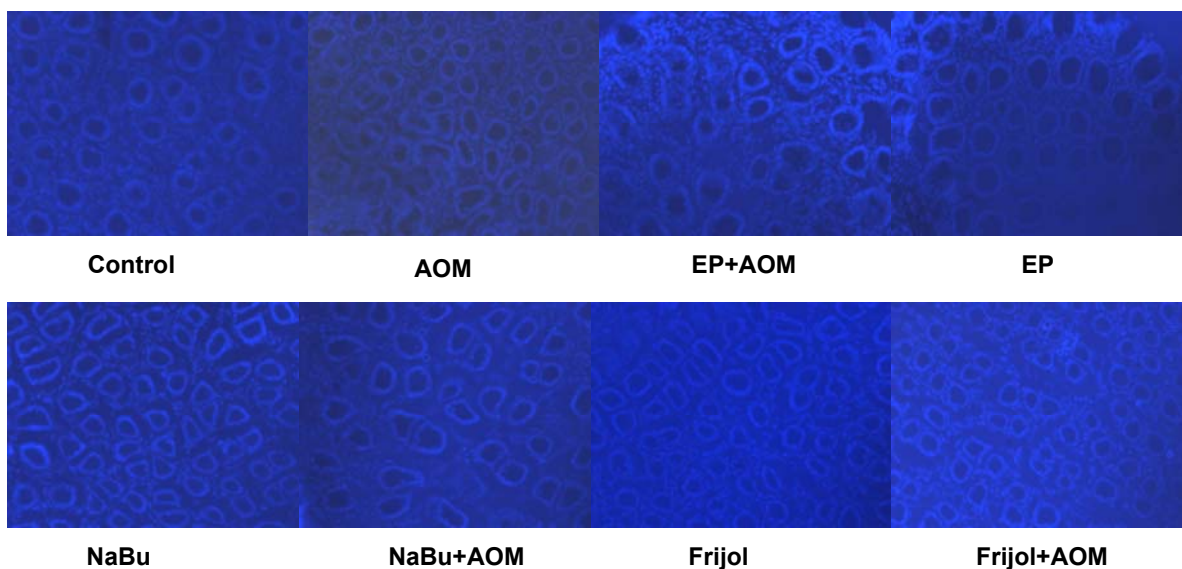


Figura 25. Visualización de fosas cripticas aberrantes (FCA) con tinción de Dapi. En el recuadro se marcan las fosas crípticas aberrantes de cada grupo evaluado **A)** Cortes histológicos de la zona proximal, **B)** Cortes histológicos de la zona distal. Fosa críptica de la zona proximal inducida con AOM y C) Fosa críptica de la zona distal inducida con AOM

4.5 Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) con el tratamiento de frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu

La producción de AGCC generados por la administración de frijol, EP y NaBu por sonda gástrica en los diferentes tratamientos se obtuvo por interpolación a una curva de calibración para cada uno de los ácidos grasos (Figura 52 de Anexos).

En la figura 26, se muestra la producción de AGCC durante el periodo experimental. Podemos observar que la concentración de cada uno de los ácidos fue aumentando con respecto al tiempo de experimentación; estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores donde se explica que a mayor tiempo, la presencia de compuestos indigeribles en el colon (como: fibra insoluble, almidón resistente y oligosacáridos), genera un incremento en la población bacteriana benéfica (bifidobacterias ácido lácticas) y/o regeneración de la misma, produciendo por consiguiente un aumento en la producción de AGCC (Campbell *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1998; Bird *et al.*, 2000).

En el cuadro 22, se muestra la producción de AGCC de los diferentes tratamientos al momento del sacrificio en contenido cecal, contenido colónico y heces.

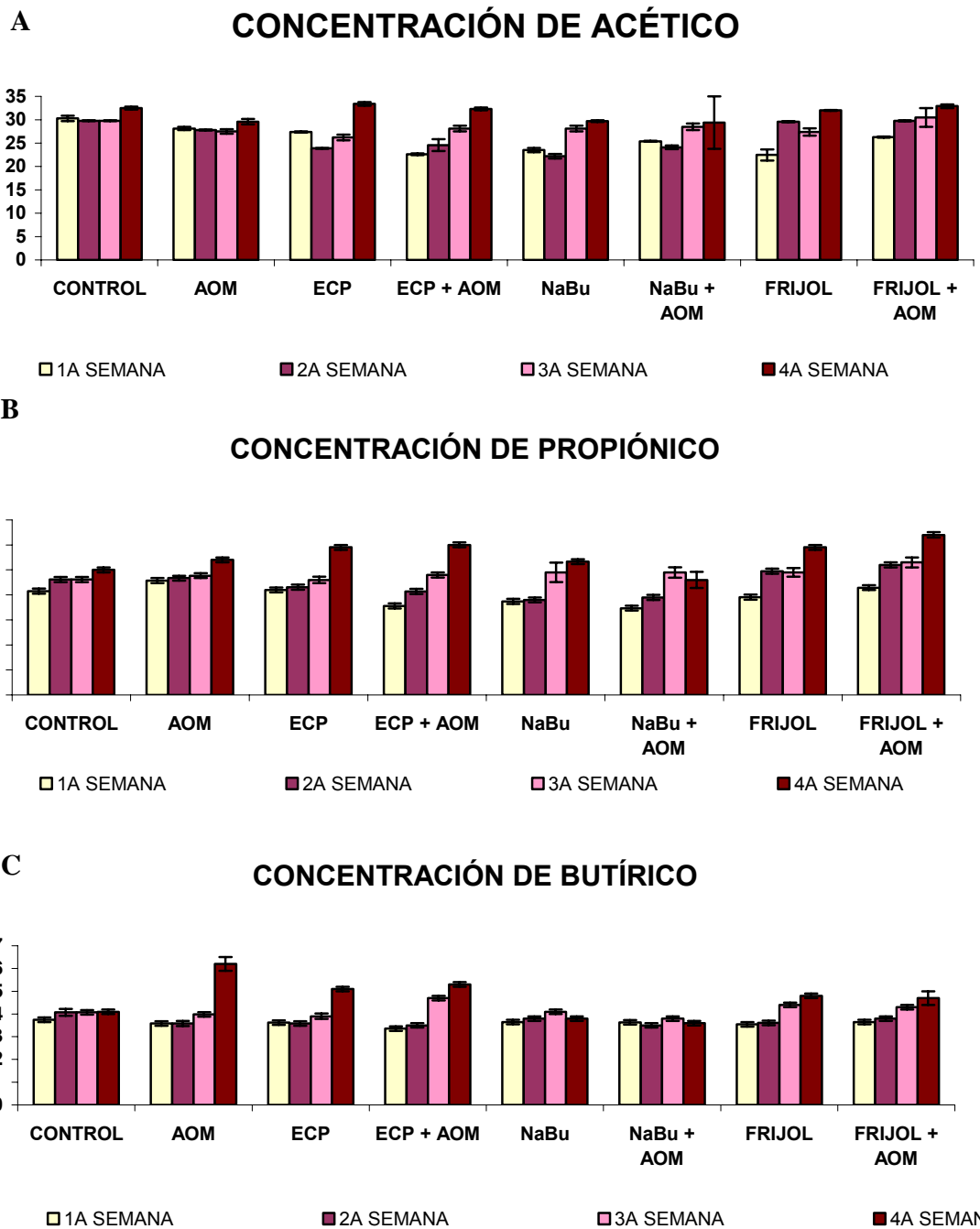


Figura 26. Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en heces durante el periodo experimental. Descripción de las muestras: **A.** Concentración del ácido acético, **B.** Concentración del ácido propiónico, **C.** Concentración de ácido butírico

Cuadro 22. Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el contenido cecal, colónico y heces de los tratamientos de frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu.

GRUPO	CONCENTRACIÓN ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA (AGCC) (mM/ g de Mtra)								
	Acético	CECAL Propiónico	Butírico	Acético	COLÓNICO Propiónico	Butírico	Acético	HECES Propiónico	Butírico
Control	29.5 ± 1.1 ^d	6.3 ± 0.1 ^{ab}	6.5 ± 0.1 ^a	32.3 ± 1.3 ^a	6.3 ± 0.09 ^{bc}	5.4 ± 0.03 ^a	35.2 ± 0.4 ^{ab}	3.07 ± 0.01 ^e	3.6 ± 0.01 ^g
AOM	36.0 ± 1.2 ^{abc}	6.7 ± 0.1 ^{ab}	6.1 ± 0.1 ^{ab}	33.8 ± 1.8 ^a	6.1 ± 0.02 ^{cd}	4.9 ± 0.03 ^{bc}	32.9 ± 0.7 ^{bc}	5.0 ± 0.03 ^c	3.7 ± 0.04 ^{fg}
NaBu	33.5 ± 0.1 ^{bcd}	6.6 ± 0.1 ^{ab}	5.4 ± 0.1 ^c	36.2 ± 0.4 ^a	7.6 ± 0.06 ^a	5.4 ± 0.05 ^a	38.7 ± 0.1 ^a	6.3 ± 0.11 ^b	4.3 ± 0.01 ^c
NaBu + AOM	34.5 ± 0.2 ^{bc}	6.2 ± 0.02 ^{ab}	5.7 ± 0.01 ^{bc}	36.1 ± 1.0 ^a	6.8 ± 0.07 ^b	4.7 ± 0.01 ^c	37.4 ± 0.2 ^a	5.9 ± 0.03 ^b	5.2 ± 0.05 ^b
EP	35.2 ± 0.1 ^{bc}	6.9 ± 0.08 ^a	6.7 ± 0.06 ^a	31.1 ± 0.4 ^a	4.9 ± 0.11 ^e	5.3 ± 0.09 ^{ab}	32.8 ± 0.3 ^{bc}	3.9 ± 0.18 ^d	4.0 ± 0.05 ^{de}
EP + AOM	32.1 ± 1.8 ^{cd}	6.7 ± 0.4 ^{ab}	5.3 ± 0.24 ^c	36.5 ± 0.9 ^a	4.9 ± 0.10 ^e	4.7 ± 0.03 ^c	38.0 ± 0.2 ^a	7.0 ± 0.14 ^a	5.5 ± 0.07 ^a
Frijol	37.1 ± 0.7 ^{ab}	6.7 ± 0.3 ^{ab}	6.2 ± 0.05 ^{ab}	31.7 ± 1.6 ^a	5.8 ± 0.14 ^d	4.7 ± 0.05 ^c	33.1 ± 0.4 ^{bc}	4.9 ± 0.03 ^c	3.8 ± 0.01 ^{ef}
Frijol + AOM	40.4 ± 1.8 ^a	5.6 ± 0.1 ^a	5.4 ± 0.21 ^c	34.2 ± 1.1 ^a	7.9 ± 0.03 ^a	4.6 ± 0.03 ^c	30.8 ± 1.8 ^c	5.1 ± 0.14 ^c	4.0 ± 0.02 ^d

Valores expresados como mM de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, respectivamente / g de muestra
Extracto de Polisacáridos (EP), Butirato de Sodio (NaBu), Azoximetano (AOM). Cada valor representa la media de tres réplicas con tres repeticiones ± error estándar. Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa con $\alpha=0.05$ prueba de Tukey. Ácido acético = $C_2H_4O_2$; ácido propiónico = $C_3H_6O_2$ y ácido butírico = $C_4H_8O_2$

Se puede observar que los diferentes tratamientos influyen sobre la producción de AGCC en las diferentes zonas evaluadas. Los resultados aún cuando no son comparables con lo de la literatura en el sentido estricto, sí se pueden coparar con otros que al menos presentan un componente que está presente en el EP (fibra, AR, oligosacáridos, compuestos fenólicos). Por ejemplo, Le-Leu *et al.* (2003, 2005) reportan diferente concentración de AGCC dependiendo de la dieta administrada, en su caso específico, dieta de almidón resistente y enriquecida con *Bifidobacterium lactis*. Mientras, Nakanishi *et al.* (2003) administran almidón resistente y esporas de *Clostridium butyricum* concluyendo que los diferentes tratamientos influyen en la producción de AGCC en las diversas zonas del colon. La producción de ácido acético en la porción cecal fue de 40.39 mM/g de muestra, siendo ésta la mayor producción de este ácido y la menor producción se observa en el grupo control (29.54 mM/g de muestra). La mayor producción de ácido acético se puede explicar de la siguiente manera: en el colon se adsorben sustancias como son minerales (Sodio y Calcio), así como algunos carbohidratos como lo es la glucosa; ésta es utilizada por las bacterias colónicas para producir acético lo que genera disminución en el pH, esto se refleja en un incremento en la población de bacterias acidófilas y por consiguiente mayor producción de AGCC (McBain y Macfarlane, 1998), este efecto crea un agonismo con los sustratos insolubles presentes en el frijol lo que conlleva a una mayor producción de ácido acético, precursor del ácido propiónico y del ácido butírico. La concentración de ácido propiónico en el grupo de EP fue mayor (6.92 mM/g de muestra) así como el ácido butírico (6.70 mM/g de muestra), resultados que coinciden con los reportados por diversos autores, quienes reportan que la producción de ácido butírico se incrementa en esta zona del colon al adicionar a la dieta compuestos insolubles tanto en humanos (Cummings *et al.*, 1996), puercos (Govers *et al.*, 1999) como en (Le Blay *et al.*, 1999).

En la porción colónica la producción de acético no presenta diferencia significativa en ninguno de los tratamientos. El ácido propiónico es mayormente

producido en el grupo de frijol + AOM con una concentración de 7.96 mM/g de muestra, resultado que difiere de lo informado por Nakanishi *et al.* (2003) de 8.8 mM/g, quienes evaluaron la adición de esporas de *C. butyricum* a la dieta. La diferencia podría sugerirse por tratarse de diferentes tratamientos. El grupo de NaBu + AOM es el que presenta diferencia estadística con respecto a los otros grupos en la producción de ácido butírico.

En las heces, se observó una mayor producción de ácido acético en el grupo de NaBu (38.71 mM/g de muestra), mientras que menor producción de este ácido se observó en el tratamiento de frijol + AOM (30.8 mM/g de muestra). El grupo de EP + AOM presenta una mayor producción de ácido propiónico (7.02 mM/g de muestra), mientras que el tratamiento control es el que presenta menor producción de propiónico (3.07 mM/g de muestra). Estos datos concuerdan con lo reportado en otros estudios donde se observa que sustratos diferentes al almidón resistente presente en diversos alimentos incrementan la producción de ácido propiónico (Berggren *et al.*, 1993). En la producción de ácido butírico se observó diferencia estadística en los tratamientos de NaBu, NaBu + AOM y EP + AOM con respecto al resto de los tratamientos, siendo este último tratamiento el que presenta una mayor producción de este ácido (5.49 mM/g de muestra).

Los datos mostrados en este trabajo no concuerdan con lo descrito por Henningsson *et al.* (2001) en frijol cocido, quienes reportan una producción en promedio de 72.5, 9.5 y 18% para ácido acético, propiónico y butírico respectivamente en una dieta adicionada con 120 g de carbohidratos indigeribles (oligosacáridos y AR). Sin embargo, las diferencias se pueden atribuir al tipo y variedad de frijol empleado, a la porción analizada ya que ellos solo analizan el almidón resistente y los oligosacáridos, sin tomar en cuenta la fracción de fibra insoluble, que se incluye en los polisacáridos de este trabajo.

5. Análisis molecular de genes y proteínas involucrados en el estadio temprano de cáncer de colon

Se eligió medir la expresión de genes implicados en cáncer de colon: *p53*, *p21*, *rb*, *bcl-2*, *bax* y *β-catenina*, empleando como control de carga Glicerinaldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (*gadph*), así como la expresión de las proteínas: Bcl-2, Bax, p21, p53, Rb-P, Caspasa 3 y como control de carga Actina.

5.1 Obtención de ARN

La presencia y purificación de ARN para cada tratamiento de la zona proximal y distal se muestra en la figura 49 (Anexos). El ARN de cada condición fue empleado como templado para la síntesis de la primera cadena de ADNc mediante la acción de enzima transcriptasa reversa Superscript II.

La determinación del contenido de ARN se llevó a cabo biofotométrica y fluorométricamente en cada uno de los tratamientos (Cuadro 25, Anexos).

Las concentraciones a utilizadas en nuestro estudio fueron las calculadas por el método del fluorómetro por su sensibilidad, debido a que es un equipo con mayor sensibilidad que el Biofotómetro y permite cuantificar de forma más exacta la cantidad de ARN de las muestras.

5.2 Síntesis de ADNc

Con el propósito de obtener un ADNc que represente la mayor parte de los ARNm, en todas las muestras se determinó el número óptimo de ciclos de PCR (Figura 50, Anexos).

A cada una las muestras se les optimizó el número de ciclos óptimos necesarios, que oscilaron entre los 27 y 30 ciclos (Figura 51, Anexos).

5.3 RT-PCR

Una vez obtenido el ADNc, se analizaron los genes involucrados en el proceso de carcinogénesis de colon.

Para la expresión de los diferentes genes evaluados en cada uno de los tratamientos, se utilizó la misma concentración de ARN (61.17 ng/ μ L) tanto para la zona proximal como la zona distal del colon. Dicha concentración se visualiza en geles de agarosa en la figura 52 (Anexos), donde es posible apreciar que la concentración de ARN para cada uno de los diferentes tratamientos se encuentra bajo las mismas condiciones.

La expresión de los genes *p53* y *β -catenina* se muestra en la figura 27. Se puede observar que en el caso del gen *p53*, éste presenta una expresión superior en el tratamiento de NaBu, con respecto al tratamiento de AOM, sin embargo la expresión de este gen es similar entre los tratamientos AOM y control respectivamente. Cabe recalcar que este gen es el guardian del genoma por lo que cualquier estímulo que induzca daño al ADN activara la expresión del mismo, por otra parte este gen también se encuentra relacionado con proliferación celular de igual manera que *β -catenina* (Yu *et al.*, 2002)

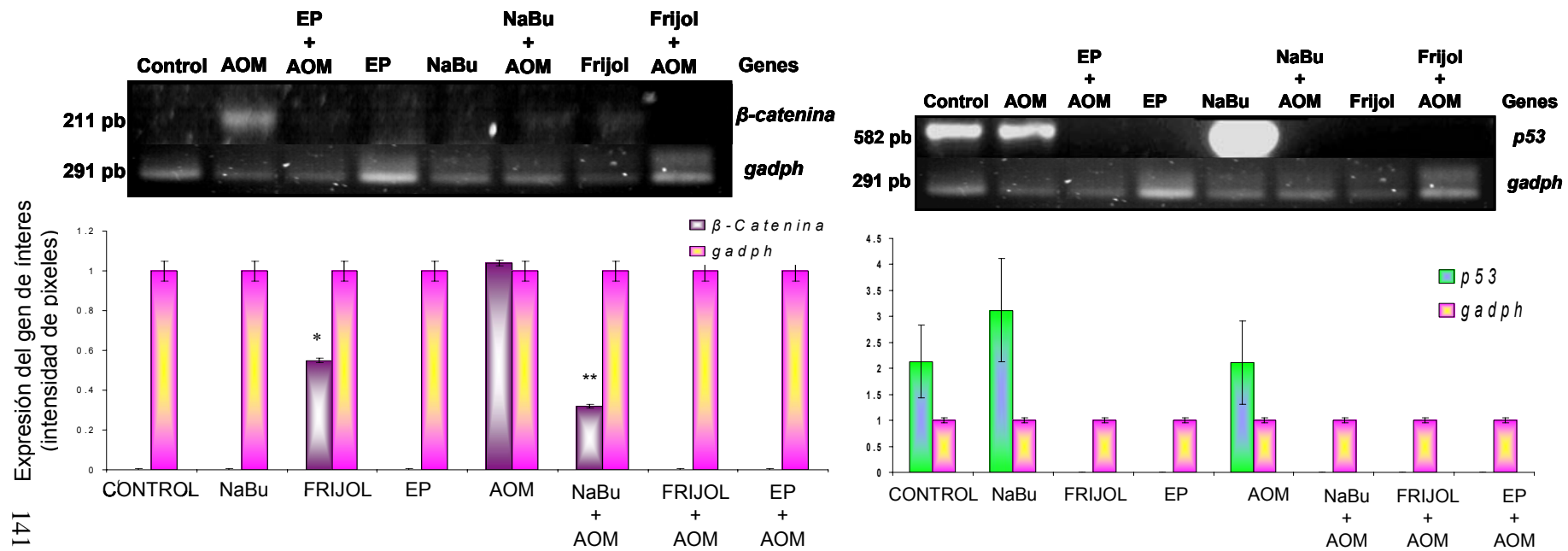


Figura 27. Expresión y normalización de los genes β -catenina y p53 en la zona proximal del colon. Cada valor representa el promedio de tres lecturas por tratamiento de tres réplicas

AOM = Azoximetano, EP = Extracto de Polisacáridos, NaBu = Butirato de Sodio. *(con respecto al control negativo) y **(con respecto al tratamiento de AOM) indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ por la prueba de Dunnett's

La expresión de β -*catenina* solo se puede observar en los tratamientos de Frijol, NaBu+AOM y AOM, siendo este último el que presenta una mayor expresión con respecto a los otros tratamientos. Cabe recalcar que β -*catenina*, es un gen involucrado en la proliferación celular y que niveles elevados de β -*catenina* en el núcleo son una de las alteraciones más habituales en cáncer de colon, cualquiera que sea su estadio. Las mutaciones ocurren normalmente en el exón 3 y afectan a los aminoácidos implicados en la fosforilación por GSK-3 β , que son las serinas localizadas en las posiciones 33, 37 y 45 y la treonina 41 (Porción N-terminal de la proteína) (Koesters *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2000). Estas mutaciones están asociadas con una variedad de cánceres entre los que destacan el de piel, hígado, cerebro y colon. Estos cambios han sido encontrados en alrededor de 50% de los tumores humanos de colon en los cuales el gen *APC* no presenta ninguna mutación (Sparks *et al.*, 1998; Hirose *et al.*, 2003).

En un estudio reportado por Koesters *et al.* (2001), se indica que se encontraron mutaciones puntuales en el codon 41 (ACC \rightarrow ATC) de β -*catenina* en el 99% de los tumores de ratas inducidos químicamente con 1,2-DMH, precursor del Azoximentano (AOM). Estos hallazgos sugieren que la vía de señalización Wnt al sufrir mutaciones en sus genes contribuye en la carcinogénesis de colon en ratas.

Otro gen que de manera indirecta se encuentra relacionado con la vía de señalización Wnt es *p21* es el primer gen supresor de tumores identificado por lo que se encuentra relacionado con inducción de arresto al ciclo celular. Los diferentes tratamientos de la zona colónica proximal muestran expresión de *p21* (Figura 28). La expresión de *p21* es básicamente a nivel transcripcional aunque pueden estar implicados también mecanismos de estabilidad del ARN mensajero (Vidal y Koff, 2003).

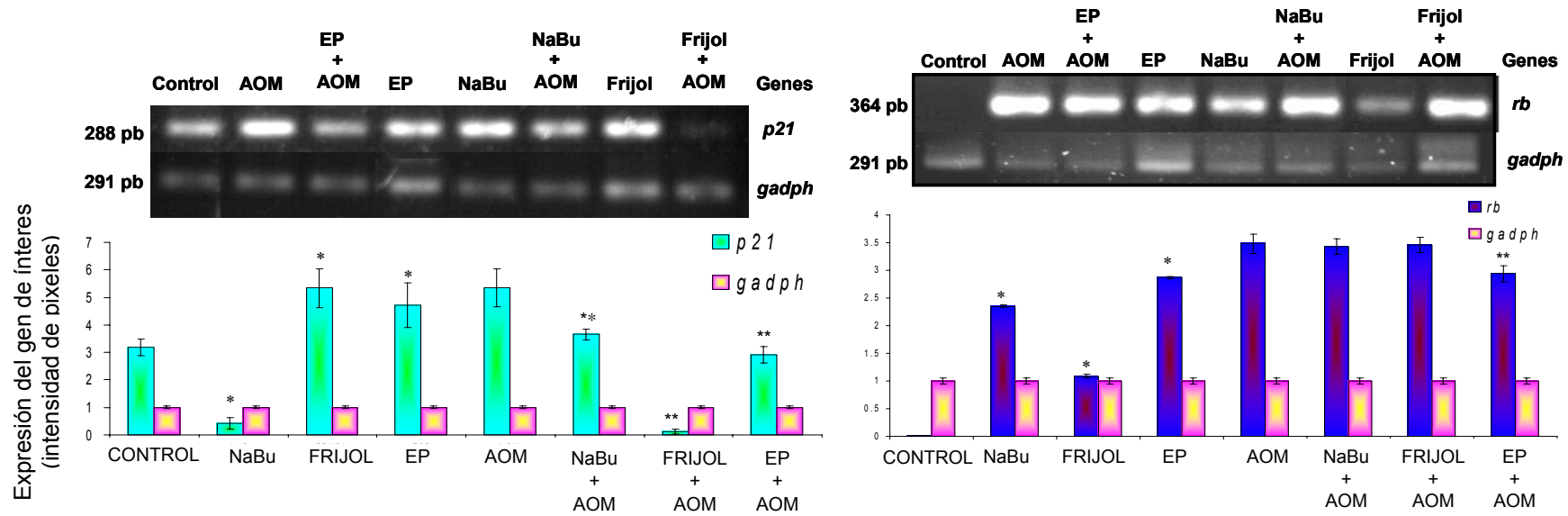


Figura 28. Expresión y normalización de los genes *p21* y *rb* en la zona proximal del colon. Cada valor representa el promedio de tres lecturas por tratamiento de tres réplicas

AOM = Azoximetano, EP = Extracto de Polisacáridos, NaBu = Butirato de Sodio. *(con respecto al control negativo) y ** (con respecto al tratamiento de AOM) indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ por la prueba de Dunnett's

Con respecto al gen de retinoblastoma (*rb*), es un gen que inhibe la proliferación celular. Los tratamientos con AOM (AOM, NaBu+AOM, Frijol+AOM y EP+AOM), son los que presentan una mayor expresión de *rb* (Figura 28) a pesar de que la regulación de *rb* en condiciones normales ocurre a nivel postranscripcional principalmente, por fosforilación de la proteína (pRb) (Zhang *et al.*, 2000), los resultados obtenidos para *p21* y *rb* para el tratamiento de EP+AOM (baja expresión de *p21* y una expresión considerable de *rb*), sugieren que los polisacáridos no inducen arresto al ciclo celular en la zona proximal del colon, sin embargo características similares de expresión se han observado en tratamientos con AGCC en modelos *in vitro* que sugieren un estado de diferenciación celular inducido principalmente por el ácido propiónico y el ácido butírico.

Por otra parte el análisis de la expresión de genes anti y pro apoptóticos (*bcl-2* y *bax*, respectivamente) indicó que solo los tratamientos Control y EP muestra expresión del gen anti apoptótico (*bcl-2*) y ninguno de los tratamientos expresa *bax* (gen pro apoptótico), al evaluar la expresión de un gen río abajo involucrado en la fragmentación al ADN (*caspasa 3*) se observó expresión en el tratamiento de AOM, Frijol, NaBu+AOM, NaBu y Control (Figura 29) lo que sugiere un estado apoptótico independiente de la vía mitocondrial que puede ser consecuencia de la regeneración epitelial del colon la cual ocurre cada 2-3 días.

Recapitulando en la zona proximal por efecto de frijol y EP en presencia de AOM disminuye la proliferación celular como lo indica la menor expresión de *p53* y *β -catenina*, mientras que una baja expresión de *p21* y una alta expresión de *rb* similar a la expresión de AOM sugieren un proceso de diferenciación celular, mismo que ha sido reportado en tratamientos con AGCC en modelos *in vitro*. Además no induce apoptosis vía mitocondrial por la no expresión de *bcl-2* (anti-apoptótico), *bax* (pro-apoptótico) y *caspasa 3*.

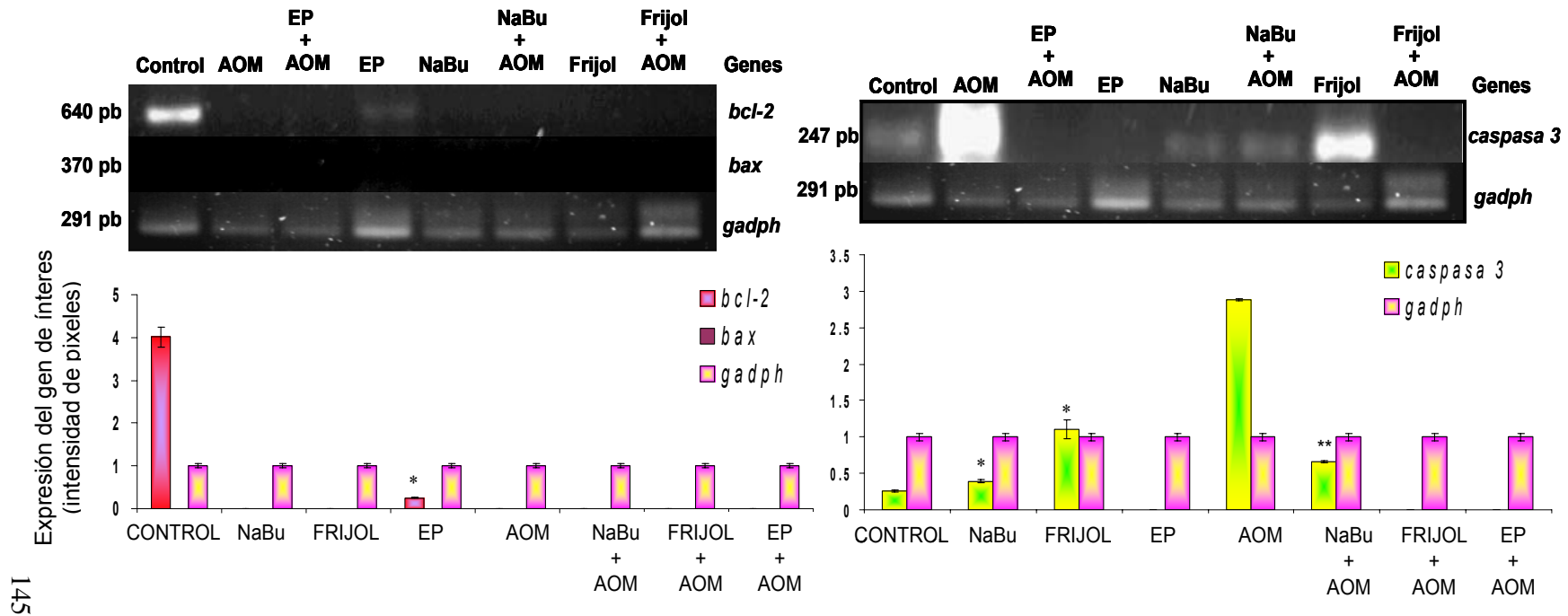


Figura 29. Expresión y normalización de los genes *bcl-2*, *bax* y *caspasa 3* en la zona proximal del colon Cada valor representa el promedio de tres lecturas por tratamiento de tres réplicas

AOM = Azoximetano, EP = Extracto de Polisacáridos, NaBu = Butirato de Sodio. *(con respecto al control negativo) y **(con respecto al tratamiento de AOM) indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ por la prueba de Dunnett's

La expresión de genes de la zona colónica distal se muestra en las figuras 34, 35 y 36. En la figura 30, se apreció que solo los tratamientos AOM y Frijol+AOM presentaron expresión de *p53* y *β-catenina* genes relacionados con proliferación celular, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para la histología con Dapi, ya que estos dos tratamientos (AOM y Frijol+AOM) son los que presentaron mayor número de FCA en esta zona colónica y que como se mencionó anteriormente mas del 80% de los tumores de rata inducidos químicamente tienen mutaciones puntuales en *β-catenina* (Koesters *et al.*, 2001).

También fue posible apreciar que el tratamiento de EP+AOM no presenta expresión de *p53* y tampoco de *β-catenina*. EP contiene compuestos indigeribles por el tracto gastrointestinal por lo que llegan en forma casi intacta al colon donde pueden ser utilizados como sustrato por las bacterias colónicas generando entre otros compuestos AGCC, dentro de éstos se encuentra el ácido butírico que se ha relacionado como inducción de genes relacionados con arresto al ciclo celular y apoptosis.

Al ácido butírico también se le ha relacionado en la modulación de la transcripción de varios genes como la *β-catenina*. Por alteración en los elementos *cis* a *trans* que actúan en la acetilación de histonas es que el butirato puede actuar como un factor de transcripción reduciendo la expresión de *β-catenina* (Bordonaro *et al.*, 1999).

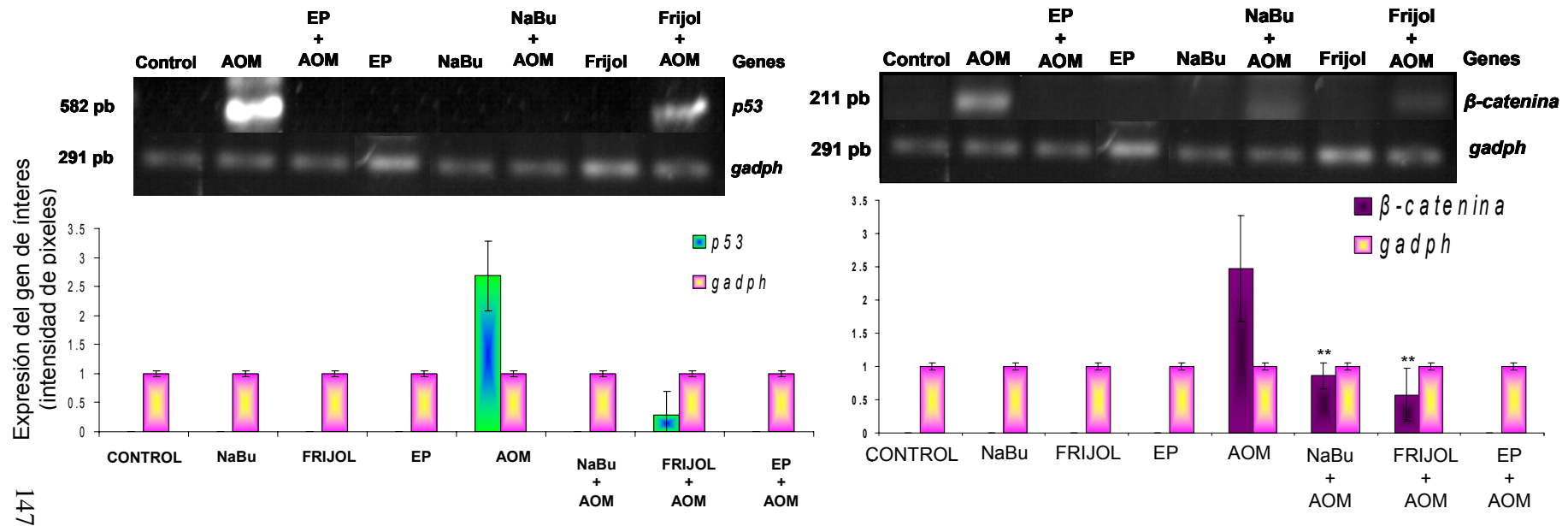


Figura 30. Expresión y normalización de los genes *p53* y *beta-catenina* en la zona distal del colon. Cada valor representa el promedio de tres lecturas por tratamiento de tres réplicas

AOM = Azoximetano, EP = Extracto de Polisacáridos, NaBu = Butirato de Sodio. *(con respecto al control negativo) y ** (con respecto al tratamiento de AOM) indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ por la prueba de Dunnett's

Por otra parte el tratamiento de NaBu + AOM no induce la expresión de *p53*, sin embargo al evaluar la expresión de *p21* este tratamiento muestra una mayor expresión de este gen (*p21*) con respecto al tratamiento de AOM, siguiendo la misma tendencia el tratamiento EP + AOM (Figura 31). Mariadason *et al.* (2000) han reportado estudios de micro-arreglos para investigar los efectos del butirato sobre genes involucrados en cáncer de colon como *p53*, *p21*, *rb*, y diferentes ciclinas entre otros. En células tratadas con butirato hubo la expresión de *p21* de forma independiente de la expresión de *p53* (Mallar-Roemer y Roemer, 2001).

En el caso de *rb* (Figura 31), solo se mayor expresión en el tratamiento de AOM lo que sugiere que el carcinógeno pudiera generar mutación en el gen y de está manera asegurar la transcripción de los genes necesarios para la proliferación celular. Los tratamientos EP + AOM y NaBu + AOM no presentaron expresión del gen *rb* lo que sugiere un estado hipofosforilado de p-RB que da lugar a la inducción de arresto al ciclo celular, sin embargo y como se mencionó anteriormente la regulación del retinoblastoma se da a nivel postranscripcional.

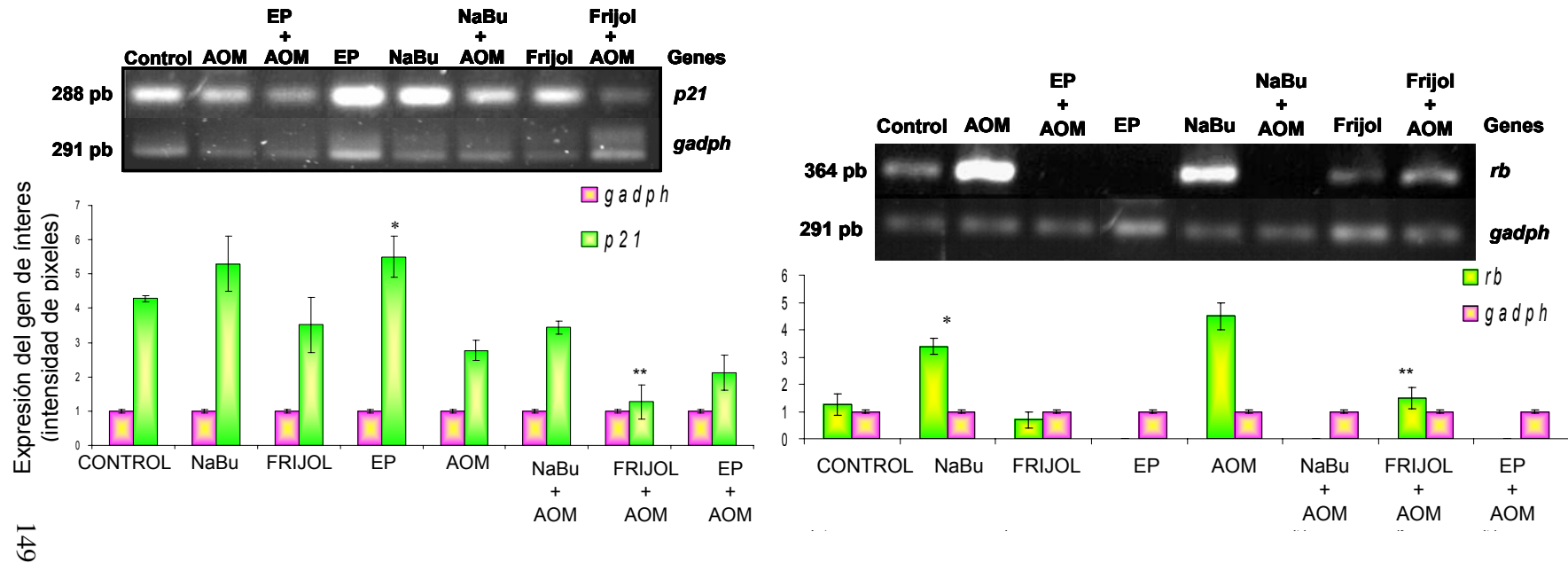


Figura 31. Expresión y normalización de los genes *p21* y *rb* en la zona distal del colon. Cada valor representa el promedio de tres lecturas por tratamiento de tres réplicas

AOM = Azoximetano, EP = Extracto de Polisacáridos, NaBu = Butirato de Sodio. *(con respecto al control negativo) y **(con respecto al tratamiento de AOM) indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ por la prueba de Dunnett's

Otra forma de regulación del butirato es por inducción de apoptosis vía mitocondrial, en la figura 32, se aprecia que el tratamiento EP + AOM inhibe la expresión de *bcl-2* e incrementa la expresión de *bax*. En estudios con colonocitos en presencia de butirato se observó una diferencia en los niveles de transcripción de *bcl-2* (decremento) y *bax* (incremento) (Hass *et al.* 1997). Ruemmele *et al.* (2005), han demostrado que el butirato disminuye la expresión de Bcl-2 y aumenta los niveles de Bax translocando el citocromo C de la mitocondria al citosol en células Caco 2 induciendo apoptosis vía mitocondrial. También se ha demostrado que la sobreexpresión del gen *bcl-2*, se asocia con la proliferación neoplásica por los efectos inhibitorios de Bcl-2 sobre las vías de apoptosis (Munn *et al.*, 1995; Adams y Cory, 1998). Mientras que la sobre expresión de otro miembro de la familia *bcl-2* un regulador pro-apoptótico denominado *bax*, genera un efecto inhibitorio sobre Bcl-2 induciendo con ello la apoptosis (Lodish *et al.*, 2002).

Los tratamientos NaBu + AOM y EP + AOM incrementan la expresión de *caspara 3* con respecto al tratamiento AOM (Figura 32). Se ha demostrado que tratamientos con bacterias productoras de AGCC inducen signos típicos apoptosis como los es la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial, generación de especies reactivas del oxígeno, presencia de caspasa 3 en núcleo, condensación de la cromatina (Jan *et al.*, 2002) Lo que sugiere que el butirato es un inductor de la apoptotis vía mitocondrial.

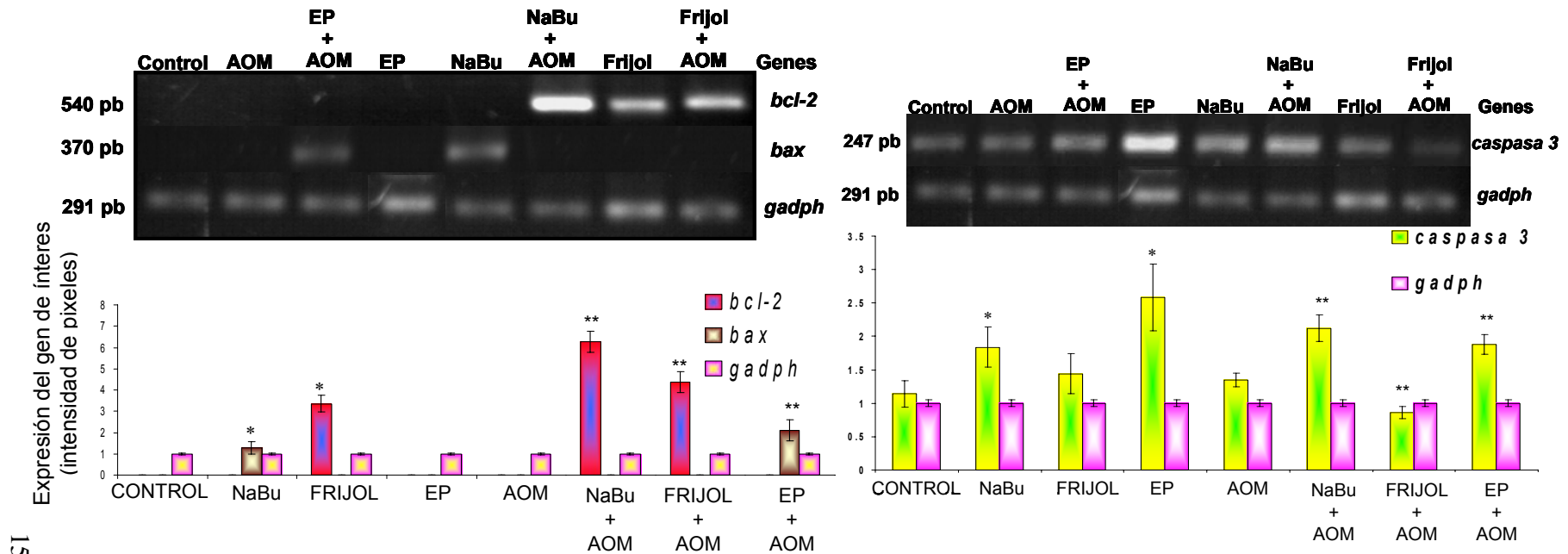


Figura 32. Expresión y normalización de los genes *bcl-2*, *bax* y *caspasa 3* en la zona distal del colon. Cada valor representa el promedio de tres lecturas por tratamiento de tres réplicas

AOM = Azoximetano, EP = Extracto de Polisacáridos, NaBu = Butirato de Sodio. *(con respecto al control negativo) y ** (con respecto al tratamiento de AOM) indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ por la prueba de Dunnett's

Resumiendo los resultados de la zona distal del colon se sugiere que el EP en presencia de AOM disminuye la proliferación celular dada la menor expresión de *p53* y *β-catenina*, así como un aumento en la expresión de *p21* y una baja expresión de *rb* lo cual nos habla de un posible mecanismo de arresto al ciclo celular. Por otra parte, el EP + AOM no induce la expresión de *bcl-2* e induce la expresión de *bax* y *caspasa 3*, lo que sugiere además un proceso apoptótico por vía mitocondrial. Es decir que el efecto del EP sobre la inhibición del número de FCA considerado como el estadio temprano de cáncer de colon, es a través de la inhibición de la proliferación celular, sugiriendo mecanismos como el arresto al ciclo celular y/o inducción de apoptosis.

5.4 Expresión de proteínas involucradas en el estadio temprano de colon por Western Blot

Como se ha mencionado con anterioridad no solo es necesario que un gen se exprese, sino que también este se transcriba a proteína, la cual realiza las funciones biológicas correspondientes, teniendo en consideración esta información se realizó el análisis de la expresión de las proteínas Bcl-2, Bax, p53, p21, Rb-P y Caspasa 3 en la zona proximal y distal del colon.

5.4.1 Obtención de proteínas

La cuantificación de proteína para cada tratamiento de la zona proximal y distal se muestra en el cuadro 27 (Anexos). Los valores se obtuvieron interpolando la absorbancia a una curva de calibración de albúmina (Figura 53 de Anexos).

Para determinar la expresión de proteínas (p53, p21, Rb-P, Bcl-2, Bax, Caspasa 3 y Actina como control de carga), se cargó en el gel una concentración de 100 µg de proteína para cada uno de los tratamientos de las zonas colónicas evaluadas por carril.

En las figuras 33 y 34 se muestra la influencia de los diferentes tratamientos sobre la expresión de las proteínas Bcl-2, Bax, Caspasa 3, p53, p21, Rb-P, utilizado como control de carga Actina en la zona proximal del colon.

En la figura 33, se observa que todos los tratamientos no influyen en la expresión de p53, mientras que el tratamiento de EP + AOM presenta una mayor concentración de p21 (136 ± 4.0) con respecto al tratamiento de AOM y el Control (4 ± 0.3 y 99 ± 3.0 , respectivamente), así como una menor expresión de Rb-P (68 ± 3.0) con respecto al tratamiento de AOM y el Control (130 ± 5.0 y 90 ± 7.0 , respectivamente) lo que sugiere un posible efecto de arresto al ciclo celular inducido probablemente por los compuestos generados de la fermentación a nivel del colon como lo son los AGCC, provenientes de los compuestos no digeribles y compuestos fenólicos presentes en el EP.

Los tratamientos no influyen sobre la expresión de Bcl-2 (Figura 34) lo que sugiere que la dosis empleada no es suficiente para la inducción a nivel de genes y/o de proteína. En general todos los tratamientos presentan una mayor expresión de Bax con respecto al tratamiento de AOM, sin embargo solo los tratamientos de NaBu, NaBu + AOM, Frijol + AOM y EP + AOM presentan un incremento en la expresión de caspasa 3 (90 ± 2.0 , 100 ± 2.0 , 124 ± 1.0 , 129 ± 2.0 , respectivamente) (Figura 34). Estos datos sugieren un estado apoptótico por vía mitocondrial, que podría ser a través de la activación directa del ácido butírico con p21 de forma independiente de p53. Este fenómeno ha sido reportado en modelos *in vitro* en presencia de NaBu a diferentes concentraciones (Coradini *et al.*, 2000). Mahyar-Roemer y Roemer (2001) en células de carcinoma de colon humano tratadas con n-butilato (2 mM) a diferentes tiempos (horas), reportan que n-butilato es capaz de inducir la expresión de p21 de forma independiente de p53 y que es un efectivo modulador de la apoptosis.

Por otra parte se ha demostrado que un aumento en la expresión de p21 inducida por el ácido butírico puede generar señales de diferenciación en células colónicas (Litvak *et al.*, 1998; Barshishat *et al.*, 2000) y que esta diferenciación puede estar acompañada de eventos apoptóticos (Heerdt *et al.*, 1994; Litvak *et al.*, 1998).

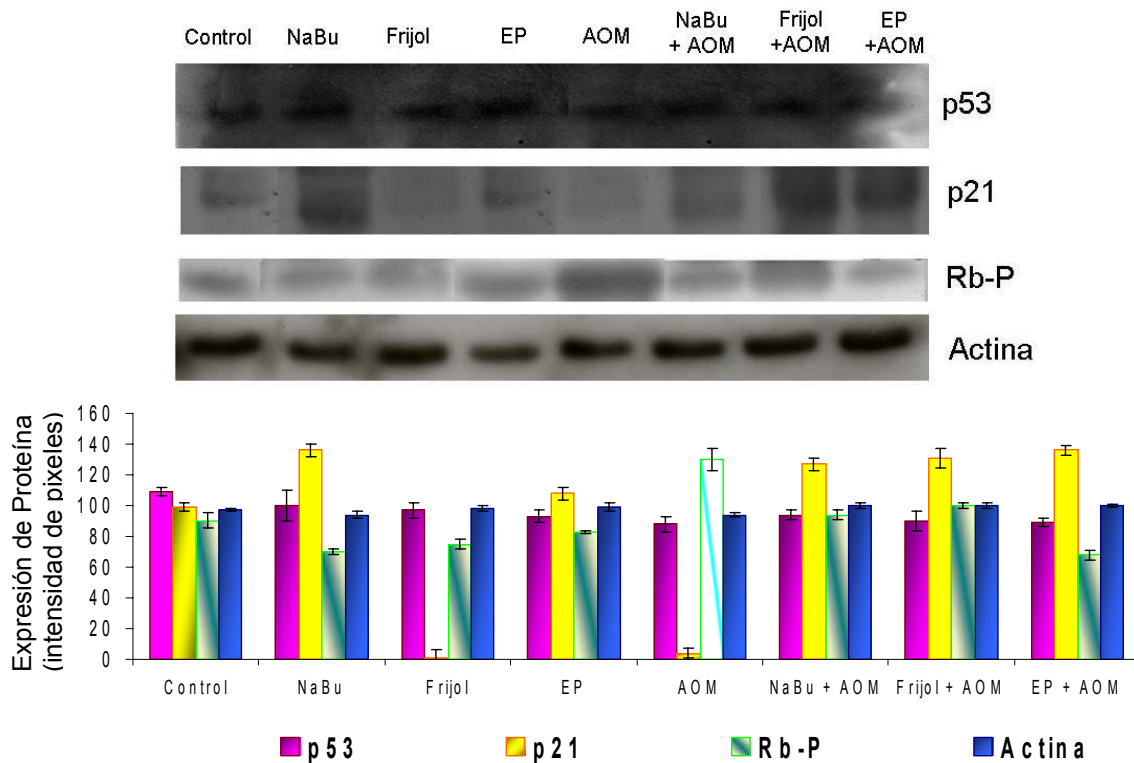


Figura 33. Efecto de los tratamientos sobre la expresión de las proteínas p53, p21 y Rb-P, en la porción proximal del colon.

AOM = Azoximetano, EP = Extracto de Polisacáridos, NaBu = Butirato de Sodio. Cada valor representa la media de 5 muestras de colon independientes \pm Desviación estándar. *(con respecto al control negativo) y *(con respecto al control positivo) indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ por la prueba de Dunnett's

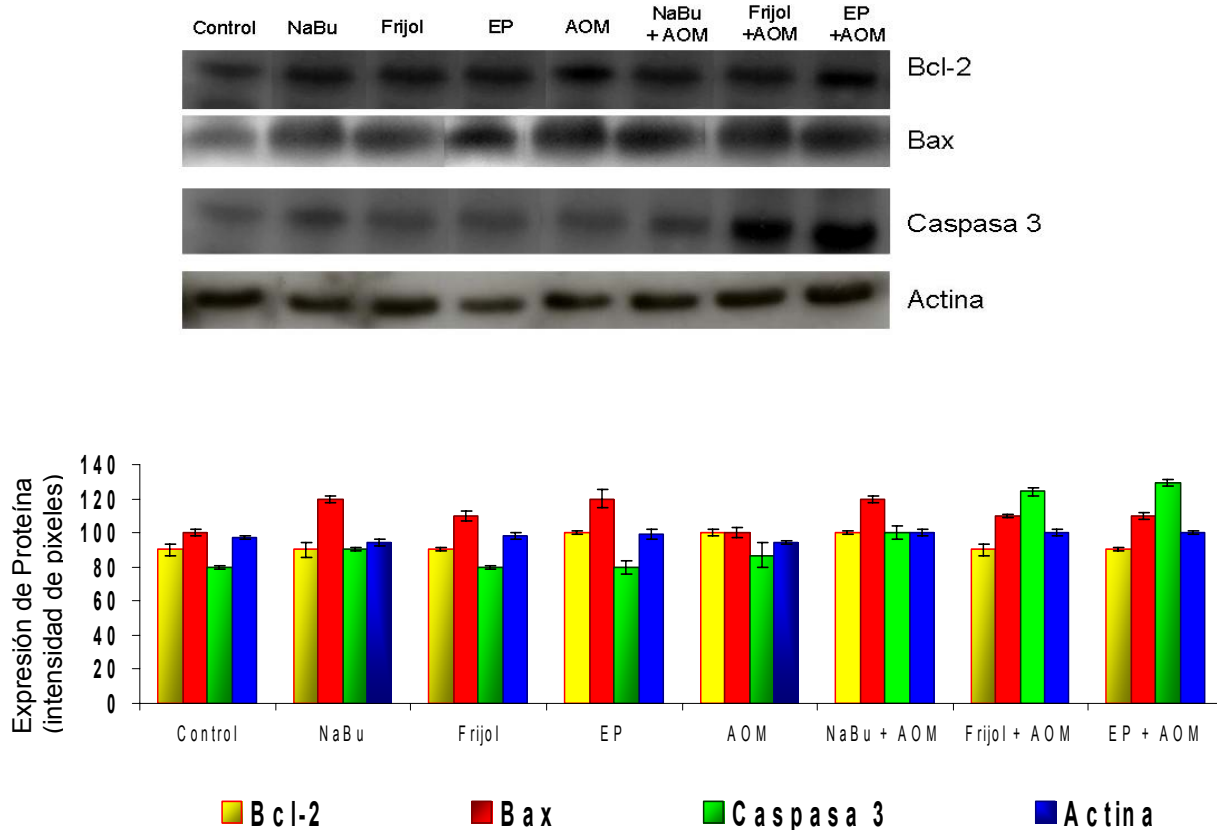


Figura 34. Efecto de los tratamientos sobre la expresión de las proteínas Bcl-2, Bax y Caspasa 3, en la porción proximal del colon.

AOM = Azoximetano, EP = Extracto de Polisacáridos, NaBu = Butirato de Sodio. Cada valor representa la media de 5 muestras de colon independientes \pm Desviación estándar. *(con respecto al control negativo) y *(con respecto al control positivo) indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ por la prueba de Dunnett's

Recapitulando los datos obtenidos para la zona proximal del colon se tiene que el frijol y el EP en presencia de AOM inducen mayor expresión postranscripcional de p21 y disminución en la expresión de las proteínas Rb-P así como una mayor expresión de Bax y Caspasa 3 (pro-apoptóticos), lo cual sugiere que los AGCC generados por estos tratamientos pueden producir señales de inducción al arresto celular o bien de diferenciación que pueden estar acompañadas de apoptosis, como se ha sugerido en modelos *in vitro*.

Las figuras 35 y 36 muestran la concentración de las proteínas evaluadas para la porción distal del colon.

El tratamiento de AOM es el que presenta mayor expresión de p53 (130 ± 5.0) (Figura 35), lo cual sugiere que el tejido contenía daño al DNA. Diversos autores entre los que se encuentra Dorszewska y Adamczewska-Goncerzwiz (2004), indican que al detectarse daño al DNA se incrementa la expresión de p53 a nivel transcripcional y postranscripcional. Sin embargo, es importante destacar que al realizar el análisis de pixeles, los diferentes tratamientos no presentaron gran variación entre ellos con excepción del tratamiento de NaBu.

Los tratamientos de NaBu + AOM (104 ± 3.0), Frijol + AOM (108 ± 6.0), y EP + AOM (117 ± 3.0) fueron los que presentaron la mayor expresión de la proteína p21. Los mismos tratamientos (NaBu + AOM, Frijol + AOM y EP + AOM) fueron los que presentaron menor expresión de Rb-P, (75 ± 3.0 , 65 ± 1.0 y 60 ± 1.0 , respectivamente) (Figura 35). Estos resultados sugieren inducción de arresto al ciclo celular ya que p21 es un inhibidor del complejo CDKs-ciclina evitando con ello la fosforilación de Rb y por consiguiente inhibición de la liberación del factor de transcripción E2F necesario para el seguimiento del ciclo celular (Zhang *et al.*, 2000). Por otra parte, Gope y Gope (1993) demostraron en células HT29 que la proteína Rb se mantiene en estado hiperfosforilado en presencia de butirato por inducción de p21, sin embargo, existen mecanismos alternos que utiliza el butirato para inducir arresto al ciclo celular (independientes de p21) como lo son la activación de miembros de la familia antiproliferativa APRO (Tob1), inhibición de *c-myc*, y de NF- κ B (Blottière *et al.*, 2003).

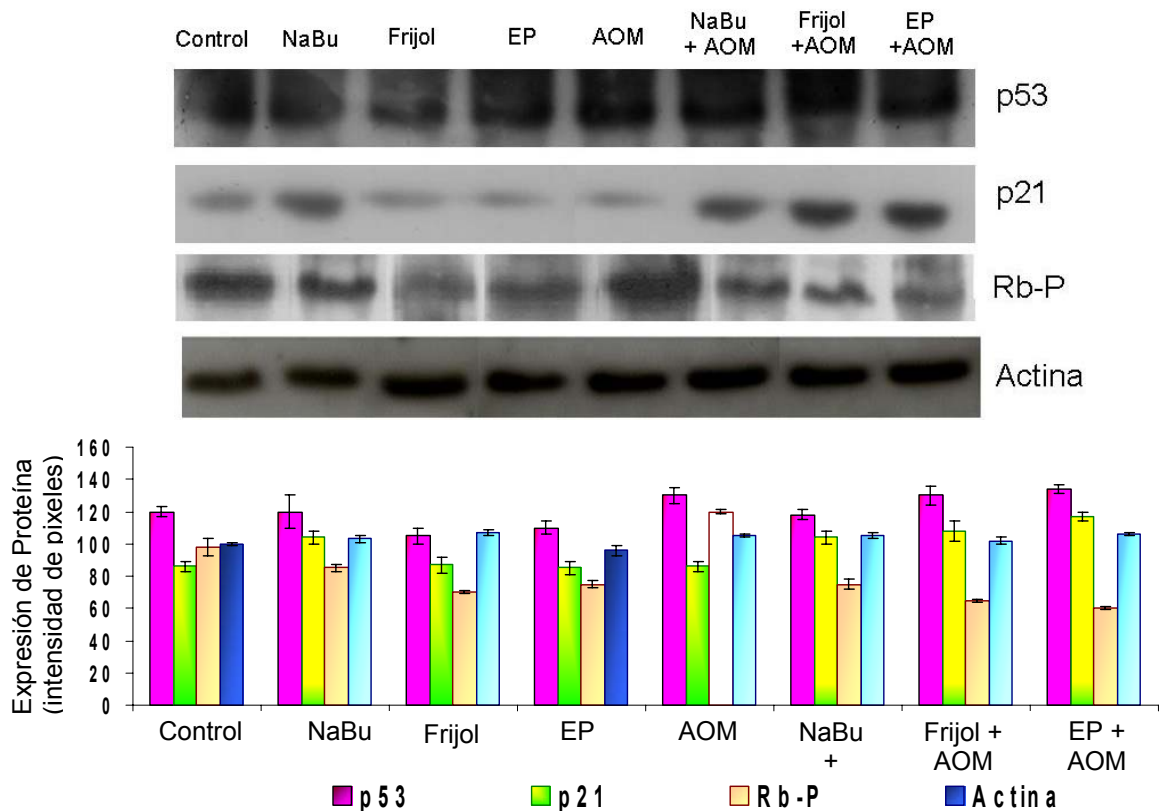


Figura 35. Efecto de los tratamientos sobre la expresión de las proteínas p53, p21 y Rb-P en la porción distal del colon.

AOM = Azoximetano, EP = Extracto de Polisacáridos, NaBu = Butirato de Sodio. Cada valor representa la media de 5 muestras de colon independientes \pm Desviación estándar. *(con respecto al control negativo) y *(con respecto al control positivo) indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ po la prueba de Dunnett's

En la figura 36, se muestra la expresión de las proteínas Bcl-2, Bax y Caspasa 3. En general todos los tratamientos mostraron baja expresión de Bcl-2, siendo el NaBu + AOM el más bajo (64 ± 1.0). Mientras que la expresión de Bax incremento en los tratamientos de NaBu + AOM fue de 120 ± 2.0 , Frijol + AOM de 125 ± 1.0 y EP + AOM de 130 ± 2.0 . Por otra parte, la expresión de Caspasa 3 fue de 147 ± 2.0 para Frijol + AOM y de 149 ± 2.0 para EP + AOM, lo cual sugiere un estado apoptótico vía mitocondrial inducido por los AGCC generados por estos tratamientos (frijol y EP), ya que de acuerdo con otros autores se ha reportado que el ácido butírico puede inducir una disminución en la

concentración de proteínas antiapoptóticas y un incremento en la concentración de proteínas proapoptóticas en modelos *in vitro* (Ruemmele *et al.*, 2003).

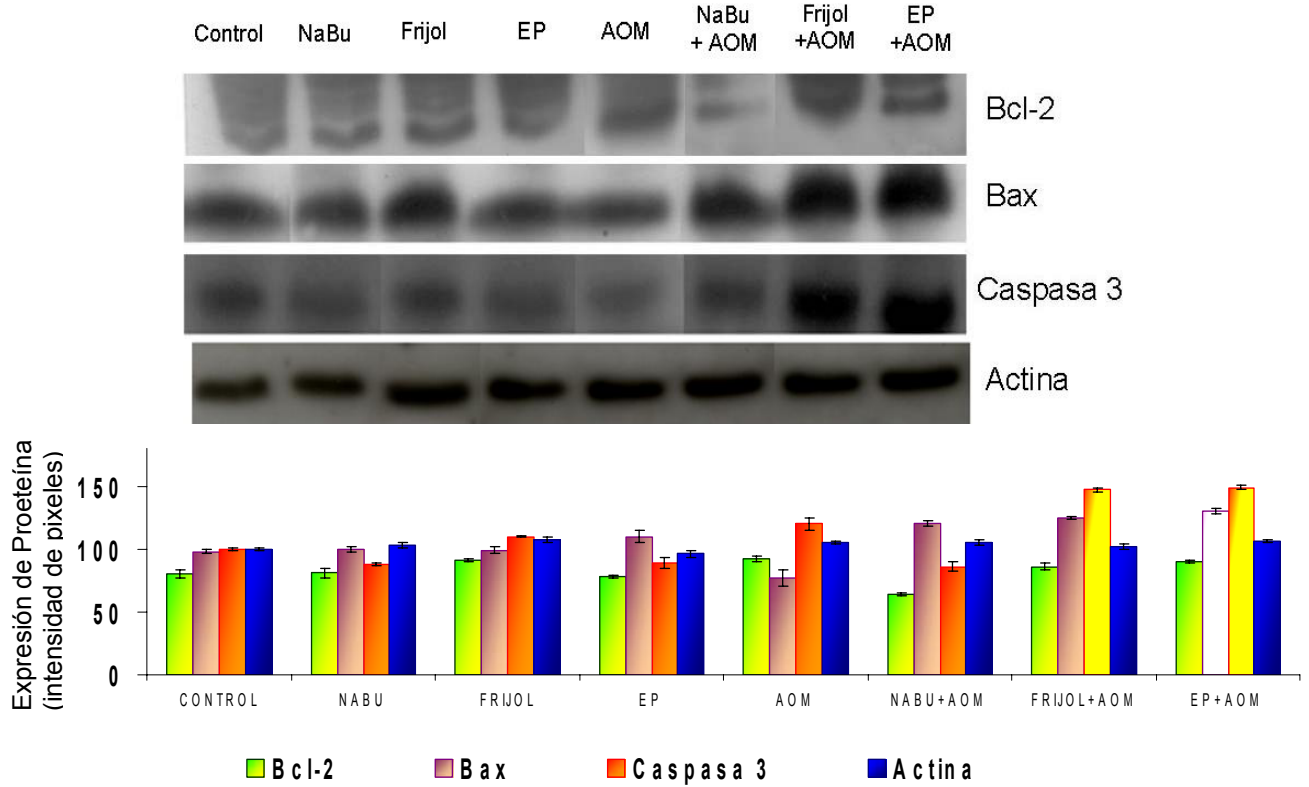


Figura 36. Efecto de los tratamientos sobre la expresión de las proteínas Bcl-2, Bax y Caspasa 3 en la porción distal del colon.

AOM = Azoximetano, EP = Extracto de Polisacáridos, NaBu = Butirato de Sodio. Cada valor representa la media de 5 muestras de colon independientes \pm Desviación estándar. *(con respecto al control negativo) y ***(con respecto al control positivo) indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ prueba de Dunnett's

Resumiendo los resultados de la parte distal del colon se tiene que el frijol y EP en presencia de AOM incrementan la expresión de la proteína p21 y una disminución en Rb-P, lo cual sugiere arresto al ciclo celular, mientras que la baja expresión de Bcl-2 y un aumento en la expresión de Bax y Caspasa 3 por estos mismos tratamientos, sugieren un estado apoptótico probablemente inducido por la presencia de los AGCC generados por la fermentación de estos tratamientos. Estos resultados se comportan de manera muy semejante a datos

reportados en la literatura para modelos *in vitro*. Cabe destacar que estos serían los primeros datos del efecto de los polisacáridos de frijol sobre la expresión de las proteínas evaluadas.

6. Segundo bioensayo

Se analizó el efecto del extracto de polisacáridos (EP) de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (se empleó la misma concentración que en el primer bioensayo), sobre el ciclo celular y la apoptosis. Una vez concluido el periodo experimental (7 semanas) los animales fueron sacrificados y se analizó la incidencia de FCA por técnicas histológicas (azul de metileno y Hematoxilina & Eosina), el efecto de los EP sobre el ciclo celular por citometría de flujo y el número de núcleos apoptóticos por técnica de TUNEL, respectivamente.

6.1 Análisis de la incidencia de fosas crípticas aberrantes (FCA) por azul de metileno y hematoxilina & eosina (H&E)

En la figura 37, se muestra el efecto del EP sobre la incidencia de FCA, se observa que el tratamiento de AOM presentó un mayor número de FCA en ambas zonas colónicas (12.42 ± 2.8 y 21.0 ± 3.25 proximal y distal respectivamente), con la tinción de azul de metileno (Figura 38). Cabe destacar que el EP a las condiciones probadas no induce FCA y que dicho extracto en combinación con AOM disminuyó el número de FCA de 12.42 ± 2.8 a 7 ± 2.16 para la zona proximal y de 21.0 ± 3.25 a 7.2 ± 2.95 para la zona distal.

Como se ha discutido anteriormente existen diversos trabajos que hablan acerca de los diversos compuestos presentes en los polisacáridos con efecto biológico como por ejemplo la fibra y el almidón resistente, ya que éstos han sido evaluados como sustancia pura, disminuyendo el número de FCA (Nakanishi *et al.*, 2003; Le-Leu *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta donde se tiene conocimiento no hay informes de polisacáridos provenientes de frijol común cocido y su influencia sobre las FCA, por lo que este trabajo sería considerado como un pionero al respecto.

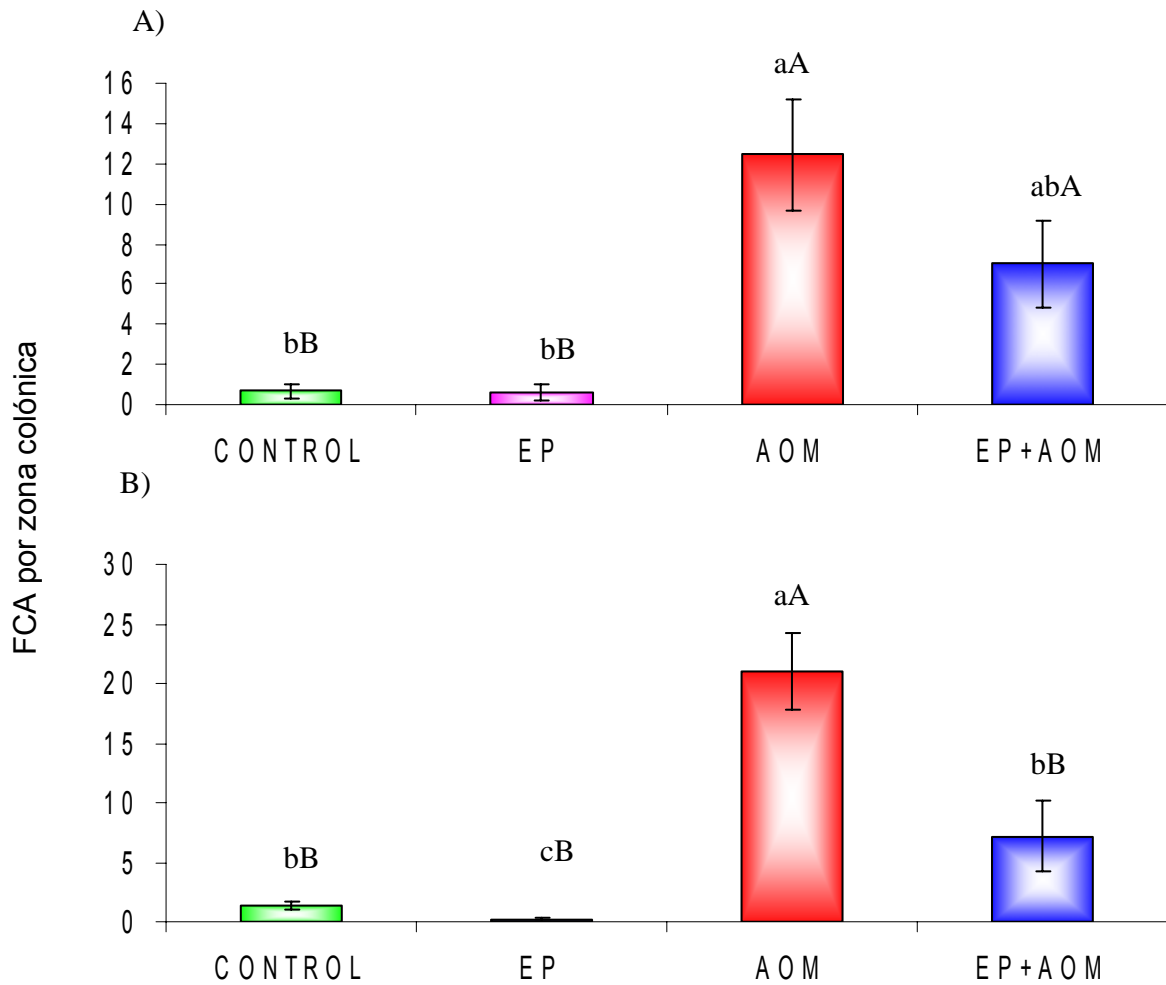


Figura 37. Efecto del extracto de polisacáridos (EP) sobre la inducción de fosas crípticas aberrantes (FCA) por análisis histológico con azul de metileno para ambas zonas colónicas. **A.** Zona colónica proximal, **B.** Zona colónica distal.

AOM = Azoximetano, EP = Extracto de Polisacáridos. Cada valor representa la media de 5 muestras de colon independientes \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ para la prueba de Tukey. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ para la prueba de Dunnett's

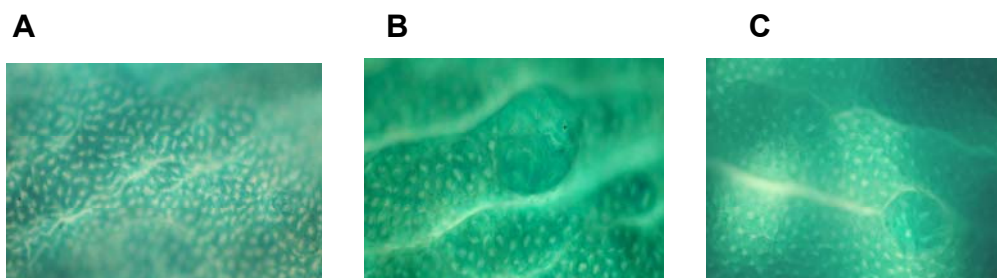


Figura 38. Fotografías representativas de fosas crípticas aberrantes (FCA) con azul de metileno. **A.** Control, **B.** AOM, **C.** EP + AOM

Otra técnica histológica para la identificación de las FCA fue la tinción con H&E que permite la visualización del núcleo y el citoplasma de las células colónicas (Figura 39). En la figura 40, se puede observar el efecto de los polisacáridos sobre las FCA con tinción de H&E, para ambas zonas colónicas mostrándose el promedio de los cortes horizontales y longitudinales por cada tratamiento.

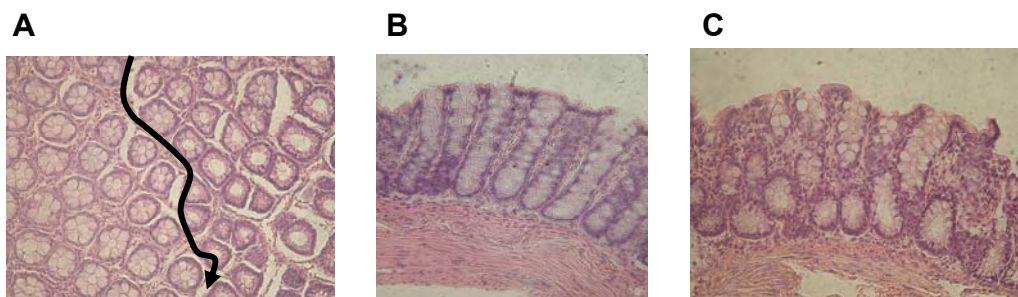


Figura 39. Fotografías representativas de fosas crípticas aberrantes (FCA) con hematoxilina & eosina (H & E). **A.** Corte horizontal con tejido normal y fosas crípticas aberrantes, **B.** Corte longitudinal con tejido normal, **C.** Corte longitudinal con fosas crípticas aberrantes.

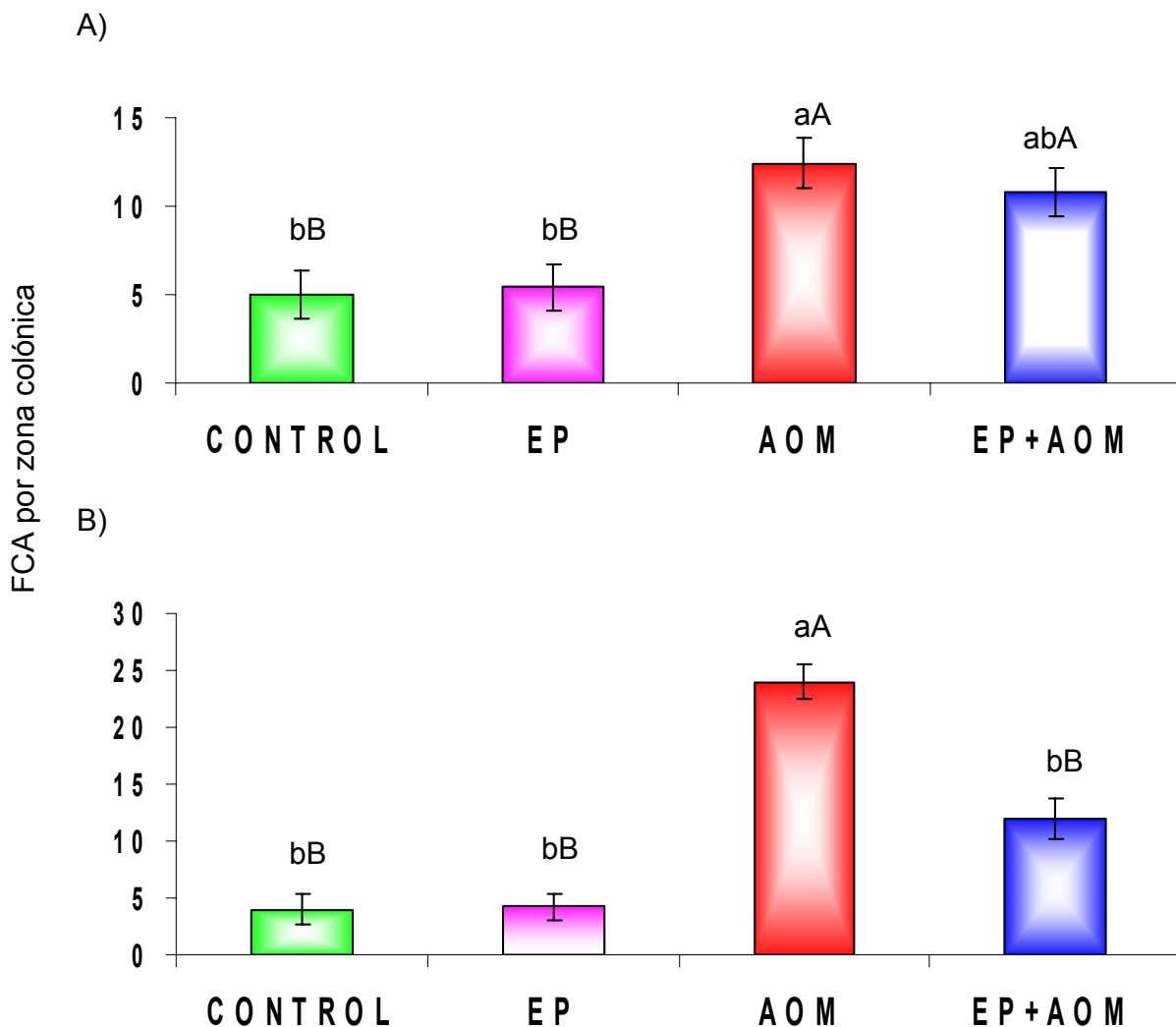


Figura 40. Efecto del extracto de polisacáridos (EP) sobre la inducción de fosas crípticas aberrantes (FCA) por análisis histológico con Hematoxilina & Eosina (H & E) para ambas zonas colónicas. **A.** Zona colónica proximal **B.** zona colónica distal.

AOM = Azoximetano, EP = Extracto de Polisacáridos. Cada valor representa la media de 5 muestras de colon independientes con 20 cortes cada uno \pm Desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ para la prueba de Tukey. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ para la prueba de Dunnett's

El tratamiento de EP + AOM presenta una disminución en el número de FCA tanto para la zona proximal como para la distal, sin embargo solo en la

distal fue estadísticamente diferente con respecto al control de AOM (de 24 ± 1.6 a 12 ± 7.2), misma tendencia que se observó con la tinción de azul de metileno, lo cual concuerda con los datos obtenidos en el primer bioensayo, donde se observó que la incidencia de FCA en la zona distal del colon disminuye en comparación del tratamiento de AOM.

Estos datos sugieren que el EP tiene un efecto inhibitorio sobre la formación de FCA principalmente en la zona distal del colon, posiblemente resultado de la fermentación de los compuestos presentes en el EP por las bacterias colónicas, ya que se ha demostrado que en la zona distal existe un mayor tiempo de interacción de estos compuestos (AGCC) con los colonocitos de la zona (Nugent *et al.*, 2001). Por otra parte es importante recalcar que el EP contiene compuestos fenólicos a los que les ha atribuido por ejemplo propiedades antimutagénicas (Aparicio-Fernández *et al.*, 2005), además de ser sustratos para las bacterias colónicas ya que gran parte de estos compuestos fenólicos llegan al colon donde pueden ser fermentado generando un aporte de AGCC. Dentro de los compuestos fenólicos presentes en el frijol y, por consiguiente en el EP, se encuentran los flavonoides como la quercetina a la que se ha relacionado con apoptosis y reducción de FCA (Volate *et al.*, 2005), esta serie de compuestos pueden estar participando en el efecto quimioprotector.

6.2. Efecto de los polisacáridos de frijol común sobre el ciclo celular por citometría de flujo

El cáncer de colon se caracteriza por un aumento en la proliferación celular en las etapas tempranas de dicho cáncer, este grado de proliferación celular puede cuantificarse por el número de células que se encuentran en la fase de replicación utilizando el recuento por citometría de flujo (CMF) o bien determinar el contenido de ADN en los diferentes grupos celulares utilizando la misma técnica.

En la figura 41, se muestra los diferentes fases del ciclo celular, así como el índice de proliferación determinado por la sumatoria de la fase S + la fase G₂ de los tejidos de las zonas proximal y distal.

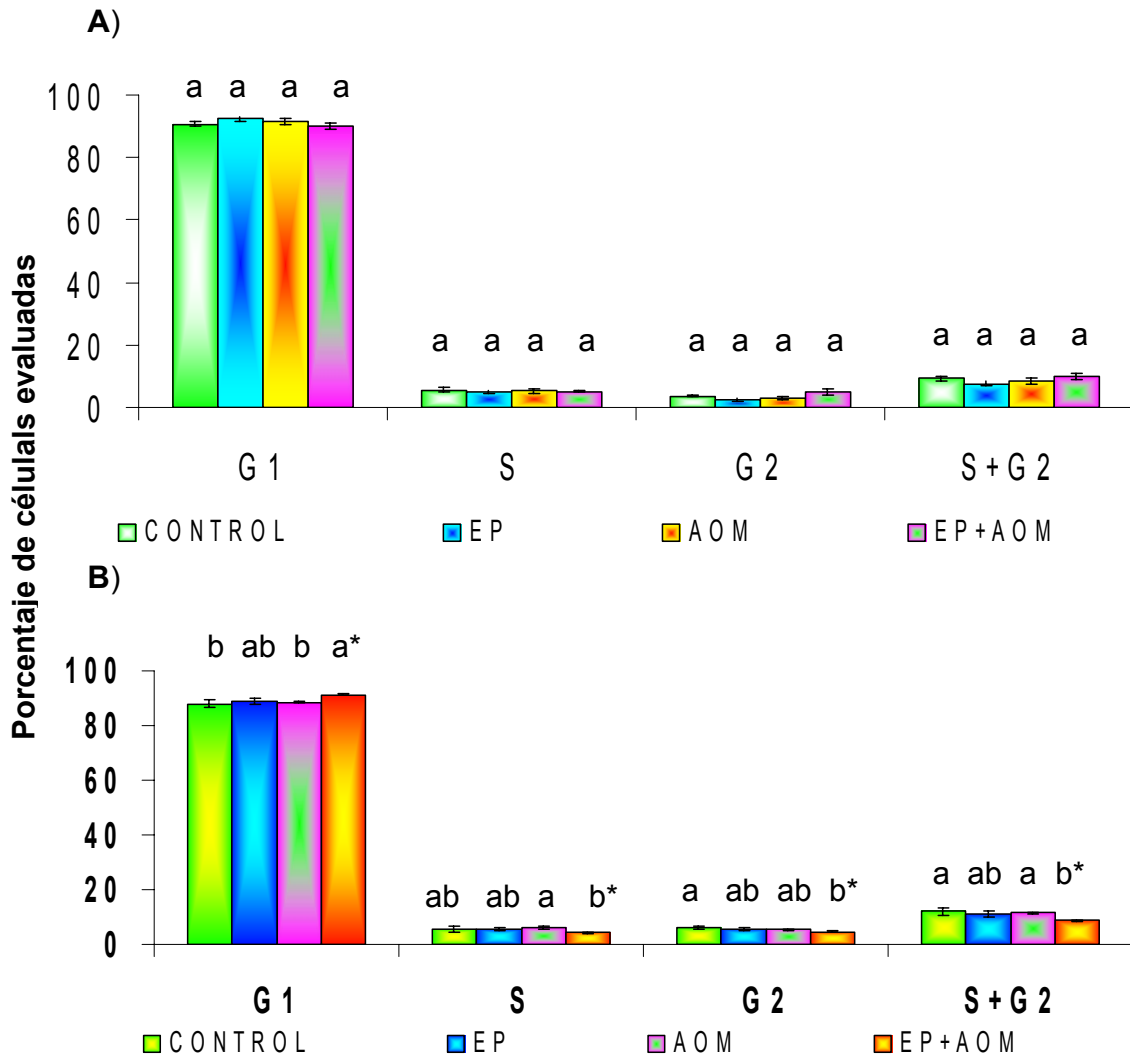


Figura 41. Efecto del extracto de polisacáridos (EP) sobre las fases del ciclo celular e índice de proliferación celular por citometría de flujo. **A.** Zona proximal, **B.** Zona distal.

Promedio de las diferentes fases del ciclo celular e índice de proliferación celular (IPC= S + G₂) ± Error estándar. EP = Extracto de Polisacáridos, AOM = Azoximetano
 Letras diferentes indican diferencia estadística en base a prueba de Tukey $\alpha= 0.05$
 * Diferencia significativa prueba de Dunnett's $\alpha= 0.05$

En la zona proximal no se observó diferencia estadística entre los tratamientos en ninguna de las diferentes fases del ciclo celular, así como en el índice de proliferación. En la zona distal se observó diferencia estadística en el tratamiento de EP + AOM con respecto al control positivo de AOM en las diferentes fases del ciclo celular. En la fase S, el tratamiento de EP + AOM presenta un incremento en el número de células en fase G₁ (91.17 ± 0.27) con respecto a AOM (88.47 ± 0.36), mientras que en el resto de las fases es posible apreciar una disminución del número de células en fase S y G₂, así como en el índice de proliferación celular (de 11.52 ± 0.36 a 8.82 ± 0.28 para AOM y EP + AOM, respectivamente).

Recapitulando y de acuerdo a lo descrito en los incisos 5.3 y 5.4.1, el frijol común y sus polisacáridos pueden ser utilizados como sustrato por las bacterias del colon generando AGCC de los cuales al ácido butírico principalmente se le ha relacionado con arresto al ciclo celular principalmente en modelos *in vitro*. Por ejemplo Blottière *et al.* (2003) demostraron que concentraciones de 5 mM de butirato de sodio (NaBu) inducen arresto al ciclo celular en la fase G₁ en células HT-29, por otra parte Hatayama *et al.* (2007) demostraron que una concentración de 1-2 mM de NaBu inhibe la proliferación de células LS174T (células de cancer de colon humanas) por detección del 90% en la fase G₁ del ciclo celular. En células HeLa, el NaBu a concentraciones de 5 mM induce un aumento en la fase G₂ (Derjuga *et al.*, 2001). Sin embargo, el ácido butírico no es el único AGCC que puede inducir arresto al ciclo celular, el ácido acético y el ácido propiónico modifican el pH y de esta manera pueden inducir arresto al ciclo celular principalmente en la fase G₂/M en células HT-29 (Lan *et al.*, 2007).

6.3 Análisis de núcleos apoptóticos por TUNEL

En la figura 42, se muestra el efecto del EP sobre el número de núcleos apoptóticos de cortes horizontales y verticales de ambas zonas colónicas por la técnica de TUNEL, mismo que se ejemplifica en la figura 43.

El tratamiento de EP + AOM presenta mayor número de núcleos apoptóticos en ambas zonas colónicas comparados con el tratamiento de AOM (Figura 42). Por otra parte el tratamiento de AOM presenta un ligero incremento en el número de núcleos apoptóticos con respecto a los tratamientos Control y EP sin presentar diferencia estadística. Es importante recordar que el epitelio colónico se regenera cada 2 o 3 días y que la zona distal sufre un proceso de descamación mayor que la zona proximal este es posiblemente la razón de la presencia de núcleos apoptóticos en ambas zonas del colon. Además, los resultados obtenidos en esta parte experimental concuerdan con los resultados observados en el análisis molecular (expresión de genes y proteínas), donde se apreció un aumento en la concentración de la proteína caspasa 3 en ambas zonas del colon, lo que sugiere que el EP en presencia de AOM induce apoptosis a nivel del colon.

Como se ha venido mencionando, el EP contiene compuestos que llegan al colon sin ser completamente degradados, estos incluyen los compuestos fenólicos, fibra, almidón resistente y oligosacáridos, que pueden ser fermentados por las bacterias del colon generando AGCC entre ellos el ácido butírico que se ha relacionado con apoptosis (Chen *et al.*, 2003). Investigadores como Li and Elsasser (2005) han demostrado que al tratar células epiteliales de riñón de bovino Madin-Darby (MDBK) con 10 mM de NaBu después de 24 horas de tratamiento se obtiene un 38% de células apoptóticas por el método de TUNEL, sugiriendo que el proceso de inducción de muerte es dependiente de la inhibición de la acetilación de histonas y la síntesis de nuevas proteínas como lo ha reportado Chen *et al.* (2003).

Recapitulando los datos obtenidos se puede sugerir que el EP disminuye el número de FCA utilizando diversos mecanismos de acción entre los que se encuentran inducción de arresto al ciclo celular y apoptosis (Figura 44).

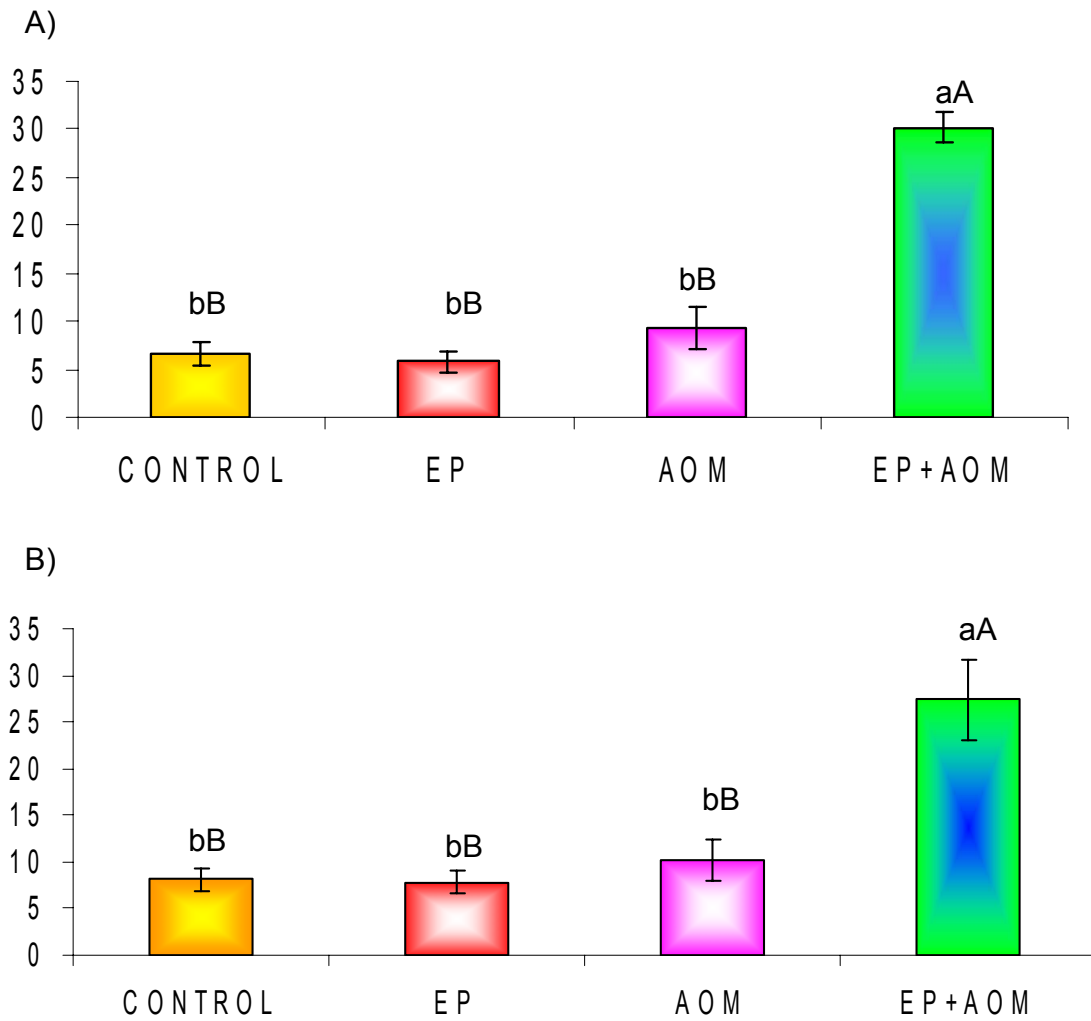
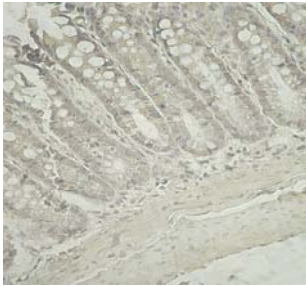


Figura 42. Efecto del extracto de polisacáridos (EP) sobre el número de núcleos apoptóticos por la técnica de TUNEL. **A** Zona proximal, **B** Zona distal.

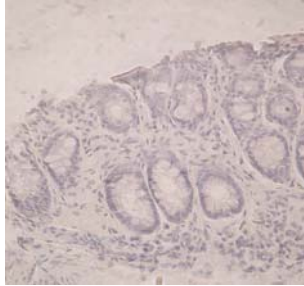
Promedio de los diferentes cortes horizontal y vertical \pm Error estándar. AOM = Azoximetano, EP = Extracto de Polisacáridos. Cada valor representa la media de 5 muestras de colon independientes con 20 cortes cada uno. Letras diferentes indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ para la prueba de Tukey. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística con $\alpha=0.05$ para la prueba de Dunnett's

1)

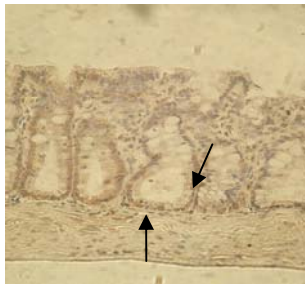
A



B

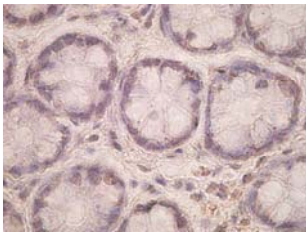


C

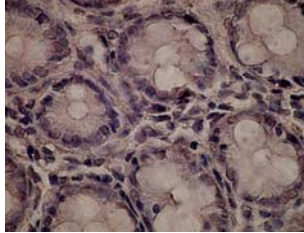


2)

A



B



C

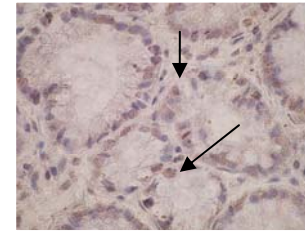


Figura 43. Fotografías representativas de núcleos apoptóticos por técnica de TUNEL. 1) Cortes longitudinales: **A**. Control **B**. AOM **C**. EP + AOM. 2) Cortes horizontales: **A**. Control **B**. AOM **C**. EP + AOM.

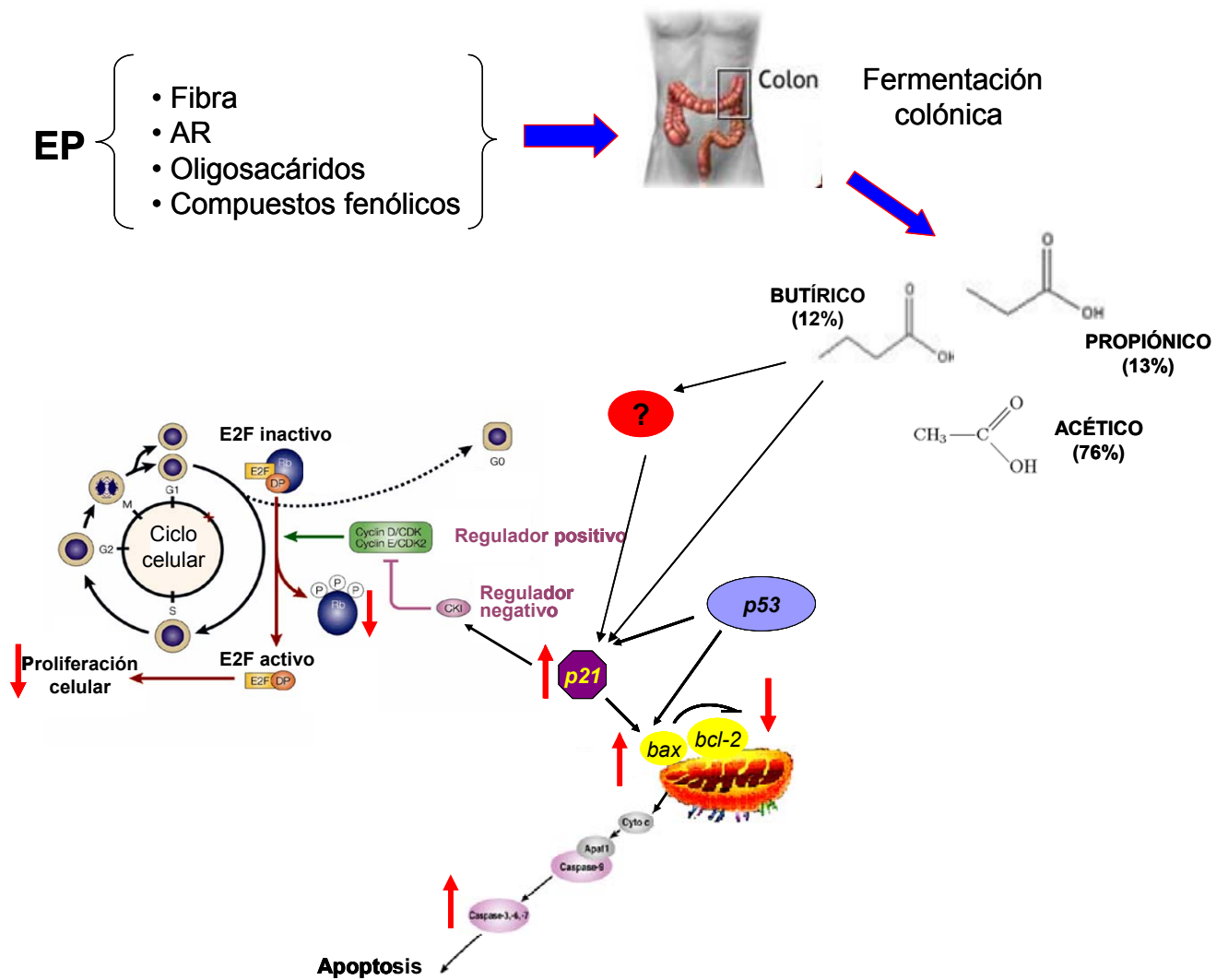


Figura 44. Esquema del posible mecanismo de acción del extracto de polisacáridos (EP) sobre el estadio temprano de cáncer de colon.

- ↓ Representa una disminución en la expresión
- ↑ Representa un incremento en la expresión

VIII. CONCLUSIONES

1. El frijol común (*Phaseolus vulgaris*L.) variedad Negro 8025 es una buena fuente de polisacáridos y compuestos fenólicos.
2. Los polisacáridos y compuestos fenólicos del frijol común (*P vulgaris* L) variedad Negro 8025 cocido son un buen sustrato para las bacterias colónicas generadoras de ácidos grasos de cadena corta.
3. El EP disminuye el número de FCA principalmente en la zona distal del colon.
4. Los resultados obtenidos permiten sugerir que el mecanismo de acción del EP sobre el estadio temprano de cancer de colon es una combinación de arresto al ciclo celular e inducción de apoptosis, lo cual se sustenta por:
 - Induce la expresión del gen *p21* de forma independiente de *p53*, e induce la expresión de genes apoptóticos como *bax* y *caspasa 3*.
 - Influye sobre la concentración de proteínas involucradas en arresto al ciclo celular generando mayor y menor expresión de *p21* y *Rb-P* respectivamente, y apoptosis por un aumento en la expresión de *Bax* y *Caspasa 3*
 - Genera arresto al ciclo celular en la fase G_1 y decrece el índice de proliferación celular.
 - Presenta un mayor número de núcleos apoptóticos en presencia de AOM.

Los resultados obtenidos sugieren que el EP es una buena fuente de componentes bioactivos (fibra total dietética y compuestos fenólicos), implicados en la prevención de cáncer de colon. El mecanismo de acción del EP sobre el estadio temprano de cáncer de colon resultó ser una combinación de arresto al ciclo celular e inducción de apoptosis.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Adams JM** y Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cellular survival. *Science*. **281**: 1322-1326.
- Albert B.**, Bray D., Lewis J., Rark M., Rodert K., Watson J. 2000. Biología Molecular de la Célula. 3ª ed. Omega, Mexico. Pp 1345-1347, 1365,1378-1382.
- Alfonzo-González GC.** 2000. Efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de fibra dietética total, soluble e insoluble en algunas leguminosas. *Arch Latinoamer Nutr*. **50**(3): 281-285.
- Alnemri ES.**, Livingston DJ., Nicholson DW., Salvesen G., Thornberry NA., Wong WW., Yuan, J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. **87**: 171.
- Aloysius-Lambertus AS.** 2001. Red meet and colon cancer: a possible role for heme. Tesis Doctoral.
- Alrawi SJ.**, Schiff M., Carroll RE., Dayton M., Gibbs JF., Kulavlat M., Tan D., Berman K., Stoler DL., Anderson GR. 2006. Aberrant crypt foci. *Anticancer Res*. **26** (1A): 107-119.
- Ames BN.**, Shigeaga MK., Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of ageing. *Proc Natl Acd Sci*. **90**: 7915-7922.
- Andlauer W.**, Kolb J., Furst P. 2000. A novel efficient method to identify beta-glucuronidase activity in rat small intestine. *J Parenter Enteral Nutr*. **24**(5): 308-310.
- Aparicio-Fernández X.**, Manzo-Bonilla L., Loarca-Piña GF. 2005. Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans *Phaseolus vulgaris* against aflatoxin B₁. *J Food Sci*. **70**: S73-78.
- Arango PMC.**, Llanes FL., Díaz RT., Faxas GME. 1997. La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. *Rev Cubana Oncol*. **13**(2): 126-134.
- Asp NG.** 1992. Resistant starch. Proceedings from the second plenary meeting of EURESTA. *E J Clin Nutr*. **46** (Suppl. 2), S1.
- Association of Oficial Analytical Chemists.** 2002. Official Methods of Analysis. 17th ed. AOAC, Arlington, VA. Método 920.105, 925.23, 945.46, 985.29, 991.43.

- Atuma C.**, Strugala V., Allen A., Hola L. 2001. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. *Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol)*. **280**: G922.
- Barrera H.**, Martínez S., Ortíz R. 2003. Diagnóstico molecular del cáncer. *Rev Invest Clin*. **55**(2): 128-137.
- Barrera-Ramírez LM.**, Drago-Serrano ME., Pérez-Ramos J., Zamora AC., Gómez-Arroyo F., Sainz Espuñes TR., Mendoza-Pérez F. 2004. Citometría de flujo: un vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. **17**(4): 42-55.
- Barshishat M.**, Polak-Charcon S., Schwartz B. 2000. Butyrate regulates E-cadherin transcription, isoform expression and intracellular position in colon cancer cells. *Br J Cancer*. **82**(1): 195-203.
- Batlle E.**, Henderson JT., Beghtel H., Van den Born MM., Sancho E., Huls G., Meeldijk J., Robertson J., Van de Wetering M., Pawson T., Clevers H. 2002. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*. **111**: 251-263.
- Bednar G.**, Patil A., Murray S., Grieshop C., Merchen N., Fahey G. 2001. Starch and fiber fractions in selected foods and feed ingredients affect their small intestine digestibility and fermentability and their large bowel fermentability and their large bowel fermentability *in vitro* in a canine modelo. *J Nutr*. **131**: 276-286.
- Behrens J.** 1992. Cell adhesion in invasion and metastasis. *Semin Cell Biol*. **3**:169-178.
- Berggren, AM.**, Björck, IM., Nyman, EM., Eggum, BO. 1993. Short chain fatty acid content and pH in caecum of rats given various sources of carbohydrates. *J Sci Food Agric*. **63**: 397-406.
- Biggs AC.**, Kapricka., Lundgren L. 2000. Biología: La dinámica de la vida. McGraw-Hill (Ed), pp: 277-278.
- Binder C.**, Marx D., Overhoff R., Binder L., Schauer A., Hiddemann W. 1995. Bcl-2 protein expression in breast cancer in relation to established prognostic factors and other clinicopathogenical variables. *Ann Oncol*. **6**: 1005-1010.

- Bird RP.** 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett*; **30**: 147-151.
- Bird RP.** 1995. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.* **93**: 55-71.
- Bird RP.** y Good CK. 2000. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Tox Lett.* **112-113**: 395-402.
- Bird RP.,** McLellan E., Bruce WR. 1989. Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the study of the role of dietary components in the etiology of colon cancer. *Cancer Surveys.* **8**: 189-198.
- Bird, AR.,** Hayakawa T., Marsono Y., Gooden JM., Record IR., Correll RL., y Topping DL. 2000. Coarse brown rice increases fecal and large bowel short chain fatty acids and starch but lowers calcium in the large bowel of pigs. *J Nutr.* **130**: 1780-1787.
- Birt DF.,** Shull JD., Yaktine A. 1999. Chemoprevention of cancer. Modern Nutrition in Health and Disease Baltimore: Williams and Wilkins.
- Björck IM.,** Granfeldt Y., Liljerberg H., Tovar J., Asp NG. 1994. Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates. *Am J Clin Nutr.* **59**: 699S-705S.
- Blanco A.** y Bressani R. 1991. Biodisponibilidad de aminoácidos en el frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Arch Latinoamer Nutr.* **41**:38-51.
- Bland PW.** y Britton DC. 1981. Colonic lymphoid tissue and its influence on tumor induction in dimethylhydrazine-treated rats. *Br J Cancer.* **44**:275-276.
- Blottière HM.,** Buecher B., Galmiche JP., Cherbut C. 2003. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proceed Nutr Soc.* **62**: 101-106.
- Boise LH.,** González-García M., Postema CE., 1993. Bcl-X and Bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell.* **74**: 597-608.
- Boise LH.,** Gottschalk AR., Quits J., Thompson CB. 1995. Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation. *Curr Top Microbiol Immunol.* **200**: 107-121.
- Bordonaro M.,** Mariadason JM., Aslam F., Heerdt BG., Augenlicht LH. 1990. Butyrate induced cell cycle arrest and apoptotic cascade in colonic carcinoma cells:

modulation of the B-catenin-Tcf pathway, and concordance with effects of sulindac and trichostatin, but not curcumin. *Cell Growth Differ.* **10**: 713-720.

Bourdon I., Olson B., Backus R., Richter O., Oavis R., Schneeman B. 2001. Beans, as a source of dietary fiber, increase cholecystokinin and apolipoprotein B48 response to test meal in men. *J Nutr.* **131**: 1485-1490.

Bravo A., Afonso J., Medina V., Pérez J., Lorenzo N., Fernández MV., González F. 2000. Butirato y carcinogénesis colorectal. *Cir Esp.* **68**: 57-64.

Bravo L. 1998. Polyphols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* **56**: 317-333.

Bravo L., Siddhuraju P., Saura-Calixto F. 1998. Effect of various processing methods on the *invitro* starch digestibility and resistant starch content of indian pulses. *J Agric Food Chem.* **46**: 4667-4674.

Brenes A., Slominski BA., Marquardt RR., Guenter W., Viveros A. 2003. Effect of enzyme addition on the digestibilities of cell wall polysaccharides and oligosaccharides from whole, dehulled, and ethanol-extracted white lupins in chickens. *Poul Sci.* **82**:1716-1725.

Buecher B., Thouminot C., Menanteau J., Bonnet C., Jarry A., Heymann MF., Cherbut C., Galmiche JP., Blottière HM. 2003. Fructooligosaccharide associated with celecoxib reduces the number of aberrant crypt foci in the colon of rats. *Reprod Nutr Dev.* **43**: 347-356.

Caderni G., Luceri C., De Filippo C., Salvadori M., Giannini A., Tessitore L., Dolara P. 2001. Slow-release pellets of sodium butyrate do not modify azoxymethane (AOM) induced intestinal carcinogenesis in F344 rats. *Carcinogenesis.* **22**(3): 525-527.

Caderni G., Luceri C., Lancioni L., Tessitore L., Dolara P. 1998. Slow-release pellets of sodium butyrate increase apoptosis in the colon of rats treated with azoxymethane, without affecting aberrant crypt foci and colonic proliferation. *Nutr Cancer.* **30**: 175-181.

Campbell, JM., Fahey GC. Jr., Wolf BW. 1997. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutr.* **127**: 130-136.

- Cardador-Martínez A.**, Castaño-Tostado E., Loarca-Piña GF. 2002a. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L) against aflatoxin B₁. *Food Addit Contam.* **19**(1):62-9.
- Cardador-Martínez A.**, Loarca-Piña GF., Oomah BD. 2002b. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *J. Agric Food Chem.* **50**: 6975-80.
- Carlsson NG.**, Karlsson H., Sandberg AS. 1992. Determination of oligosaccharides in food diets and intestinal contents by high-temperature gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* **40**: 2404-2412.
- Casciola-Rosen L.**, Nicholson DW., Chong T., Rowan KR., Thornberry NA., Miller DK., Rosen A. 1996. Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J. Exp Med.* **183**: 1957-1964.
- Casimiro C.** 2002. Factores etiopatogénicos en el cáncer colorrectal. *Nutr Hosp.* **3**: 128-138.
- Cassidy A.**, Bingham SA., Cummings JH. 1994. Starch intake and colorectal cancer risk: and international comparison. *Br J Cancer.* **69**: 937-942.
- Castellanos JZ.**, Guzmán-Maldonado H., Jiménez A., Mejía C., Muñoz-Ramos JJ., Acosta-Gallegos JA., Hoyos G., López-Salinas E., González-Eguiarte D., Salinas-Pérez R., González-Acuña J., Muñoz-Villalobos JA., Fernández-Hernández P., Cáceres B. 1997. Hábitos preferenciales de los consumidores de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. *Arch Latinoamer Nutr.* **47**(2): 163-167.
- Cecconi F.** 1999. Apaf-1 and the apoptotic machinery. *Cell Death Differ.* **6**(11): 1087-98.
- Cecconi F.** y Gruss P. 2001. Apaf-1 in developmental apoptosis and cancer: how many ways to diet?. *Cell Mol Life Sci.* **58**(11): 1688-97.
- Celik C.**, Lewis DA., Mittleman A. 1983. Induction of colon mucosal beta-glucuronidase production as a mechanism for 1,2-dimethylhydrazine colon carcinogenesis. *J Surg Oncol.* **24**:209-211.
- Celleno L.**, Tolaini MV., D'amore A., Perricone NV., Preuss HG. 2007. A dietary supplement containing standardized *Phaseolus vulgaris* extract influences body composition of overweight men and women. *Int J Me Sci.* **4** (1): 45-52.

- Clark J.**, Edwards S., Megan J., Flohr P., Gordon T., Maillard K., Giddings I., Brown C., Bagherzadeh A., Campbell C., Shipley J., Wooster R., Cooper SC. 2002. Identification of amplified and expressed genes in breast cancer by comparative hybridization onto microarrays of randomly selected cDNA clones. *Genes Chrom Cancer*. **34**: 104-114.
- Clasificación de la Unión Europea (UE) y de la Agencia Internacional para Investigación sobre el cáncer (IARC).** Directiva 1999/38/CE, D.O.C.E L138, 1.6. 1999.
- Clayson DB.** 2000. Toxicological carcinogenesis. Lewis Publishers (Ed), pp: 2-5.
- Clifford AH.**, Cuppett SL. 2000. Review: Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **80**, 1063– 1072.
- Cohen J.** 1993. Apoptosis. *Immunol*. **14**: 126.
- Cook NC.**, Samman S. 1996. Review: Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **7**, 66–76.
- Coon CN.**, Leske KL., Akavanichan O., Cheng TK. 1990. Effect of oligosaccharide free soybean meal on true metabolizable energy and fiber digestion in adult roosters. *Poult Sci*. **69**:787-793.
- Corpet DE.** y Tache S. 2002. Systematic review of preclinical rodent's studies: Database of effective agents and diets ranked by potency.
- Costa de Oliveira A.**, Silva Queiroz K., Machado S., Carraro F. 2001. O processamento domestico do feijao-comun ocasionou uma reducao nos fatores antinutricionais fitato e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulencia rafinose, estaquiose e verbascose. *Arch Latinoamer Nutr.* **51**: 276-283.
- Cryns V.** y Yuan J. 1998. Porteases to die for. *Genes Dev*. **12**: 1551-1570.
- Cumming JH.**, Macfarlane GT., Englyst H. 2001. Prebiotic, digestion and fermentation. *Am. J Clin Nutr*. **73**: 415S-420S.
- Cummings JH.** 1984. Colonic absorption: the importance of short chain fatty acids in man. *Scand J Gastroenterol*. **93**: 89-99.
- Cummings JH.**, Beatty ER., Kingman SM., Bingham SA., Englyst HN. 1996. Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *Br J*

Nutr. **75**: 733-747.

Charney AN., MICIP L., Egnor RW. 1998. Nonionic diffusion of short-chain fatty acids across rat colon. *Am J Physiol.* **274**: G518-G524.

Chau BN. y Wang JY. 2003. Coordinated regulation of life and death by RB. *Nature Rev. Cancer.* **3**:130-138.

Chen JS., Faller DV., Spanjaard RA. 2003. Short-chain-fatty acid inhibitors of histone deacetylases: Promising anticancer therapeutics? *Curr Cancer Drug Targets.* **3**: 219-236.

Cheng EH., Kirsch DG., Clem RJ., Ravi R., Kastan MB., Bedi A., Ueno K., Hardwick JM. 1997. Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-X_L. *Nature.* **379**: 554-556.

Daniels DL., Spink Eklof K., Weis WI. 2001. *β-catenina*: molecular plasticity and drug design. *Biochem Sci.* **26**: 672–678.

De Almeida Costa GE., da Silva Queiroz-Monici K., Pissini Machado RSMP., Costa de Oliveira A. 2006. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry.* **94**: 327-330.

De Deckere EAM., Kloots WJ., Van Amelsvoort JMM. 1995. Both raw and retrograded starch decrease serum triacylglycerol concentration and fat accretion in the rat. *Br J Nutr.* **73**: 287-289.

de la Rosa JE., Díaz B., Sánchez N. 2000. Muerte celular programada: Un proceso clave en fisiología y patología. *Ciencia al día internacional.* **3** (3): 1-13.

Deasy JM., Steele G., Ross DS., Lahery SJ., Wilson RE., Madar J. 1983. Gut-associated lymphoid tissue and dimethylhydrazine-induced colorectal carcinoma in the Wistar/Furth rat. *J Surg Oncol.* **24**:36-40. *J Biol Chemist.* **276** (4): 37815-37820.

Derjuga A., Richard C., Crosato M., Wright PS., Chalifour L., Valdez J., Barraso A., Crissman HA., Nishiola W., Bradbury EM., Th^ng JPH. 2001. Expression of p21^{waf1/ip1} and cyclin D1 is increased in butyrate-resistant HeLa cells. *J Biol Chem.* **276**(41): 37815-20

- Deschner EE.**, Ruperto JF., Lupton JR., Newmark HL. 1990. Dietary butyrate (tributyrate) does not enhance AOM-induced colon tumorigenesis. *Cancer Lett.* **52**: 79-82.
- Desphande SS.** y Cheryan M. 1985. Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *J Food Sci.* **52(2)**: 332-334.
- Desphande SS.** y Cheryan M. 1987. Evaluation of vanillin Assay for Tannin Analysis of Dry Beans. *J of Food Sci.* **50**: 905-910.
- Díaz RE.** 1999. Revisión en cáncer Vol. 1. ARAN (Ed), pp: 341-380.
- Díaz T.**, Faxas M., Arango M. 1998. Factores etiopatogénicos y moleculares en la génesis del cáncer. *Rev Cubana Oncol.* **14(1)**: 42-50.
- Díaz-Batalla L.**, Widholm JM., Fahey GC., Castaño-Tostado E. and Paredes-López O. 2006. Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* **54**: 2045-2052.
- Dong M.**, He X., Liu RH. 2007. Phytochemicals of black bean seed coats: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidative activities. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* **55**, 6044–6051.
- Dorszewska J.** y Adamczewska-Gonczewicz Z. 2004. Oxidative damage to DNA, p53 gene expression and p53 protein level in the process of aging in rat brain. *Res Physiol Neurobiol.* **139**: 227-236.
- Dubois M.**, Gilles KA., Hamilton JK., Rebers PA., Smith Fred. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytic Chem.* **28**: 350-6.
- Duval A.** y Hamelin R. 2002. Genetic instability in human mismatch repair deficient cancers. *Ann Genet.* **45**: 71-5.
- el-Deiry WS.**, Tokino T., Waldman T., Oliner JD., Velculescu VE., Burrell M., Hill DE., Healy E., Rees JL., Hamilton SR. 1995. Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* **55**: 2910-9.
- Englyst HN.** y Cummings JH. 1987. Digestion of polysaccharides of potato in the small intestine of man. *Am J Clin Nutr.* **45**: 423-431.
- Englyst HN.**, Kingman SM., Cummings JH. 1992. Clasificación and measurement of

- nutritionally important starch fractions. *J Clin Nutr.* **46**: S33-S50.
- Enoch T.** y Nurse P. 1990. Mutation of fission yeast cell cycle control genes abolishes dependence of mitosis on DNA replication. *Cell.* **60**: 665-673.
- Faisant N.,** Gallant DJ., Bouchet B., Champ M. 1995. Banana starch breakdown in the human small intestine studied by electron microscopy. *E J Clin Nutr.* **49**: 98-104.
- Fernández, Y.,** Gu B., Martínez A., Torregrosa A., Sierra A. **2002.** "Inhibition of Apoptosis in Human Breast Cancer Cells: Role in Tumor Progression to the Metastatic State. *Int. J. Cancer.* 101: 317-326.
- Fiala ES.,** Kulakis C., Christiansen G., Weisburger JH. 1978. Inhibition of the metabolism of the colon carcinogen, azoxymethane, by pyrazole. *Cancer Res.* **38**:4515-1521.
- Folkman J.** 2002. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* **29**:15-18.
- Folkman J.** y Hanahan D. 1991. Expression of the angiogenic phenotype during development of murine and human cancer. In *Orig Hum Cancer: A Comprehensive Review.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Fu M.,** Wang Ch., Li Z., Sakamaki T., Pestell RG. 2004. Cyclin D1 as transcriptional regulator en cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology.* **10**: 1210.
- Fung YK.,** T'Ang A., Murphree AL., Zhang FH., Qiu WR., Wang SW. 1993. The Rb gene suppresses the growth of normal cells. *Oncogene.* **8**: 2659-2672.
- Galvez-Ranilla L.,** Genovese MI., Lajolo FM. 2007. Polyphenols and antioxidant capacity of seed coat and cotyledon from Brazilian and Peruvian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* **55**, 90–98.
- García-Peris P.,** Bretón-Lesmes I., de la Cuerda-Compes C., Cambor-Álvarez M. 2002. Metabolismo colónico de la fibra. *Nut. Hosp.* **XVII** (Sup. 2): 11-16.
- Gariglio P.** y Orozco E. 2000. Genética y biomedicina molecular. Orozco. 1ª edición. Ed. Limusa, México, D.F.:181–198.
- Gee JM.,** Lee-Finglas W., Johnson I.T. 1996. Fermentable carbohydrate modulates post-prandial enteroglucagon and gastrin release in rats. *Br. J. Nut.* **75**: 757-766.

- Ghirardi M.**, Nascimbeni R., Villanacci V., Fontana MG., Betta ED., Salerni B. 1999. Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci and Colorectal Tumors in F344 Rats: Sequential Analysis of Growth. *Eur Surg Res.* **31**: 272-280.
- Giovannucci E.** 1995. Insulin and colon-cancer. *Cancer Caus Cont.* **6**:164-179.
- González de Mejía E.**, Castaño-Tostado E., Loarca-Piña G. 1999. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* **441**(1), 1–9.
- González de Mejía E.**, Castaño-Tostado E., Loarca-Piña GF. 1999. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mut Research.* **441**:1-9.
- Goñi I.** y Martín-Carron N. 2001. Fermentación colónica de fibra dietética y almidón resistente. En: Lajolo F, Saura-Calixto F, Witting de refina E. Menezes. Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología Sr salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. *Editorial Varela, Sao Paulo.* 311-338.
- Goodlad RA.** 2001. Dietary fibre and the risk of colorectal cancer. *Gut,* **48**, 587–589.
- Gope R.** y Gope ML. 1993. Effect of sodium butyrate on the expression of retinoblastoma (RB1) and p53 gene and phosphorylation of retinoblastoma protein in human colon tumor cell line HT29. *Cell Molec Biol.* **39**: 589-597.
- Govers, MJ.**, Gannon, NJ., Dunshea, FR., Gibson, PR., Muir, JG. 1999. Wheat bran affects the site of fermentation of resistant starch and luminal indexes related to colon cancer risk: a study in pigs. *Gut.* **45**: 840-847.
- Granito M.**, Champ M., David A., Bonnet C., and Guerra M. 2001. Identification of gas-producing components in different varieties of *Phaseolus vulgaris* by in vitro fermentation. *J Sci Food Agric.* **81**: 543-550.
- Green DR.** y Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science.* **281**: 1309-1312.
- Grife R.**, Swallow C., Bapat B. 1998. Molecular biology of colorectal cancer. *Current Prob Cancer.* **2**: 1-68.
- Griffiths AJ.**, Gelbart W., Miller J., Lewontin R. 2000. Genética moderna. 1ª edición. Ed. McGrawHill, España: 465–489.
- Gu L.**, Kelm MA., Hammerstone JF., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Prior RL. 2003. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural

- characterization using LC-MS/MS and thylotic degradation. *J Agric Food Chem.* **51**: 7513-7521.
- Guillon F.** y Champ MM-J. 2002. Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *B J Nutr.* **88**(Suppl 3): S293-S306.
- Gulewicz P.**, Ciesiolka D., Frias J., Vidal-Valverde C., Frejnagel S., Trojanowska K., Gulewicz K. 2000. Simple method of isolation and purification of α -galactoside from legumes. *J Agric Food Chem.* **48**: 3120-3123.
- Guzmán-Maldonado SH.** y Paredes-López O. 1998. Pérdidas irreversibles de un rico legado de la naturaleza para la humanidad. El caso del frijol común en México, *Persp.* **49**(4): 5-13.
- Guzmán-Maldonado SH.**, Acosta-Gallegos JA., Álvarez-Muñoz MA., García-Delgado S., Loarca-Piña G. 2002. Calidad alimentaria y potencial nutracéutico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agric Técn Méx.* **28** (2): 159-173.
- Guzmán-Maldonado SH.**, Castellanos J., y González de Mejía E. 1996. Relationship between theoretical and experimentally detected tannin content of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Food Chem.* **55**: 333-335.
- Hague A.**, Díaz GD., Hicks DJ., Krajewski S., Reed JC., Paraskeva C. 1997. Bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells: However overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis. *Int. J. Cancer.* **72**: 898-905.
- Hague A.**, Manning A., Hanlon K., Huschtscha LI., Hart D., Paraskeva C. 1993. Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumor cell lines in a p53 independent pathway: implications for the possible role of dietary fiber in the prevention of large bowel cancer. *Int J Cancer.* **55**: 498-505.
- Hairi B.**, Sallé G., Andary C. 1991. Involvement of flavonoids in the resistance of two poplar cultivars to mistletoe (*Viscum album* L.). *Protoplasma.* **162**: 20-26
- Hanahan D.** y Weinberg RA. 2000. The hallmark of cancer. *Cell.* **100**:57-70.
- Hanai J.**, Dhanabal M., Karumanchi SA., Albanese C., Waterman M., Chan B., Ramchandran R., Pestel R., Sukhate VP. 2002. Endostatin cause G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J. Biol Chem.* **277**: 16464-9.

- Hangen L.** y Benkini. 2002. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutr Cancer*. **44**(1): 60-65.
- Harborne JB.**; Turner BL. 1984. Plant Chemosystematics. London: Academic Press.
- Harper JW.**, Adami GR., Wei N., Keyomarsi K., Eledge SJ. 1993. The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G₁ cyclin dependent kinases. *Cell*. **75**: 805-16.
- Hass R.**, Busche R., Luciano L.; Reale E.; Engelhardt WV. 1997. Lack of butyrate is associated with induction of Bax and subsequent apoptosis in the proximal colon of guinea pig. *Gastroenterology*. **112**(3): 875-881.
- Hata K.**, Yamada Y., Kuno T., Hirose Y., Hara A., Hong Qiang S., Mori H. 2004. Tumor formatio is correlated with expresión of β -catenin-accumulated crypts in azoxymthane-induced colon carcinogenesis in mice. *Cancer Sci*. **95**: 316-320.
- Hatayama H.**, Iwashita J., Kuwajima K., Abe T. 2007. The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T. *Biochem Biophysical Research Comm*. **356**: 599-603.
- Havsteen BH.** 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. **96**(2-3), 67-202.
- Hecht A.** y Kemler R. 2000. Curbing the nuclear activities of β -catenin: control over Wnt target gene expression. *EMBO Rep*. **1**: 24-28.
- Heerdt BG.**, Houston MA., Augenlicht LH. 1994. Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer. Res*. **54**: 3288-3294.
- Heimler D.**, Vignolini P., Dini MG., Romani A. 2005. Rapid tests to assess the antioxidant activity *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. *J Agric Food Chem*. **53**(8): 3053-6
- Hengst L.**, Dulic V., Slingerland JM., Lees E., Reed SI. 1994. A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**: 5291-5295.
- Henningsson MA.**; Nyman GL., Björck ME. 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 J Nutr*. **86**: 379-389.

- Herrera I.**, González E., Romero J. 1998. Fibra dietética soluble, insoluble y total en leguminosas crudas y cocidas. *Arch Latinoamer Nutr.* **48**: 179-182.
- Hesketh R.** 1997. The oncogene and tumor suppressor gene facts book, 2d ed. Academic Press.
- Higgins PJ.** 1989. Antigenic and cytoarchitectural "markers" of differentiation pathway in normal and malignant colonic epithelial cel. En: Agenlicht, L.H., editor. *Cell Mol Biol of Colon Cancer*. Boca Raton: CRC Press: 112-132.
- Hirose Y.**, Kuno T., Yamada Y., Sakata K., Katayama M., Yoshida K. 2003. Azoxymethane-induced beta-catenin-accumulated crypts in colonic mucosa of rodents as an intermediate biomarker for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. **24**: 107-111.
- Ho C.** 1992. Phenolic compounds in food. In Phenolic compounds in food and their effects on health 1. Analysis, Occurrence & Chemistry. C. Ho, C. Y. Lee and M. Huang (Eds) American Chemical Society, Washington, D.C. Pp 1-7.
- Hodgson H.** y Smart C. 2001. Introduction to biochemical toxicology. 3^a Ed, Wiley-Interscience (Ed), pp: 343-395.
- Holcik M.** y Korneluk GR. 2001. XIAP, the guardin angel. *Nature* (2): 550-556.
- Hollman PC.**, Feskens EJ., Katan MB. 1999. Tea flavonols in cardiovascular disease and cancer epidemiology. *Proc Soc Exp Biol Med.* **220**(4): 198-202.
- Howe GR.**, Benito E., Castelleto R., Cornee J., Esteve J., Gallagher RP., Iscovich JM., Deng-ao J., Kaaks R, Kune GA. 1992. Dietary intake of fiber and decreased risk of cancer of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 cases-control studies. *J Natl Cancer Inst.* **84**: 1598-1610.
- Howlard MD.**, Gordon DT., Garleb KA., Kerley MS. 1995. Dietary fructooligosaccharide, xyloologosaccharide and gum arabic have variable effects on cecal and colonic microbiota and epithelial cell proliferation in mice and rats. *J Nutr.* **125**: 2604-2609.
- Hu Y.**, Benedict MA., Wu-Inohara DN., Nuñez G. 1998. Bcl-X_L interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase 9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4386-4391.

- Humphries A.** y Wright NA. 2008. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. **8** (6): 415-425.
- Hunghes J.**, Chutima G. and Wilson-Sander S. 1997. Dry beans inhibit azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Rev J Nutr*. **127**: 2328-2333.
- Hunghes JS.**, Acevedo E., Bressani R., Swanson BG. 1996. Effects of dietary fiber and tannins on protein utilization in dry beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Res Int*. **29**: 331-338.
- Hunter T.** 1997. Oncoprotein networks. *Cell*. **88**:333-346.
- Iacopetta B.** 2003. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat*. **21**: 271-6.
- Ilyas M.**, Tomilinson IPM., Rowan A., Pignatelli M., Bodmer F. 1997. β -catenina mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **94**:10330–10334.
- Inan MS.**, Rasoulpour RJ., Yin L., Hubbard A., Rosenberg DW., Giardina C. 2000. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF- κ B activity in human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*. **118**: 724-734.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.** INEGI. 2008. www.inegi.gob.mx
- Irish G.**, Barbour GW., Classen HL., Tyler RT., Bedford MR. 1995. Removal of the α -galactosidase and broiler performance. *Poult Sci*. **74**: 1484-1494.
- Itoh N.**, Yonehara S., Ishii A. 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for humancell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*. **6**: 233-243.
- Jacobs, LR.** y Lupton, JR. 1982. Dietary wheat bran lowers colonic pH in rats. *J Nutr*. **112**: 592-594
- Jan G.**, Belzacq AS., Haouzi D., Rouault A., Métivier D., Kroemer G., Brenner C. 2002. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell. Death. Differ*. **9(2)**: 179-188.
- Jenkins DJA.**, Thorne MJ., Camelon K., Jenkins AL., Rao AV., Taylor RH., Thompson LU., Kalmusky J., Reichert R., Francis T. 1982. Effect of processing in digestibility and the blood glucose response: study of lentils. *Am J Clin Nutr*. **36**: 1093-1101.
- Jenkins DJA.**, Wolever TMS., Collier GR., Ocana A., Rao AV., Buckley G., Lam Y.,

- Mayer, A., Thompson LU. 1987. Metabolic effects of a low-glycemic-index diet. *Am J Clin Nutr.* **46**: 968-975.
- Kaufmann SH.**, Desnoyers S., Ottavio Y., Davidson NE., Poirier GG. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**: 3976-3985.
- Khanbabaee KTR.** 2001. Tannis: Clasification and Definition. *Nat. Product Reports (NPR).* **18**: 641-649.
- King ESJ.** y Vorasdi G. 1959. Experimentally induced tumors of the intestine. *Aust New Zeal. J Surg;* **29**: 38-53.
- Kinzler KW.** y Vogelstein. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* **87**: 159-170.
- Klein G.** 1998. Foulds dangerous idea revisited: the multistep development of tumors 40 years later. *Adv Cancer Res.* **72**: 1-23.
- Kles AK.** y Chang EB. 2006. Short-chain fatty acids impact on intestinal adaptation, inflammation, carcinoma and failure. *Gastroenter.* **130**: S100-S105.
- Koesters R.**, Hans AH., Benner A., Prosst, R., Boehm J., Gahler J., von Knebel D., Doeberitz M. 2001. Predominant mutation of codon 41 of the β -catenin proto-oncogene in rat colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine using a complete carcinogenic protocol. *Carcinogenesis.* **22**: 1885-1890.
- Koesters R.**, Ridder R., Kopp-Schneider A., Betts D., Adams kV., Niggli F., Briner J., von Knebel Doeberitz M. 1999. Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms`tumors. *Cancer Res.* **59**: 3880-3882.
- Köhler C.**, Orrenius S., Zhivotovsky B. 2002. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J. Inmunol. Meth.* **265**:97-100.
- Kolligs FT.**, Bommer G., Göke B. 2002. Wnt/Beta-Catenina/Tcf signaling : A critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Disgestion.* **66**:131–144.
- Kulkarni N.** y Reddy BS. 1994. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial beta-glucuronidase. *Proc Soc Exp Biol Med.* **207**(3): 278-283.

- Kurtzman RHJR.** y Halbrook WU. 1970. Polysaccharide from dry Navy beans, *Phaseolus vulgaris*: Its isolation and stimulation of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology*. **20**(5):715-719.
- Kyoung-Mee K.**, Darryl S. 2002. Methylation reveals a niche: stem cell succession in human colon crypts. *Oncogene*. **21**: 5441-49.
- Lakshman M.**, Subraniam V., Jothy S. 2004. CD44 negatively regulates apoptosis in murine colonic epithelium via the mitochondria pathway. *Exp Mol Path*. **76**: 196-204.
- Lamprecht SA.** y Lipkin M. 2002. Migrating colonic crypt epithelial cells: primary targets for transformation. *Carcinogenesis*. **23**: 1777-80.
- Lan A.**, Lagadic-Gossmann., Lemaire C., Brenner C., Jan G. 2007. Acidic extracellular pH shifts colorectal cancer cell death from apoptosis to necrosis upon exposure to propionate and acetate, major end-products of the human probiotic propionibacteria. *Apoptosis*. **12**: 573-591.
- Lane DP.** 1992. P53, guardian of the genome. *Nature*. **358**: 15-16.
- Lanza E.**, Hartman T.J., Albert P.S., Shields R., Slattery M., Caan B., Paskett E., Iber F., Kikendall J.W., Lance P., Daston C., Schatzkin A. 2006. High dry bean intake and reduced risk of advanced colorectal adenoma recurrence among participants in the polyp prevention trial. *J Nutr*. **136**: 1896-1903.
- Larrick, JW.** y Siebert, PD. 1995. Reverse Transcriptase PCR. In: *Ellis Horwood Series in Pharmaceutical Technology* (Rubinstein, MH., ed.). Ellis Horwood Ltd., Herfordshire. U.K.
- Le Blay, G.**, Michel, C., Blottiere, HM., Cherbut, C. 1999. Enhancement of butyrate production in the rat caeco-colonic tract by long-term ingestion of resistant potato starch. *Br J Nutr*. **82**: 419-426.
- Leist M.** y Jaattela M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Rev Mol Cell Biol*. **2**: 589-598.
- Le-Leu RK.**, Brown IL., Hu Y., Bird AR., Jackson M., Esterman A., Young GP. 2005. A symbiotic combination of resistant starch and *Bifidobacterium lactis* facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. *Amer Soc Nutr Sci*. 996-1001.

- Le-Leu, RK.**, Brown, IL., Hu, Y., Young, GP. 2003. Effect of resistant starch on genotoxin induced apoptosis, colonic epithelium and luminal contents in rat. *Carcinogenesis*. **24**: 1347-1352.
- Lepiz IR.** y Navarro SJ. 1983. Origen y descripción Botánica. 2ª ed. SAR, Mexico. Pp 29-44.
- Leske KL.**, Jevne CJ., Coon CN. 1993. Effect of oligosaccharide additions on nitrogen-corrected true metabolizable energy of soy protein concentrate. *Poult Sci*. **72**: 664-668.
- Levine A.** 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. **88**: 323-331.
- Li CJ.** y Elsasser TH. 2005. Butyrate-induced apoptosis and cell cycle arrest in bovine kidney epithelial cells: Involvement of caspase and proteasome pathways. *J Anim Sci*. **83**: 89-97.
- Li P.**, Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula SM., Ahmad M., Alnemri ES., Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. **91**: 479-489.
- Li X.**, Mikkelsen IM., Mortensen B., Winberg JO., Huseby NE. 2004. Butyrate reduces liver metastasis of rat colon carcinoma cells *in vivo* and resistance to oxidative stress *in vitro*. *Clinical & Exp Metast*. **21**: 331-338.
- Linz AL.**, Xiao R., Parker JG., Simpsom PM., Badger TM., Simmen FA. 2004. Feeding of soy protein isolate to rats during pregnancy and lactation suppresses formation of aberrant crypt foci in their progeny's colons: interaction of diet with fetal alcohol exposure. *J Carcinogenesis*. **3**: 14.
- Litvak D.**, Evers BM., Hwang KO., Hellmich MR., Ko TC., Townsend CM. 1998. *Surgery*. **124**: 161-170.
- Liu J.**, Stevens J., Rote CA., Post HJ., Hu Y., Neufeld KL., White RL., Matsunami N. 2001. Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol. Cell* :**7**:927 – 936.
- Lodish H.**, Berk A., Lawrence S., Marsudaira P. 2002. Manipulación de células y virus en cultivos. En: Biología celular y molecular. Editorial Médica Panamericana. 4ª Ed.; 183-187.
- Loeb LA.** 2001. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*. **61**: 3230-9.

- Longobardi GA.** 1992. Flow cytometry. First Principles. New Cork: Willey-Liss.
- Luo RX.,** Postigo AA., Dean DC. 1998. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell.* **92:** 463-73.
- Lupton JR.** 2004. Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. *J Nutr.* (Supp): 479-482.
- Lupton JR.** y Kurtz PP. 1993. Relationship of colonic luminal short chain fatty acids and pH to *in vivo* cell proliferation in rats. *J Nutr.* **123:** 1522-1530.
- Mahyar-Roemer M.** y Roemer K. 2001. p21Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. *Oncogene.* **20:** 3387-3398.
- Manzo-Bonilla ML.** 2001. Efecto del tratamiento térmico sobre la concentración de compuestos fenólicos en tres variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) y su actividad antimutagénica contra aflatoxina B₁. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro. Pp 39, 54.
- Marchand LL.** 2002. Cancer preventive effects of flavonoids: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* **56,** 296-301.
- Mariadason JM.,** Georgia AC., Augenlicht LH. 2000. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with Trichostatin A, Sulindac, and Curcumin and Implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer. Research.* **60:** 4561-4572.
- Martin, LJM.,** Dumon, HJW., Champ, MMJ. 1998. Production of short chain fatty acids from resistant starch in a pig model. *J Sci Food Agric.* **77:** 71-80.
- Martín-Cabrejas MA.,** Esteban RM., Pérez P., Maina G., Waldron KW. 1997. Changes in physicochemical properties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) during long-term storage. *J. Agric Food Chem.* **45:** 3223-3227.
- Martínez J.,** Taylor Parker M., Fultz K., Ignatenko N., Gerner E. 2003. Burger's Medical Chemistry and Drug Discovery. 6^a edición. Ed. Donald J. Abraham. Pp: 22 y 27.
- Maskens AF.** 1981. Confirmation of the two-step nature of chemical carcinogenesis in the rat colon adenocarcinoma model. *Cancer Res;* **41:** 1240-1245.
- Mateu de Antonio X.** 2004. La fibra en la alimentación. Farmacia Hospitalaria. Hospital del Mar. Barcelona. Edikamed S.L. Barcelona. 1-22.

- Mathers JC.** 2002. Pulses and carcinogenesis: potencial or the prevention of colon, breast and other cancers. *British J Nutr.* **88**: S273-S279.
- McBain AJ.** y Macfarlane GT. 1998. Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolytic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites. *J Med Microbiol.* **47**(5): 407-416.
- McCullough JS.,** Ratcliffe B., Mandir N., Carr KE., Goodlad RA. 1998. Dietary fibre and intestinal microflora: effects on intestinal morphometry and crypt branching. *Gut,* **42,** 799–806.
- McKeown-Eyssen G.** 1994. Epidemiology of colorectal-cancer revisited are serum triglycerides and/or plasma-glucose associated with risk. *Cancer Epid Biom Prev.* **3:** 687-695.
- McLellan EA.** y Bird RP. 1988. Aberrant crypts: Potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res.* **48:** 6187-6192.
- McNeil MI.** 1984. The contribution of the large intestine to energy supplies in man. *Am J Clin Nutr.* **39:** 338-342.
- Medina V.,** Afonso JJ., Alvarez-Arguelles H., Hernández C., González F. 1998. Sodium butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *J Parenter Enteral Nutr.* **22:** 14-17.
- Meergans T.,** Hildebrandt AK., Horak D., Haesnisch C., Wendel A. 2000. The short prodomain influences caspasa-3 activation in HeLa cells. *Biochem. J.* **349:** 135-140.
- Meyer O.** y Tunglund B. 2001. Non-digestible oligosaccharides and polysaccharides: their physiological effects and health implications. *Adv Diet Fibre Tech.* **39:** 455-470.
- Michels KB.** 2005. The role of nutrition in cancer development and prevention. *Int J Cancer,* **114:** 163-165.
- Millar TL.** y Wolin MJ. 1979. Fermentation by saccharolytic intestinal bacteria. *Am J Clin Nutr.* **32:** 164-172.
- Montenegro MA.,** Negrette S., Lertora WJ., Catouno MS. 2003. Focos de criptas displásicas inducidas con 1,2-dimetilidrazina en intestino grueso de ratas tratadas con molibdeno y tungsteno. *Rev Vet.* **1:** 19-29.

- Morin PJ**, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. 1997. Activation of β -catenin-Tcf signalling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Sci*: **275**: 1787–1790.
- Morrissey B**. 2002. Foreword. Functional foods. Biochemical and Processing Aspects. En: Shi, J., Mazza, G. y Le Maguer (Eds). CRC-Press. U.S.A. Vol 2.
- Munn DH.**, Pressey J., Beall AC., Hudes R., Alderson MR. 1995. Selective activation induced apoptosis of periferal T cells imposed by macrophages. *J. Immunol.* **156**(2): 515-522.
- Muñoz A**. 1997. Cancer: genes y nuevas terapias. Editorial Helice.
- Murillo CA.**, Rychahou PG., Evers BM. 2004. Inhibition of α 5 integrin decreases PI3K activation and cell adhesion of human colon cancers. *Sugery.* **136**(2): 143-149.
- Murray AW**. 1992. Creative blocks; cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature.* **359**: 599-604.
- Musch MW.**, Bookstein C., Rocha F., Lucioni A., Ren H., Daniel J., Xie Y., McSwine RL., Rao MC., Alverdy J., Chang EB. 2002. Region-specific adaptation of apical Na/H exchangers alter extensive proximal small bowel resection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **283**: G975-G985.
- Nakanishi S.**, Kataoka K., Kuwahara T., Ohnishi Y. 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. *Microbiol Immunol.***47**(12): 951-958.
- Negrete S.**, Montenero MA., Burna AN., Borda JT. 1999-2000. Ocurrencia de queratoacantomas en ratas tratadas con 1,2-dimetilidrazina. *Rev Vet.* **1**, **2**:12-15.
- Newmark HL.** y Lupton, JR. 1990. Determinants and consequences of colonic luminal pH: implications for colon cancer. *Nutr Cancer.* **14**: 161-173.
- Nigg EA**. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**: 21-32.
- Noah L.**, Guillon F., Bouchet B., Buleon A., Molis C., Gratas M., Champ M. 1998. Digestion of carbohydrate from white beans (*Phaseolus vulgaris* L) in healthy humans. *J Nutr.* **128**: 977-985.

- Noda A.**, Ning Y., Venable SF., Pereira-Smith OM., Smith JR. 1994. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res.* **211**: 90-8.
- Nordgaard I.** y Mortensen PB. 1995. Digestive processes in the human colon. *Nutrition.* **11**: 37-45.
- Novak A.** y Dedhar, S. 1999. Signaling through β -catenin and Lef/Tcf. *Cell Molec Life Sci.* **56**: 532 – 537.
- Nugent SG.**, Kumar D., Rampton DS., Evans DF. 2001. Intestinal luminal PH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosalicylates and other drugs. *Gut.* **48**: 571-577.
- Ohkawara S.**, Furuya H., Nagashima K., Asanuma H., Hino T. 2005. Oral administration of butyrovibrio fibrisolvens, a butyrate-producing bacterium, decreases the formation of aberrant crypt foci in the colon and rectum of mice. *J Nutr.* **135**(12): 2878-2783.
- Olivo S.** y Wargovich MJ. 1998. Inhibition of aberrant crypt foci by chemopreventive agents. *In Vivo.* **12**: 159-166.
- Oltvai ZN.**, Milliman CL., Korsmeyer, SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* **74**: 609-619.
- Ookawa K.**, Shiseki M., Takahashi R., Yoshida Y., Terada M., Yokota J. 1993. Reconstitution of the Rb gene suppresses the growth of small-cell lung carcinoma cells carrying multiple genetic alterations. *Oncogene.* **8**: 2175-2181.
- Oomah BD.**, Cardador-Martínez A., Loarca-Piña G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *J Sci Food Agric.* **85**: 935-942.
- Osório-Díaz P.**, Bello-Perez, LA., Sayago-Ayerdi SG., Benitez-Reyes MDP., Tovar J., Paredes-López O. 2003. Effect of processing and storage time on *in vitro* digestibility and resistant starch content of two bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *J Sci Food Agric.* **83**(12), 1283-1288.

- Osorio-Díaz P.**, Tovar J., Paredes-López O., Acosta-Gallegos JA., Bello-Pérez LA. 2005. Chemical composition and *in vitro* starch bioavailability of *Phaseolus vulgaris* (L) cv Mayocoba. *J Sci Food Agric.* **85**: 499-504.
- Owen-Schaub LB.**, Angelo LS., Radinsky R., Ware CF. 1995. Soluble Fas/Apo-1 in tumor cell: a potential regulator of apoptosis? *Cancer Letters.* **94**: 14.
- Papanikolaou A.**, Wang QS., Papanikolau D., Whiteley HE., Rosenberg DW. 2000. Sequential and morphological analyses of aberrant crypt foci formation in mice of differing susceptibility to azoxymethane induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* **21**(8): 1567-1572.
- Paredes-López O.**, Guevara-Lara F., Bello-Pérez LA. 2006. Frijol. En: Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. *Fondo de cultura economica* (Editorial), México.
- Park HS.**, Goodlad RA., Ahnen DJ., Winnett A., Sasieni P., Lee CY., Wright NA. 1997. Effects of epidermal growth factor and dimethylhydrazine on crypt size, cell proliferation and crypt fission in the rat colon. Cell proliferation and crypt fission are controlled independently. *Am. J. Pathol.*, **151**, 843–852.
- Parkinson A.** 1996. Biotransformation of xenobiotics. En: Klaassen, C. C. (Eds). Casarett and Doull's Toxicology The basic science of poisons. Mc. Graw Hill. New York. Cap. 6 Pp 113-186.
- Paulsen JE.** 2000. Modulation by dietary factors in murine FAP models. *Toxicol Lett.* **112-113**: 403-409.
- Peralta Zaragoza O.**, Bahena Román M., Díaz Benitez CE., Madrid Marina V. 1997. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública de México.* **39**: 451–462.
- Pereira MA.**, Barnes LH., Fassman VL., Kelloff GV., Steele V. 1994. Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis.* **15**: 1049-54.
- Perfettini JL.**, Kroemer RT., Kroemer G. 2004. Fatal liaisons of p53 con Bax y Bak. *Nature Cell Biology.* **6**: 386-388.
- Perkins AS.** y Stern DF. 2000. Cáncer Principios y práctica de Oncología. 5ª edición. Ed. Médica Panamericana, España: Pp: 79–102.

- Piñols-Felis C.** 1995. Estudio de los cambios en la mucosa colónica de rata y cinética durante la carcinogénesis experimental inducida 1,2-dimetilhidracina. Barcelona, España. Universidad de Lleida. Tesis para obtener el título de doctor en ciencias.15–20.
- Plancarte SR.** y Mayer RF. 2003. Alivio del dolor y cuidados paliativos en pacientes con cáncer. McGraw-Hill (Ed), pp: 19-39.
- Polakis P,** Hart M, Rubinfeld B. 1999. Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol.* **470**: 23-32.
- Pool-Zobel BL.,** Selvaraju V., Saber J., Tanja-Kautenburger T., Kiefer J., Richterb KK., Soom M., Wölf S. 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(6): 1064-76.
- Potter JD.** 1999. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst.* **91**: 916-32.
- Preston KR.** 1998. Protein Carbohydrate Interaction. In: Interactions: The keys to Cereal Quality. R.J. Hamer and R.C. Hosenev (eds.). American Association of Cereal Chemists. St Paul MN. Pp 81-93.
- Ratnayake WS.,** Hoover R., Shahid F., Perera C., Jane J. 2001. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of starchs from four field peas (*Pisum sativum*) L. cultivars. *Food Chemistry.* **74**, 189-202.
- Reddy AL.** y Fialkow PJ. 1988. Influence of dose of initiator of two-stage skin carcinogenesis in BALB/c mice with cellular mosaicism. *Carcinogenesis.* **9**: 751-754.
- Rehman Z.,** Salariya AM., Zafar SI. 2001. Effect of processing on available carbohydrate content and starch digestibility of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Food Chem.* **73**: 351-355.
- Reyes Moreno C.** y Paredes-López O. 1993. Hard-to-cock phenomenon in common beans. A review, CRC. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **33**: 227-286.
- Ríos-Hernández MA.** y Hernández-Menéndez M. 2001. Los genes supresores de tumores y el cáncer. *Rev Cubana Oncol.* **17**(1): 65-71.

- Ríos-Ugalde MC.**, Reynoso-Camacho R., Torres-Pacheco I., Acosta-Gallegos J., Palomino-Salinas AC., Ramos-Gómez M., González-Jasso E., Guzmán-Maldonado. 2007. Efecto del consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. *Agric Tecn Mex.* **33**(1): 43-52.
- Rodríguez MAM.**, Silva LAG., Salvadori DMF., de Camargo JLV., Montenegro MR. 2002. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short and medium term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* **35**: 351-355.
- Roediger WE.** 1982. The effect of bacterial metabolites on nutrition and function of the colonic mucosa. Symbiosis between man and bacteria. Falk Symposium 32. Kaspes, H., Goebell, H, (eds.). *Colon and Nutrition.* MTP Press limited, Lancaster: Pp. 11-24.
- Rombeau JL.** y Kriple SA. 1990. Metabolic and intestinal effects of short-chain fatty acids. *JPEN.* **14**: 181S-185S.
- Rommy, von Bernhardt M.** 2004. Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis? *Rev Chil Neuro-Psiquiat;* 42(4): 281-292.
- Rouet-Benzineb P.**, Aparicio T., Guilmeau S., Pouzet C., Descatoire V., Buyse, M., Bado A. 2004. Leptin counteracts sodium butyrate-induced apoptosis in human colon cancer HT-29 cells via NF- κ B signaling. *J Biol Chem.* **279** (16): 16495-16502.
- Rudel T.** y Bokovh GM. 1997. Membrana and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspases-mediated activation of PAK2. *Science.* **276**: 1571-1574.
- Rumnery C.** y Rowland I. 1995. Non-digestible oligosaccharides potential anticancer agents?. *BNF Nuts Bull.* **20**: 194-203.
- Saini HS.** 1989. Legume seeds oligosaccharides. In Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds. J. Huisman, A. F.B. van der Poel, and I. E. Liener, ed. Pudoc, Wageningen, The Netherlands. Pp. 329-341.
- Salvesen GS.** y Dixit VM. 1997. Caspases: intracellular signalign by proteolysis. *Cell.* **91**: 443-6.

- Sambrook J.**, Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed. pp. 6.44 Cold Spring Harbor Laboratory Press, US.
- Sandberg AS.** 2000. Developing functional ingredients a case study. In: Gibson, GR., Williams, CM., editors. Functional foods concepts to product. Boca Raton, Fla.: CRC Press.
- Santana C.** y García Carrancá A. 1997. Los genes *ras*, el ciclo celular y el desarrollo de tumores. *BEB*. 16:86-91.
- Santana J.L.**, Martínez LF., Vargas GL., Melo CP., García GM., Isaac OK., Codorniú HE., Estévez P., Roque CA., Benítez M. 2002. Use of Radioisotopic Methods for Characterization of Vegetable Tannins, Extracted From Waste of Forestry Production in Cuba. *J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. **253**: 1, 101-106.
- Santana J.L.**, 2002. Importancia de los compuestos polifenólicos y su actividad biológica. Apuntes.
- Santos-Buelga C.** y Scalbert A. 2000. Proanthocyanidins and Tannin-like compounds in human nutrition. *J Food Sci Agric*. **80**: 1094-1117.
- Sasaki T.**, Sasaki JL., Jones RG., Oliveira-dos-Santos AJ., Stanford WL., Botton R., Wakehan S., Bouchard D., Kozieradzki I., Joza N., Mark TW., Ohashi PS., Susuki A., Penninger JM. 2000. Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)kgamma. *Nature*. **406**:897-902.
- Saura-Calixto F.**, García-Alonso A., Goni I., Bravo L. 2000. *In vitro* determination of the indigestible fraction in food. An alternative to dietary fiber analysis. *J Agric Food Chem*. **48**: 3324-3347.
- Saura-Calixto F.**, Goñi I., Bravo L., Mañas E. 1993. Resistant starch in foods: Modified method of dietary fiber residues. *J Food Sci*. **58(3)**: 642-643.
- Scheppach W.** 1994. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*. **35**(Suppl 1): 35-38.
- Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA)**, 2003. www.siap.sagarpa.gob.mx (Consulta Marzo, 2007)
- Sengupta S.**, Tjandra JJ., Gibson PR. 2001. Dietary fiber and colorectal neoplasia. *Dis. Colon Rectum*, **44**, 1016–1033.
- Serrano J.** y Goñi I. 2004. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado

nutricional de la población guatemalteca. ALAN v.54 n.1 Caracas mar.

- Shahidi F.** y Naczk M. 1995. Food Phenolics. Sources, Chemistry, Effects and Aplicationas. Technomic Publising Co. Inc. Lancaster, PA. 331p.
- Shahidi F.**, Chavan UD., Naczk M., Amarowicz R. 2001. Nutrient distribution and phenolic antioxidants in air-classified fractions of beach pea (*Lathyrus maritimus* L). *J Agric Food Chem.* **49**: 926-933.
- Shandu MS.**, Dunger DB., Giovannucci EL. 2002. Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions and colorectal cancer. *J Nat Cancer Inst.* **94**: 972-980.
- Shapiro HM.** 2003. Practical flow cytometry. 4th ed. New Jersey: Wiley-Liss, Hoboken
- Sherr CJ.** 2000. Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect.* **96**:73-92.
- Sherr CJ.** y Roberts JM. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.***13**: 1501-12.
- Shiga MT.**, Lajolo MF., Filisetti MT. 2003. Cell wall polysaccharides of common beans (*phaseolus vulgaris* L). *Cienc. Technol. Aliment., Campinas.* **23**(2):141-148.
- Siavoshian S.** Segaom J., Komprobst M., Bonnet C., Cherbut C., Galmiche J., Blottiere H. 2000. Butyrate and trichostatin A effect on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelia cells: induction of cyclin 3 and p21 expression. *Gut.* **46**: 507-514.
- Skrabanja V.**, Liljerberg HGM., Hedley CL., Kreft I., Björck IME. 1999. Influence of genotype and processing on the *in vitro* rate of starch hydrolysis and resistant starch formation in peas (*Pisum sativum* L.). *J Agric Food Chem.* **47**: 2033-2039.
- Smith HW.** 1965. Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *J Pathol Bacteriol.* **89**: 95-107.
- Sparks AB.**, Morin PJ., Vogelstein B., Kinzler KW. 1998. Mutational analysis of the APC/ β -Catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* **58**: 1130-1134.
- Spjut HJ.** y Smith MN. 1977. A comparative electronmicroscopic study of human and rat colonic polyps and carcinomas. *Exp Mol Pathol.* 19-34.
- Stennicke HR.** y Salvesen GS. 1998. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta.* **1387**: 17-31.
- Stillman B.** 1996. Cell cycle control of DNA replication. *Science.* **274 (6)**: 1659-1663.

- Sträter J., Koretz K., Günthert AR., Möller P.** 1995. *In situ* detection of enterocytic apoptosis in normal colonic mucosa and in familial adenomatous polyposis. *Gut*. **37**: 819-825.
- Suda T.,** Takahashi T., Golstein P., Nagata S. 1993. Molecular cloning and expresion of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*. **75**: 1169-1178.
- Takeoka GR.,** Dao LT., Full GH., Wong RY., Harden LA., Edwards RH., Berrios JJ. 1997. Characterization of black bean (*Phaseollus vulgaris* L.) anthocyanins. *J Agric Food Chem*. **45** (9): 3395-3400.
- Tanaka M.,** Thananunkul D., Tee T., Chichester CO. 1975. A simplified method for the quantitative determination of sucrose, raffinose and stachiose in legume seeds. *J Food Sci*. **40**: 1087-1088.
- Tanaka T.,** Kawabata K., Kakumoto M., Makita H., Hara A., Mori H. 1997. Citrus auraptene inhibitors chemically induced colonic aberrant crypt foci in male F344 rats. *Carcinogenesis*. **18**: 2155-2161.
- Tannin Extract Producers Federation.** 1975. Principios y técnicas modernas de curtición vegetal. Ed. Zurich. Capitulo X
- Tao L.,** Wag W., Kramer MP., Lubet AR., Steele EV., Pereira AM. 2004. Modulation of DNA hypomethylation as a surrogate endpoint biomarker for chemoprevention of colon cancer. *Molec Carcinogenesis*. **39**: 79-84.
- Tharanathan RN.** y Mahadevamma S. 2003. Grain legumes a boon to humn nutrition. *Trends Food Sci Technol*. **14**: 507-518.
- Thornberry NA.** 1999. Caspases: a decade of death research. *Cell Death Differ*. **6** (11): 1023-7.
- Torun B.,** Menchú M., Elias L. 1996. Recomendaciones dietéticas diarias del INCAP. *INCAP MP1057*. Guatemala. Pp 137.
- Toth B.** 1982. Hydrazines and related compounds in colonia carcinogenesis En: Malt RA., Williamson RCN (eds). *Colonic Carcinogenesis*. 1a. Ed. Lancaster: MTP Press Limited; 165-176.
- Tovar J.** y Melito C. 1996. Steam-cooking and dry heating produce resistant starch in legumes. *J Agric Food Chem*. **44**: 2642-2645.

- Tovar J.**, Bjorck IM., Asp NG. 1992a. Incomplete digestion of legume starches in rats: A study of precooked flours containing retrograded and physically inaccessible starch fractions. *J. Nutr.* **122**: 1500-1507.
- Tovar J.**, Granfeldt Y., Bjorck IM. 1992b. Effect of processing on blood glucose and insulin responses to starch in legumes. *J Agric Food Chem.* **40**: 1846-1851.
- Treviño J.**, Centeno C., Brenes A., Ystee P., Rubio L. 1990. Effect of dietary oligosaccharides on the digestion of pea starch by growing chicks. *Anim Feed Sci Technool.* **30**: 313-319.
- Tyagi S.**, Venugopalakrishnan J., Ramaswamy K., Dudeja PK., 2002. Mechanism of n-butyrate uptake in the human proximal colonic basolateral membranes. *Am J Physiol.* **282**: G676-G682.
- Van 't Veer LJ.**, Dai H., Van de Vijver MJ., He DY., Hart AA., Mao Mao M., Peterse HL., Van der Kooy K., Marton MJ., Witteveen AT., Schreiber GJ., Kerkhoven RM., Roberts C., Linsley SP., Bernards R., Friend SH. 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* **415**: 530-536.
- Velasco ZI.**, Rascon A., Tovar J. 1997. Enzymic availability of starch in cooked black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpeas (*Vigna* spp). *J Agric Food Chem.* **45**: 1548-1551.
- Velázquez OC.**, Jabbar A., DeMatteo RP., Rombeau JL. 1996a. Butyrate inhibits hepatic tumor growth *in vivo*, in a murine mode of colorectal carcinoma metastatic to the liver. *Surgery.* **120**: 440-448.
- Velazquez OC.**, Leder HM., Rombeau JL. 1996b. Butyrate and the colonocyte-Implication for neoplasia. *Dig Dis Sci.* **41**: 727-739.
- Velázquez OC.**, Seto RW., Rombeau JL. 1996c. The scientific rationale and clinical application of short chain fatty acids and medium-chain triacylglycerols. *Proc Nut. Soc.* **55**: 49-78.
- Vergheze M.**, Rao DR., Chawan CB., Schackelford L. 2002. Dietary inuli suppresses azoxymethane-induced preneoplastic aberrant crypt foci in mature Fisher 344 rats. *J Nutr.* **132**: 2804-2808.
- Vidal A.** y Koff A. 2003. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene.* **247**: 1-15.

- Vidal-Valverde C.**, Frias J., Prodanov M., Tabera J., Ruíz R., Bacon J. 1993. Effect of natural fermentation on carbohydrates, riboflavin and tripsin inhibitor activity of lentils. *Z Lebensm Unters Frosch.* **197**: 449-452.
- Vila M.** y Przedborski S. 2003. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nature Rev Neurosci.* **4**: 365-375.
- Vogelstein B.**, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y., White R. 1989. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science.* **244**: 207-11.
- Vogelstein B.**, Lane D. & Levine A. 2000. Surfing the p53 network. *Nature.* **408**: 307-310.
- Volate SR.**, Daenport DM., Muga SJ., Wargovich MJ. 2005. Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *Carcinogenesis.* **26**: 1450-1456.
- Wang C.**, Li Z., Fu M., Bouras T., Pestell RG. 2004. Signal Transduction mediated by cyclin D1 : from mitogens to cell proliferation: a molecular target with therapeutic potential. *Cancer Treat Res.* **119**: 217-37.
- Wang H.**, Cao G., Prior RL. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J Agric Food Chem.* **45**: 304-309.
- Ward JM.**, Yamamoto RS., Benjamin T., Brown CA., Weisburger JH. 1974. Experimentally induced cancer of the colon in rats and mice. *JAVMA.* **164**: 729-732.
- Wargovich MJ.**, Allmuntt D., Palmer C., Stephens AP. 1990. Inhibition of the promotional phase of azoxymethane induced colon carcinogenesis in F344 rat by calcium lactate: effect of stimulationg two different nutrient density levels. *Cancer Lett.* **53**: 17-25.
- Wheater PR.**, Zurbitt HG., Daniels VG. 1987. Editorial JIMS, Barcelona
- Wildman REC.** 2001. Classifying nutraceuticals. In: Wildman, REC (ed) Handbook of nutraceuticals and functional foods. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 13–30.
- Williamson RC.**, Bauer FL., Terpstra OT., Ross JS., Malt RA. 1980. Contrasting effects of subtotal enteric bypass enterectomy and colectomy on azoxymethane induced intestinal carcinogenesis. *Cancer.* **40**: 538-543.
- Wolin, MJ.** y Millar, TL. 1983. Interactions of microbial populations in cellulose

fermentations. *Fed. Proc.* **42**: 109-113.

Won LK., Joo LH., Yong LCh. 2004. Vitaminas, fitoquímicos, dieta y su implementación en la quimiopreención del cáncer. *Critl Rev Food Sci Nutr.* **44**: 437-452.

Wong CSM. y Gibson PR. 2003. The trophic effect of dietary fibre is not associated with a change in total crypt number in the distal colon of rats. *Carcinogenesis* **24**(2): 343-348.

Wong CSM., Ph.D., Sengupta S., MBBS., Tjandra JJ., MD., FRACS., Gibson PR., MD., FRACP. 2005. The influence of specific luminal factors on the colonic epithelium: High-Dose butyrate and physical changes suppress early carcinogenic events in rats. *Dis Colon Rect.* **48**: 549-559.

Wright NA. 2000. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *Int J Exp Pathol.* **81**: 117-43.

www.celldeath.com

www.cellscience.com

www.cnb.csic.es

www.livercancer.com

www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank

Xiong Y., Hannon GJ., Zhang H., Casso D., Kobayashi R., Beach D. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature.* **366**: 701-4.

Yamada Y., Yoshimi N., Hirose Y., Kawabata K., Matsunaga K., Shimizu M. 2000. Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions Licking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **60**: 3323-3327.

Yang E., Zha J., Jockel J. 1995. Bad a heterodimeric partner for Bcl-2Xl and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell.* **80**: 285-291.

Yoque G. 1969 Los taninos vegetales. Ministe de agricultura. Madrid España

Young GP. y Gibson PR. 1994. Butyrate and colorectal cancer cell. En: Cummings, J., Binder, H.J., Soergel, K., editors. Short chain fatty acids. Bostonn: *Kluwer Academic Publishers*: 148-160.

Young-Ho K., Jong-Wook P., Jai-Youl L., Taeg-Kyu K. 2004. Sodium butyrate sensitizes TRAIL-mediated apoptosis by induction of transcription from the DR5

gene promoter through Sp1 sites in colon cancer cells. *Carcinogenesis*. **25** (10): 1813-1820.

Yu JL., Rak JW., Coomber BL., Hicklin DJ., Kerbel RS. 2002. Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science*. **295**: 1526-1528.

Zhang HS., Gavin M., Dahiya A., Postigo AA., Ma D., Luo RX., Harbour JW., Dean DC. 2000. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell*. **101**: 79-89.

Zhao C., Giusti MM., Malik M., Moyer MP. y Magnuson BA. 2004. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *J Agric Food Chem*. **52**: 6122-6128.

Zhao G., Nyman M., Jönsson JA. 2006. Rapid determination of short chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water extraction and direct injection gas chromatography. *Biomed Chromatogr*. **20**(8): 674-82.

Zou H., Henzel WJ., Liu X., Lutschg A., Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. **90**, 405-413.

XI. ANEXOS

La figura 45, muestra la curva de calibración de mg de rafinasa, donde se obtuvo un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9997$. La ecuación obtenida fue de $y = 0.0101x - 0.0988$ con una $\alpha = 0.005$.

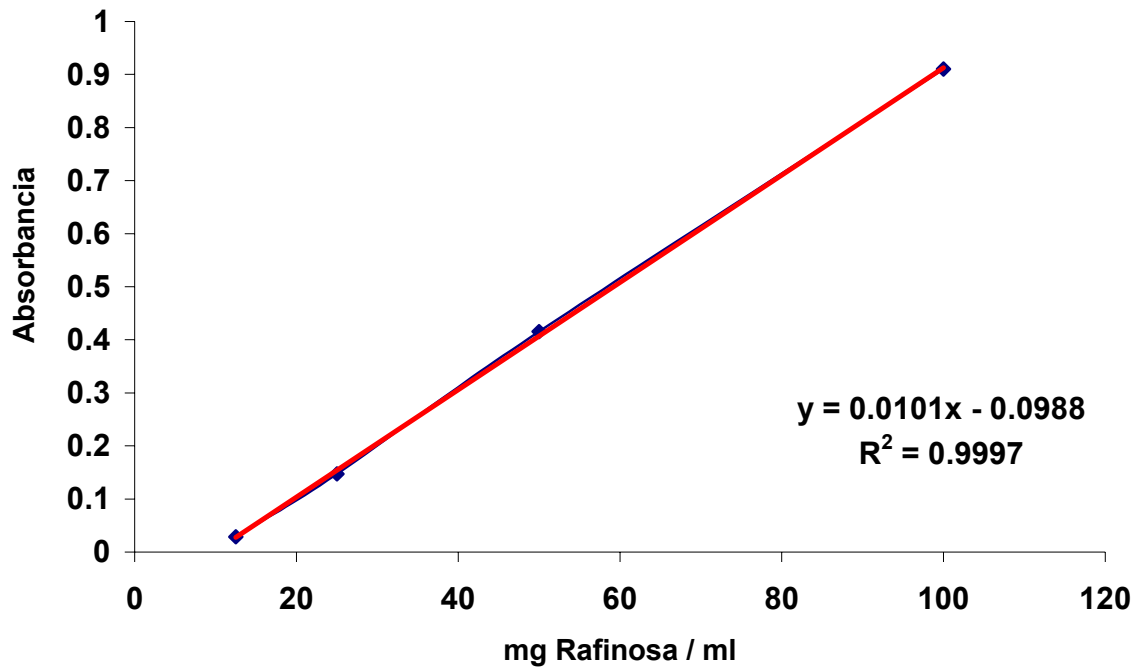


Figura 45. Curva de calibración mg equivalentes de rafinasa. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes con tres réplicas \pm error estándar.

En la figura 46, la ecuación que se obtuvo es la siguiente $y = 0.4919x + 0.0011$, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9977$ y $\alpha = 0.005$, para la curva de calibración de mg (+) Catequina.

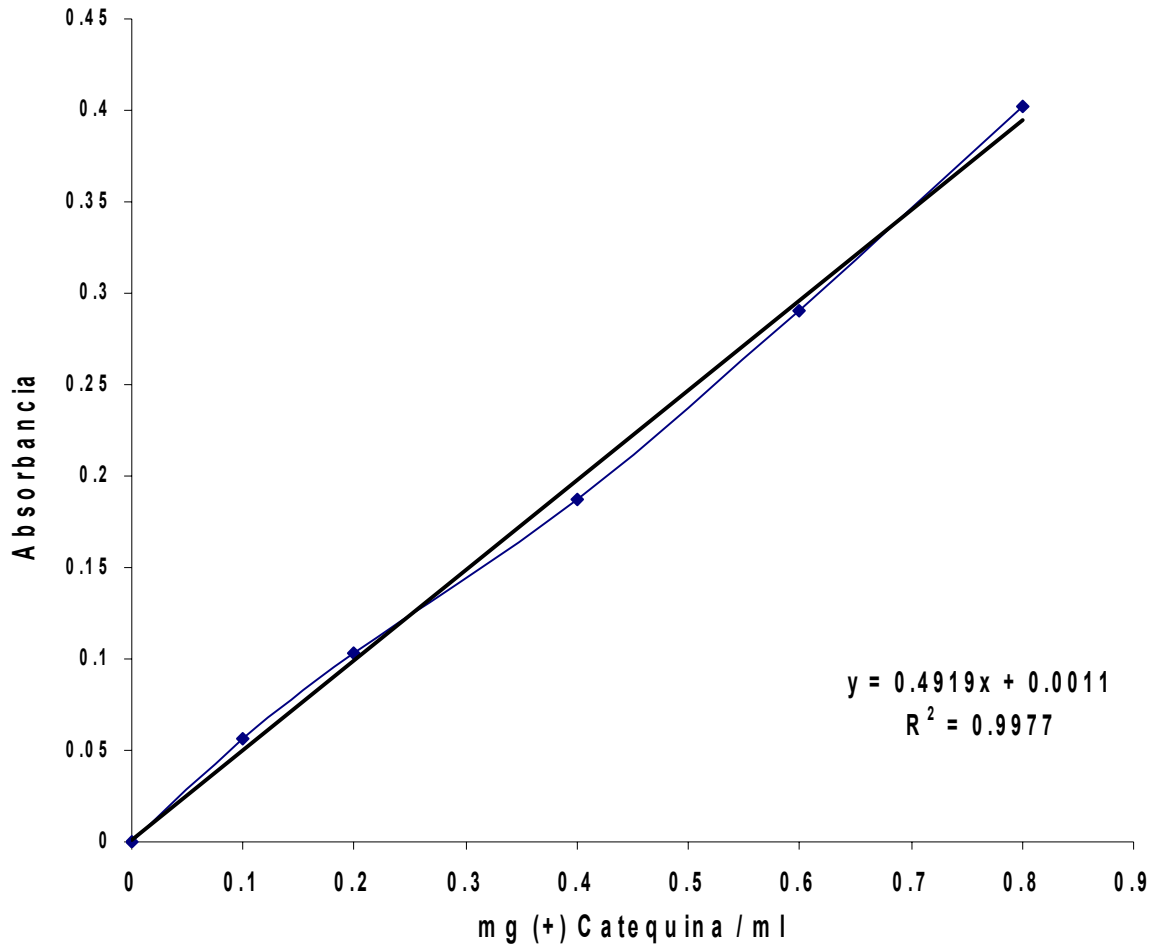


Figura 46. Curva de calibración de mg (+)-catequina. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes con tres réplicas \pm error estándar.

La figura 47, muestra la curva de calibración de flavonoides totales, donde se obtuvo la siguiente ecuación, un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9994$., $y = 0.0066x + 0.0585$ con $\alpha = 0.005$.

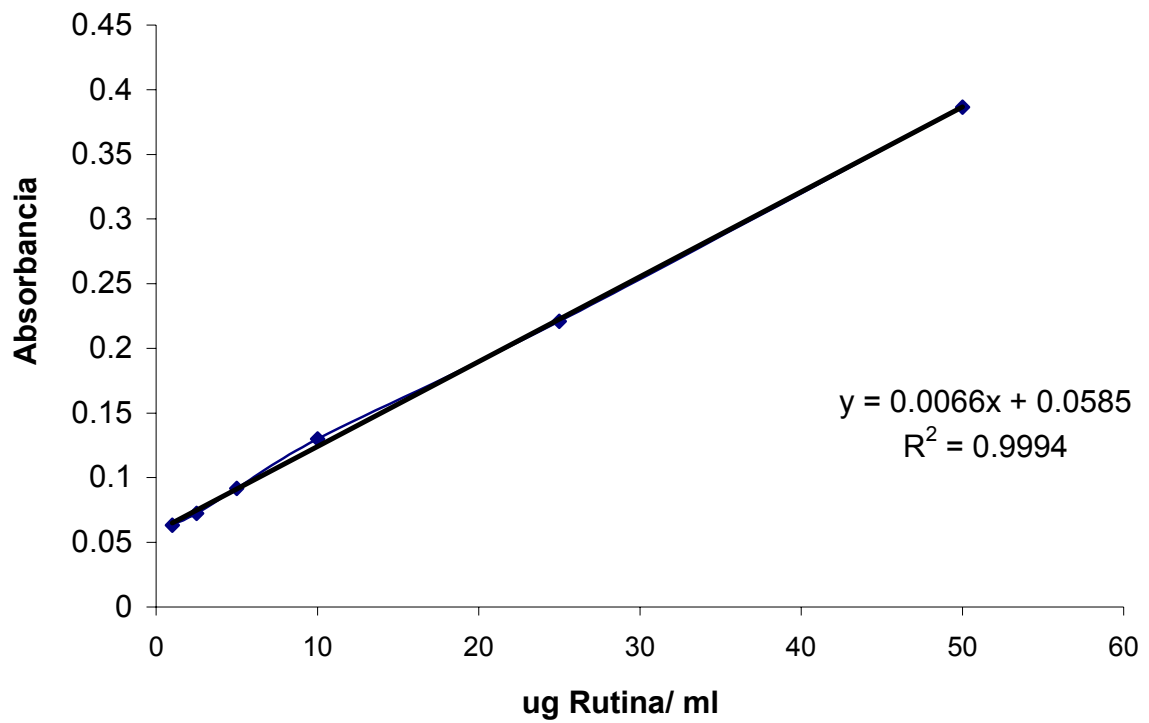


Figura 47. Curva de calibración de flavonoides totales, expresado en μg equivalentes de rutina. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes con tres réplicas \pm error estándar.

Se cuantificaron los AGCC utilizando una curva estandarizada para cada uno de los ácidos de interés que se muestra en la figura 48. La ecuación que se obtuvo para el ácido acético es la siguiente $y = 20.356x + 82.641$, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9929$, en el caso del ácido propiónico se obtuvo una ecuación $y = 30.67x + 72.614$ con $R^2 = 0.9926$ y por último para el ácido butírico la ecuación es de $y = 35.353x + 70.875$, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9937$, en todos los casos con $\alpha = 0.005$.

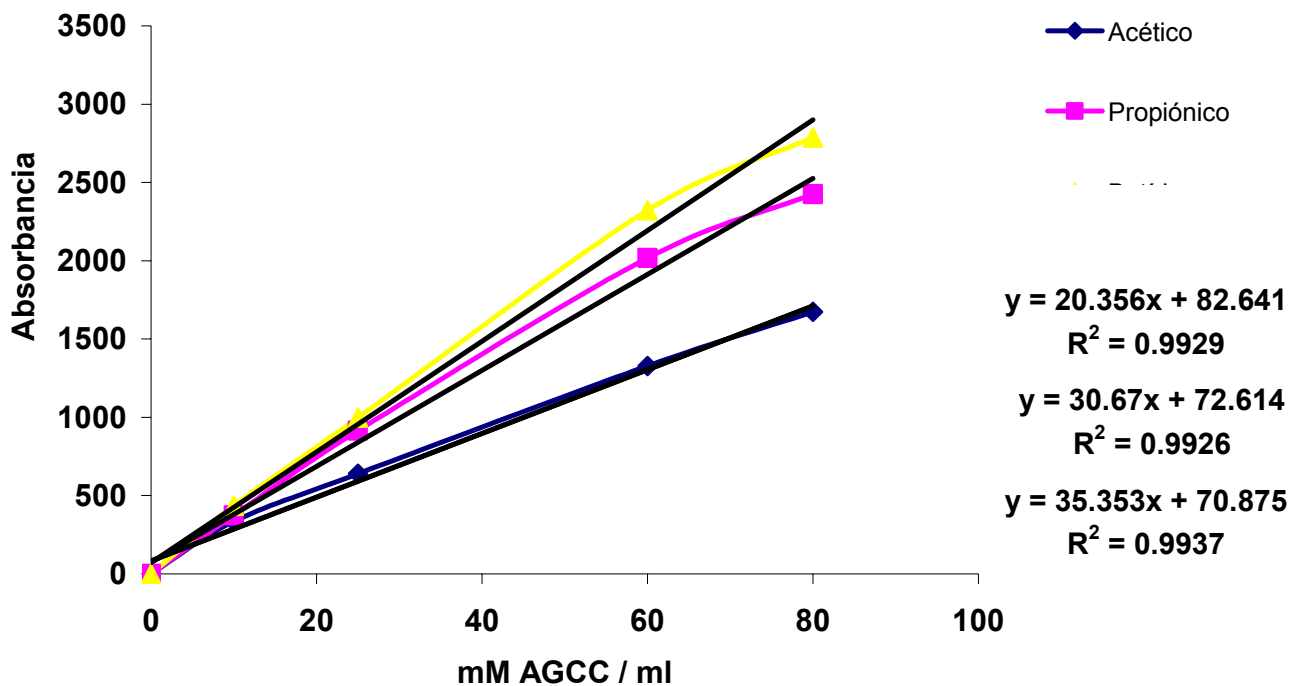


Figura 48. Curva de calibración de ácidos grasos de cadena corta. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes con tres réplicas \pm error estándar.

Cuadro 23. Utilidad del gel de agarosa respecto a su concentración

GEL % AGAROSA	PESO DE AGAROSA (g)	UTILIDAD
0.8	0.8	ADN genómico
1	1	Para productos digestión
1.2	1.2	Para productos PCR

(Sambrook *et al.*, 1989).

Cuadro 24. Mezcla de reactivos para amplificación de los genes de interés por PCR.

REACTIVOS	CANTIDAD (μL)	CONCENTRACIÓN
H ₂ O	18.15	-
Taq Platinum	0.1	
Buffer 10 X Minus Advantage 2 PCR	2.5	10 X
Mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's)	0.5	2.5 mM
Buffer MgCl ₂	0.75	1 U/ μ L
Primer Forward para cada gen	1.0	10 μ molar
Primer Reverse para cada gen	1.0	10 μ molar

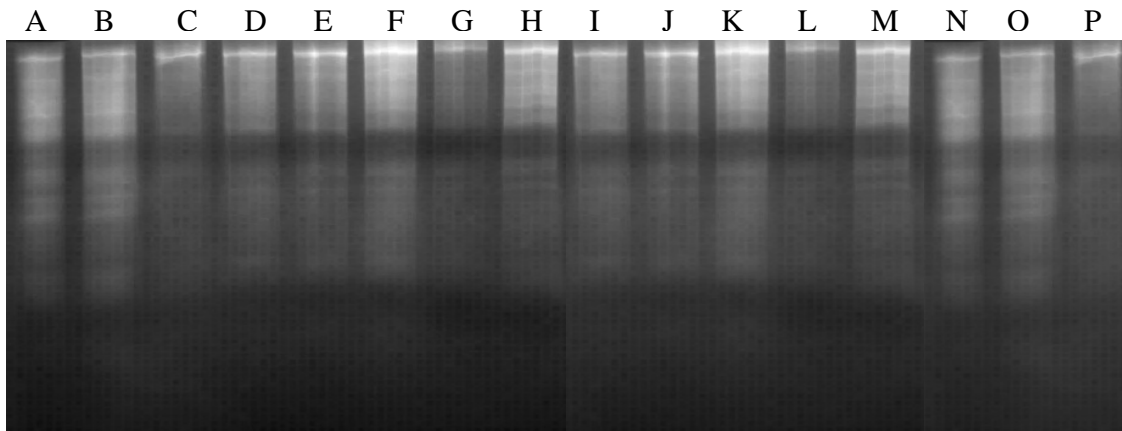


Figura 49. ARN de las zonas estudiadas (proximal y distal) de los tratamientos de frijol, EP y NaBu. **A.** Proximal control, **B.** Distal control, **C.** Proximal AOM, **D.** Distal AOM, **E.** Proximal EP + AOM, **F.** Distal EP + AOM, **G.** Proximal EP, **H.** Distal EP, **I.** Proximal NaBu, **J.** Distal NaBu, **K.** Proximal NaBu + AOM, **L.** Distal NaBu + AOM, **M.** Proximal Frijol, **N.** Distal Frijol, **O.** Proximal Frijol + AOM, **P.** Distal Frijol + AOM.

Cuadro 25. Concentración de ARN de las zonas colónicas proximal y distal de los tratamientos de frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu por dos métodos de cuantificación.

Muestra	BIOFOTOMETRO	FLUOROMETRO
	Eppendorf (ng/ μ L)	Turner Biosystems (ng/ μ L)
A) Proximal control	467	483.9
B) Distal control	171	209.8
C) Proximal AOM	977.2	1340
D) Distal AOM	625.9	986.9
E) Proximal EP +AOM	628.9	1076
F) Distal EP + AOM	286.5	435.4
G) Proximal EP	178.2	214
H) Distal EP	92.2	61.71
I) Proximal NaBu	754.4	1092
J) Distal NaBu	523.2	1225
K) Proximal NaBu + AOM	164.9	144.1
L) Distal NaBu + AOM	713.1	1604
M) Proximal Frijol	646.8	861.9
N) Distal Frijol	650.5	1111
O) Proximal Frijol + AOM	512.3	475
P) Distal Frijol + AOM	142.7	302.6

Cada valor representa la media de tres réplicas con tres repeticiones

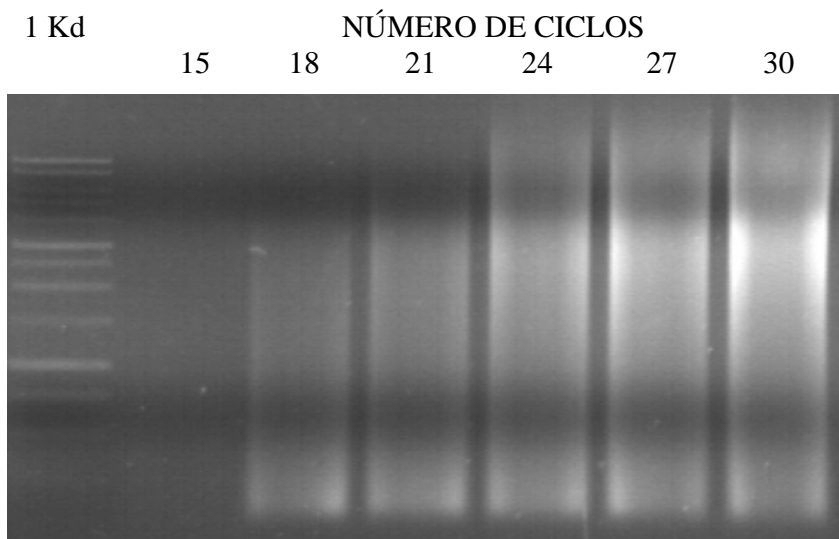


Figura 50. Ejemplo de la optimización de ciclos para ADNc.

En la siguiente figura (51), se muestran los ciclos óptimos para cada una de las muestras.

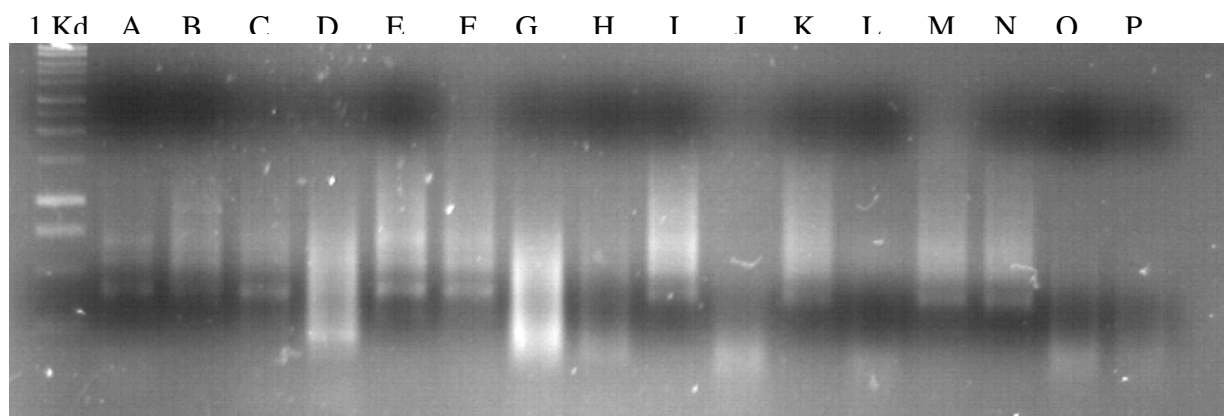


Figura 51. Optimización de ciclos para ADNc en cada una de las muestras. **A.** Proximal control, **B.** Distal control, **C.** Proximal AOM, **D.** Distal AOM, **E.** Proximal EP + AOM, **F.** Distal EP + AOM, **G.** Proximal EP, **H.** Distal EP, **I.** Proximal NaBu, **J.** Distal NaBu, **K.** Proximal NaBu + AOM, **L.** Distal

CONCENTRACION DE ARN (61.17 ng/ μ L)

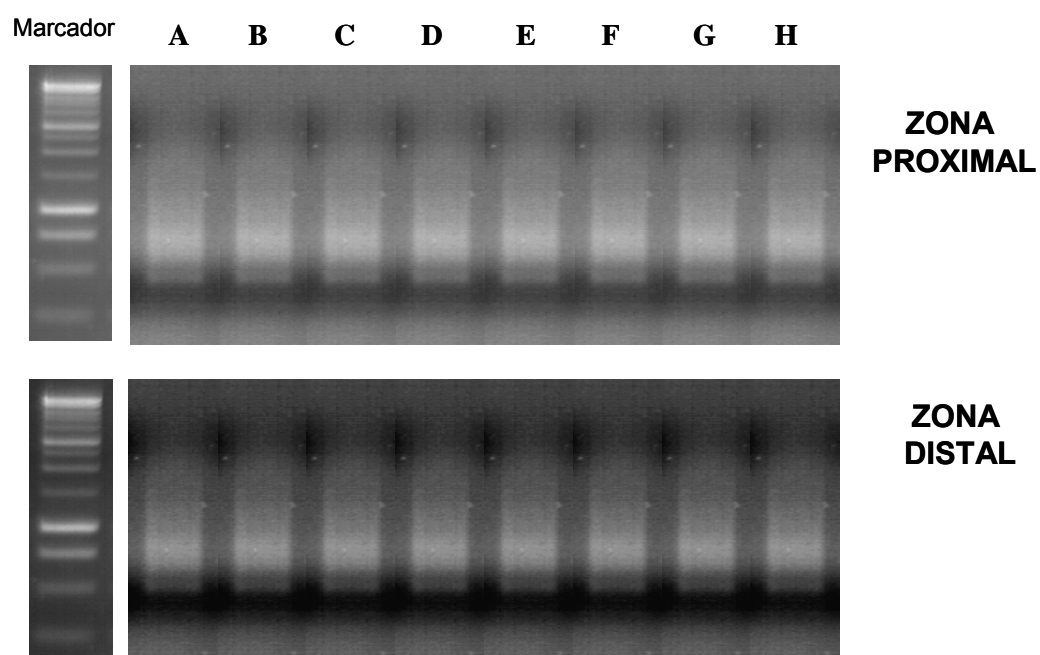


Figura 52. Visualización de la concentración de ARN utilizado de los diferentes tratamientos de frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu tanto de la zona proximal como de la zona distal. A = Control., B = AOM., C = EP+AOM., D = EP., E = NaBu., F = NaBu+AOM., G = Frijol., H = Frijol+AOM.

A. Soluciones para Western Blot

A.I Solución Amortiguadora para Extracción de Proteínas

a) Reactivos

pH 7.5	NaF 500 mM
Hepes 500 mM	EDTA 20 mM
NaCl 1500 mM	PMSF 60 mM
NaPP 100 mM	NP-40 1%
Na ₃ VO ₄ 200 mM	Glicerol 10%
MgCl ₂ 10 mM	CaCl ₂ 25 mM

b) Activación de Na₃VO₄

Se realizan los calculos para la concentración deseada, se ajusta el pH a 10, usando NaOH 1N o HCl 1 N (la solución se torna amarilla). Esta solución se calienta a ebullición hasta obtener una solución transparente, se enfría y reajusta el pH a 10, se repite esta operación hasta que la solución sea totalmente transparente y el pH estable. Finalmente se alicuota y congela.

c) Preparación de la Solución Amortiguadora

En un matraz aforado se agregaron 100 µL de solución HEPES 500 mM, 100 µL de NaCl 1500 mM, 100 µL de NaPP 100 mM, 100 µL de MgCl₂ 10 mM 40 µL de CaCl₂ 25 mM, 20 µL de NaF 500 mM, 100 µL de EDTA 20 mM, 66.60 µL de solución PMsF 60 mM, 10 µL de solución NP40 1%, 10 µL de Na₃VO₄ 200 mM y 100 µL de glicerol 10% el volumen restante es completado con agua HPLC (estos calculos son para 1 mL de solución amortiguadora). La solución amortiguadora debe mantenerse en hielo durante su uso.

Cuadro 26. Concentración de los geles para electroforesis

	Gel separador 10%	Gel condensador 3%
Acrilamida-bisacrilamida	2.49 mL	-----
Acrilamida	-----	0.6 mL
Tris-HCl-SDS	2.5 mL	1.5 mL
Glicerol	1.0 mL	-----
H ₂ O °HPLC	1.5 mL	3.9 mL
Persulfato de amonio	25 µL	40 µL
Temed	2.5 µL	4 µL

A.2 Cuantificación de Proteínas

a) Curva de Calibración de Proteínas

Preparar albúmina a una concentración de 1 mg/mL en un tubo de 1 – 1.5 mL de acuerdo a las siguientes concentraciones:

Concentración (μg)	Vol de Albúmina (μL)	Vol de H ₂ O HPLC (800 μl) (μL)
2	2	798
5	5	795
8	8	792
11	11	789
14	14	786
17	17	783
20	20	780

La concentración de proteína se calculó extrapolando los resultados a una curva de albúmina (Figura 53)

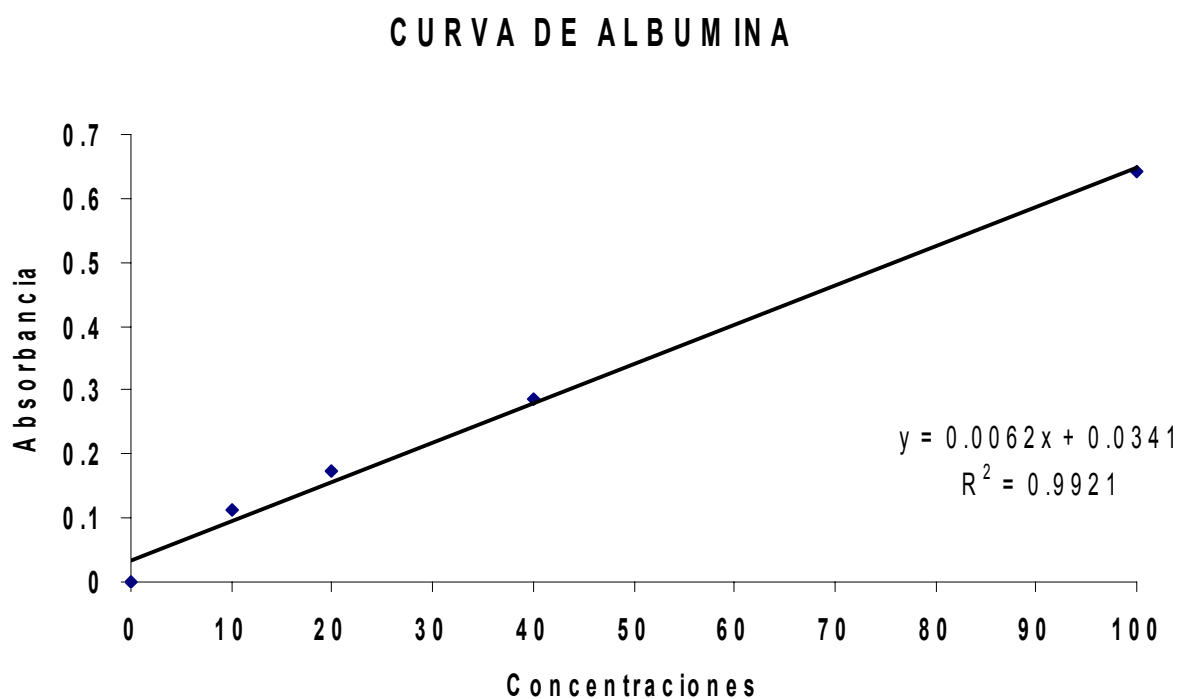


Figura 53. Curva de calibración de albúmina sérica bovina para proteína. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes con tres réplicas \pm error estándar.

Cuadro 27. Concentración de proteína en la zona proximal y distal del colon de los tratamientos de frijol, extracto de polisacáridos (EP) y NaBu por el método de Lowry.

Muestra	Zona Proximal	Zona Distal
Control	34.34	65.25
NaBu	95.0	22.08
Frijol	35.95	81.16
EP	58.37	78.4
AOM	54.15	73.85
NaBu + AOM	20.95	22.88
Frijol + AOM	25.32	72.24
EP + AOM	84.23	74.28

La concentración de proteína expresada en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Cada valor representa la media de tres réplicas con tres repeticiones por espectrofotometria

A.3 Electroforesis SDS-PAGE

a) Reactivos

Acrilamida 30%	Persulfato de amonio 10%
Bis-acrilamida 0.938%	Solución Digestora
Tris 3 M – HCL 1 M – SDS 0.3%	Mercaptoetanol
Glicerol 79.5% (v/v)	Azul de Bromofenol
Solución de electroforesis inferior	Solución de electroforesis superior

b) Gel Separador 10%

Se mezclan los reactivos: Acrilamida 30%, Bis-acrilamida 0.938%, Tris 3 M – HCl 1 M – SDS 0.3%, Glicerol 79.5%, H₂O HPLC, Persulfato de amonio 10% y Temed, la mezcla debe mantenerse en hielo.

c) Gel de Condensación

Se mezclan los reactivos: Acrilamida 30%, Bis-acrilamida 0.938%, Tris 3 M – HCl 1 M – SDS 0.3%, H₂O HPLC, Persulfato de amonio 10% y Temed, la mezcla debe mantenerse en hielo.

b) Reactivos y Preparación de la Solución Digestora

SDS 10%	Azul de bromofenol 0.02%
Glicerol 30%	Mercaptoetanol 4%
Tris-HCl 100 mM	

Mezclar los reactivos en el siguiente orden: SDS 10%, Glicerol 30%, tris-HCL 100 mM, Mercaptoetanol 4% y Azul de Bromofenol 0.02%. A las muestras se les agrega la solución digestora a la misma proporción (v/v), se colocan en baño María por 20 minutos a 60°C. Posteriormente se colocan en hielo.

d) Electroforesis

Se monta la cámara para hacer geles y se comprueba que no existan fugas, se coloca primero el gel separador y se deja solidificar por aproximadamente 20 minutos. Ya solidificado se agrega el gel de condensación, se coloca el peine y se marcan los pozos. Ya solidificado, se lavan los pozos con la solución de electroforesis superior y se dejan llenos con éste. Se cargan las muestras en el gel (15 a 25 µL). Se debe colocar 4 µL del marcador o estándar para verificar el peso molecular de la proteína de interés. Se corre el gel a 120 volts por 180 minutos a 4°C.

A.4 Transferencia Semi Seca

a) Reactivos

Solución de transferencia	Solución para desteñir
Solución para teñir membrana	Metanol

b) Procedimiento

Una vez terminada la electroforesis se despegó el gel y se lavó dos veces con solución de transferencia por 10 minutos. Se activo la membrana de

PVF en metanol y se colocó en solución de transferencia. Terminados los lavados se coloca el gel y la membrana en la cámara de transferencia en el siguiente orden:

- 1.- Tres papeles filtro húmedos con solución de transferencia
- 2.- Membrana activada
- 3.- Gel
- 4.- Tres papeles filtro húmedos con solución de transferencia

Se cerró la cámara y se programa a 15 volts por 20 minutos. Al terminó se marcó la membrana y se tiñó con rojo de ponsuo

A.4 Western Blot

a) Reactivos

Tris – HCl pH 8 1 M

Solución Bloqueadora 5, 7, 10%

TBS / TTBS

Solución de Quimioluminiscencia

b) Procedimiento

La membrana se activo con metanol y H₂O HPLC, se bloqueo toda la noche con solución bloqueadora 10%, posteriormente fue incubada con el primer anticuerpo por 3 horas en agitación constante a temperatura ambiente. Al término de la incubación se realizaron 6 lavados de 5 minutos con TTBS y 2 lavados de 10 minutos cada uno. Finalmente se realizaron 2 lavados con solución bloqueadora 5% de 10 minutos. Se incubó el segundo anticuerpo por 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante, se realizó la misma serie de lavados con excepción de la solución bloqueadora. Se preparó la solución de quimioluminiscencia y se procedió al revelado en el cuarto oscuro. La exposición de la película con la membrana en presencia de la solución de quimioluminiscencia vario de proteína a proteína evaluada.

Composition and Chemopreventive Effect of Polysaccharides from Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on Azoxymethane-Induced Colon Cancer

ANA A. FEREGRINO-PÉREZ,[†] LAURA C. BERUMEN,[§]
 GUADALUPE GARCÍA-ALCOCER,[§] RAMÓN G. GUEVARA-GONZALEZ,[#]
 MINERVA RAMOS-GOMEZ,[†] ROSALÍA REYNOSO-CAMACHO,[†]
 JORGE A. ACOSTA-GALLEGOS,[⊥] AND GUADALUPE LOARCA-PIÑA^{*,†}

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC), Research and Graduate Studies in Food Science, School of Chemistry, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qro. 76010, Mexico; Facultad de Química and Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qro, Mexico; and Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío (INIFAP; Celaya), Guanajuato, Mexico

Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) contain a high proportion of undigested carbohydrates (NDC) that can be fermented in the large intestine to produce short-chain fatty acids (SCFA) such as acetate, propionate, and butyrate. The objective of the present study was to evaluate the composition and chemopreventive effect of a polysaccharide extract (PE) from cooked common beans (*P. vulgaris* L.) cv. Negro 8025 on azoxymethane (AOM) induced colon cancer in rats. The PE induced SCFA production with the highest butyrate concentrated in the cecum zone: 6.7 ± 0.06 mmol/g of sample for PE treatment and 5.29 ± 0.24 mmol/g of sample for PE + AOM treatment. The number of aberrant crypt foci (ACF) and the transcriptional expression of *bax* and *caspase-3* were increased, and *rb* expression was decreased. The data suggest that PE decreased ACF and had an influence on the expression of genes involved in colon cancer for the action of butyrate concentration.

KEYWORDS: Polysaccharide; *Phaseolus vulgaris*; short-chain fatty acid; aberrant crypt foci

INTRODUCTION

Considerable variability exists in common beans for seed characteristics, and consumers have developed specific preferences for various combinations of size, shape, and color of the dry seeds (1). Common beans are a good source of protein, some vitamins, minerals, and complex carbohydrates (2). In addition to these nutritional compounds, common bean seeds contain a number of bioactive substances including enzyme inhibitors, lectins, phytates, polyphenolic compounds (such as condensed tannins and flavonoids), and polysaccharides. Polysaccharides reaching the colon include mainly resistant starch (RS), soluble and insoluble fiber, and nondigestible oligosaccharides (NDO) that play metabolic roles in humans or animals that frequently consume these foods (3). For example, polysaccharides can be fermented in the colon to produce short-chain fatty acids (SCFA) such as acetic, propionic, and butyric acids, and

these SCFA have been shown to decrease the incidence of colon cancer induced by azoxymethane (AOM) (4). Aberrant crypt foci (ACF) are being used as a short-term assay to identify modulators of colon carcinogenesis (5). Several studies reported that SCFA, mainly butyrate, inhibited colon cancer through modulation of genes involved in cellular proliferation and induced cell cycle arrest or even apoptosis of colonocytes (6). Butyrate up-regulates *B-catenin* signaling (7), increases the expression of the *p21* cell cycle independent of the expression of *p53* (8), and up-regulates expression of the active subunits of *caspase-3*. Butyrate also causes a concomitant decrease in *bcl-2* expression and an increase in *bax* gene expression via mitochondrial protein (9). In addition, many researchers have reported that polyphenols from dry beans may act as antioxidants to inhibit the formation of damaging free radicals (10). Furthermore, flavonoids such as condensed tannins and anthocyanins have been reported as antioxidant and antimutagenic agents (10, 11). The presence of these bioactive compounds in common beans (*Phaseolus vulgaris*) is related to the decrease of chronically degenerative diseases.

The objective of this research was to determine the composition of bioactive substances including nondigested carbohydrates and polyphenolics by a rapid method adapted to a 96-well microplate and to evaluate the chemopreventive effect of a

* Author to whom correspondence should be addressed (e-mail loarca@uaq.mx or FlaviaLoarca@yahoo.com.mx; telephone +52 (442) 192-1304; fax +52 (442) 192-1307).

[†] Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC), Universidad Autónoma de Querétaro.

[§] Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.

[#] Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro.

[⊥] Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.

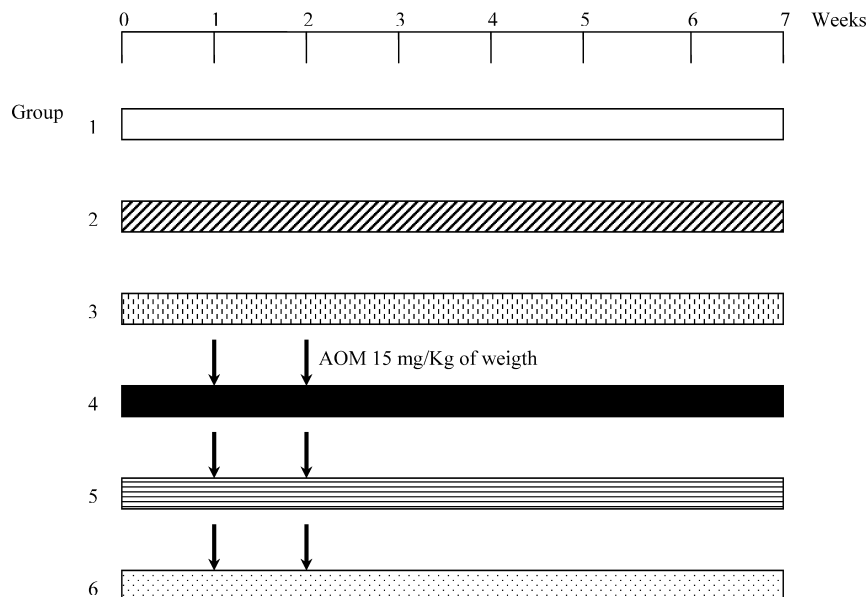


Figure 1. Experimental protocol for animal treatment. The animals were sacrificed 5 weeks after the last injection. Groups: (1) basal diet; (2, 3) basal diet cooked common bean (3.2 g) and PE (1.84 g) per kg of weight, respectively; (4) basal diet plus AOM; (5, 6) basal diet plus AOM with common bean and PE, respectively.

Table 1. Sequence of Primer Sets Used during This Study

gene	sense and antisense	amplified fragment size (bp)
<i>caspase-3</i>	5'-TTCATCATTGACCTGC-3' 3'-ACGGGTAAGGATGTCATGAAT-5'	247
<i>p21</i>	5'-GGACAGTGAGCAGTTGAGC-3' 3'-GAGTGCAAGACAGCGACAAGG-5'	288
<i>p53</i>	5'-GCAGCACAGGAACCTGGAAC-3' 3'-ATGATGGTAAGGATGGGC-5'	582
<i>bcl-2</i>	5'-GGGAGAACAGGGTATGATAAC-3' 3'-GCAGATGCCGGTTCAGGTA-5'	540
<i>bax</i>	5'-GGCCACCAGCTCTGAACAGT-3' 3'-TCAGCTCGGGCACTTTAG-5'	370
<i>rb</i>	5'-CAGATTTGATACCTCAGACCTCT-3' 3'-ACACTTGTATGAGGAAAAC-5'	364
<i>β-catenina</i>	5'-GCTGACGTCGTA-3' 3'-TCCACATCCTCTCAGG-5'	211
<i>gadph</i>	5'-GCTCCTACCATTGCTGACA-3' 3'-TCAAGACGAATAA-5'	291

polysaccharide extract (PE) from cooked common beans (*P. vulgaris* L.) cv. Negro 8025 on colon cancer induced by azoxymethane.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Standards. Common beans (*P. vulgaris* L.) cv. Negro 8025, grown and harvested in 2005, were kindly provided by the Bean Project of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, Mexico). The beans were stored at room temperature until processing. (+)-Catechin, vanillin, D-(+)-raffinose, rutin, tannic acid, and AOM were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Sample Processing. Beans were cooked according to the method of Aparicio-Fernández et al. (10). Fifty grams of beans was placed in a beaker with 250 mL of HPLC-grade water and boiled for 2.5 h. Cooked beans were lyophilized and stored in amber flasks at 4 °C for further analyses.

Table 2. Protein, Carbohydrate, Dietary Fiber, Polysaccharides, Oligosaccharides, Fat, and Ash Contents of Raw and Cooked Common Beans (*P. vulgaris* L.) Cv. Negro 8025^a

	raw bean	cooked bean
fat	1.54 ± 0.06 a	1.41 ± 0.01 a
ash	4.32 ± 0.005 a	4.14 ± 0.15 b
protein ^b	20.99 ± 0.43 a	23.15 ± 0.07 a
carbohydrate ^b	59.83 ± 0.27 b	71.85 ± 0.22 a
polysaccharides ^b	63.7 ± 0.02 a	57.5 ± 0.05 b
dietary fiber ^b		
total fiber ^b	28.41 ± 0.31 a	26 ± 0.4 b
soluble fiber ^b	3.34 ± 0.29 b	6.00 ± 0.01 a
insoluble fiber ^b	25.07 ± 0.03 a	20 ± 0.03 b
resistant starch	33.0 ± 0.01 a	30.8 ± 0.02 a
oligosaccharides ^c	5.00 ± 0.06 b	6.8 ± 0.48 a

^a The results represent the average of two independent experiments by triplicate ± standard error, expressed as mg/g of lyophilized sample. Different letters by row express significant differences $\alpha = 0.05$, Tukey test. ^b Percentage per gram of sample lyophilized. ^c Milligram equivalent of raffinose per gram of sample lyophilized.

Analytical Methods. Moisture, protein, fat, carbohydrate, sodium, crude fiber, dietary fiber, and ash contents of raw and cooked beans were analyzed according to methods of the Association of Official Analytical Chemists (12). All measurements were performed in triplicate.

Extraction of Polysaccharides. The extraction of polysaccharides was performed following the method of Kurtzman and Halbrook (13). Three hundred grams of the cooked beans (beans and cooking water) was ground and sieved through a 0.05 cm mesh screen, 1.5 L of water was added, and this was shaken for 1 min and centrifuged (Hermel Z323K USA) at 9000g for 10 min. The pellet from the first centrifugation was dissolved in 100 mL of 10% tannic acid, and the pH was adjusted to 4.0; then the sample was centrifuged at 9000g for 10 min, and the pellet was washed three times with 100 mL of acetone, centrifuged for 10 min between each of the washings to obtain the polysaccharide extract (PE). PE samples were lyophilized and stored in amber flasks at 4 °C until further analyses.

Extraction and Quantification of Oligosaccharides. The extraction and quantification were done according to the methods of Gulewicz et al. (14) and Brenes et al. (15) with modifications. Briefly, 10 mg of raw and cooked beans was extracted with 80% v/v aqueous ethanol (10 mL) for 5 min using a magnetic stirrer at room temperature and centrifuged (Hermel Z323K USA) at 5000g for 5 min. The recovered

Table 3. Quantification and Validation of Condensed Tannins and Total Flavonoids in Different Extracts from Common Bean (*P. vulgaris*) Cv. Negro 8025^a

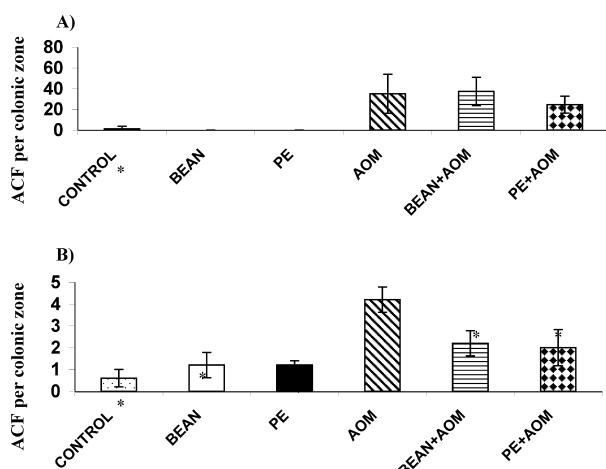
sample ^c	condensed tannins			total flavonoids ^b		
	not fortified	fortified	recovery (%)	not fortified	fortified	recovery (%)
raw bean ¹	21.04 ± 1.89 b	48.18 ± 2.51 b	80 c	1.9 ± 0.5 a	35.44 ± 1.6 a	94.0 a
cooked bean ²	15.15 ± 1.53 c	42.78 ± 1.31 c	79 d	1.8 ± 0.1 a	35.38 ± 1.7 a	94.1 a
PE ³	9.11 ± 0.27 d	14.43 ± 2.32 d	80.4 b	1.6 ± 0.4 a	34.63 ± 1.2 a	92.6 a
ME ⁴	858.25 ± 37.63 a	887.82 ± 4.89 a	94.79 a	ND	ND	ND

^a PE, polysaccharides extract; ME, methanolic extract of common bean; ND, not determined. Each value is the mean of four independent experiments in triplicate ± standard error. Different letters in each column express significant difference ($\alpha = 0.05$) by Tukey test. ^b Samples were fortified with 35.8 mg of rutin. Total flavonoids are expressed as mg equiv of rutin/g of lyophilized sample. ^c Samples were fortified with ¹39.18, ²39.01, ³8.84, or ⁴78.37 mg of (+)-catechin. The condensed tannins are expressed as mg equiv of (+)-catechin/g of lyophilized sample.

Table 4. SCFA in Cecum, Colon, and Feces^a

group	SCFA (mM/g of sample)								
	cecum			colonic			feces		
	acetate	propionate	butyrate	acetate	propionate	butyrate	acetate	propionate	butyrate
control	29.54 ± 1.1 d	6.34 ± 0.1 ab	6.52 ± 0.1 a	32.31 ± 1.3 a	6.33 ± 0.09 bc	5.45 ± 0.03 a	35.24 ± 0.4 ab	3.07 ± 0.01 d	3.56 ± 0.01 e
bean	37.10 ± 0.71 ab	6.36 ± 0.3 ab	6.20 ± 0.07 ab	31.70 ± 1.6 a	5.80 ± 0.14 d	4.73 ± 0.05 c	33.14 ± 0.4 bc	4.89 ± 0.03 b	3.80 ± 0.01 cd
PE	35.25 ± 0.1 bc	6.92 ± 0.08 a	6.70 ± 0.09 a	31.15 ± 0.4 a	4.92 ± 0.11 e	5.30 ± 0.09 ab	32.84 ± 0.3 bc	3.92 ± 0.18 c	3.99 ± 0.05 bc
AOM	35.97 ± 1.2 abc	6.69 ± 0.1 ab	6.12 ± 0.1 ab	33.85 ± 1.8 a	6.15 ± 0.02 cd	4.87 ± 0.03 bc	32.91 ± 0.7 bc	4.97 ± 0.03 b	3.66 ± 0.04 de
bean + AOM	40.36 ± 1.80 a	5.61 ± 0.1 b	5.40 ± 0.3 c	34.17 ± 1.1 a	7.96 ± 0.03 a	4.60 ± 0.03 c	30.80 ± 1.8 c	5.13 ± 0.14 b	4.02 ± 0.02 b
PE + AOM	32.11 ± 1.77 cd	6.68 ± 0.4 ab	5.29 ± 0.34 c	36.55 ± 0.9 a	4.90 ± 0.10 e	4.72 ± 0.3 c	38.01 ± 0.2 a	7.02 ± 0.14 a	5.49 ± 0.07 a

^a PE, polysaccharides extract; AOM, azoxymethane. Each value is the mean of four independent experiments in triplicate ± standard error. Different letters in each column express significant difference ($\alpha = 0.05$) by Tukey's test.

**Figure 2.** Analysis of aberrant crypt foci (ACF) with methylene blue and Dapi: (A) distal zone stained with methylene blue; (B) distal zone stained with Dapi.

supernatant was stored in the dark at -20°C until further analyses were performed. One milliliter of the supernatant was added to $25\ \mu\text{L}$ of phenol (80% v/v) and mixed. This was followed by the addition of 2.5 mL of concentrated H_2SO_4 and vigorous mixing by shaking (Vortex-2 Genie) for 1 min. The sample was left for 10 min at room temperature and incubated in a water bath ($25\text{--}35^{\circ}\text{C}$) for 15 min. The absorbance of the solution was monitored at 490 nm with a spectrophotometer and compared to a standard curve (1–100 mg of raffinose). Results are expressed as milligrams of raffinose equivalents per gram of sample.

Extraction of Resistant Starch. The resistant starch was extracted according to the procedure described in Shiga et al. (16) and Saura-Calixto et al. (17) with modifications. Six milliliters of 2 M KOH was added to 100 mg of insoluble fiber from lyophilized raw or cooked beans or PE with continuous agitation (HAAKE model SWB20 at 40 rpm) for 30 min at 25°C . Three milliliters of acetate buffer (0.4 M, pH 4.75) was added, and the pH was adjusted to 4.7 with 5 mL of HCl (2 N). Sixty microliters of amyloglucosidase was then added, and the mixture was homogenized and incubated for 30 min at 60°C with continuous agitation (HAAKE model SWB20 at 40 rpm). The samples

were centrifuged (Hermel Z323K USA) at $3000g$ for 15 min. The pellet was resuspended in 10 mL of distilled water, and the centrifugation was repeated to obtain the resistant starch. The resulting samples were lyophilized, and the amount was calculated by difference with respect to the insoluble fiber of the samples.

Extraction of Condensed Tannins. The extraction of phenolic compounds from raw bean seed coats, cooked beans, and cooking water was performed as previously described by Cardador-Martínez et al. (11). A lyophilized sample (200 mg) was placed in a 50 mL flask and mixed with 10 mL of methanol. The flask was protected from light and shaken (HAAKE model SWB20) at 40 rpm for 24 h at 25°C . After incubation, the samples were centrifuged at $4000g$ for 10 min, the methanol was removed by rotary evaporation, and the samples were lyophilized and stored in the dark at -70°C until analysis.

Quantification of Condensed Tannins. Condensed tannins expressed as milligrams of (+)-catechin equivalents per gram of sample (mg of condensed tannins/g) were quantified according to the procedure of Deshpande and Cheryan (18) modified for use with a 96-well plate (microplate). Briefly, $200\ \mu\text{L}$ of vanillin reagent (0.5% vanillin, 4% HCl in methanol) was added to $50\ \mu\text{L}$ of methanolic extract and placed in a 96-well plate; each sample was tested in triplicate. Condensed tannins were quantified at 495 and 540 nm in a microplate reader (Thermo Electron Corp., Multiskan Ascent, model 51118307) using (+)-catechin (up to 0.2 mg/mL) as a reference standard. To correct for potential interference from natural pigments in bean, a blank sample was prepared by subjecting the original extract to the same conditions of reaction without the vanillin reagent.

Flavonoid Content. The spectrophotometric assay for the determination of flavonoid content was quantified according to the method suggested by Oomah et al. (19). Briefly, the method consisted of mixing $50\ \mu\text{L}$ of the methanolic extract with $180\ \mu\text{L}$ of distilled water and $20\ \mu\text{L}$ of a solution of 10 g/L 2-aminoethyldiphenylborate in a 96-well plate. The absorbance of the solution was monitored at 404 nm with a microplate reader (Thermo Electron Corp., Multiskan Ascent model 51118307). A rutin standard was prepared in 80% methanol. Extract absorption was compared with that of a rutin standard curve ($0\text{--}50\ \mu\text{g mL}^{-1}$). Flavonoid content was expressed as milligrams of rutin equivalent per gram of sample.

Recovery and Reproducibility Test. The validation of the microplate assay methods was performed using both recovery and reproducibility tests. For the recovery test, the internal standard [(+)-catechin or rutin] was added to the samples from condensed tannins and

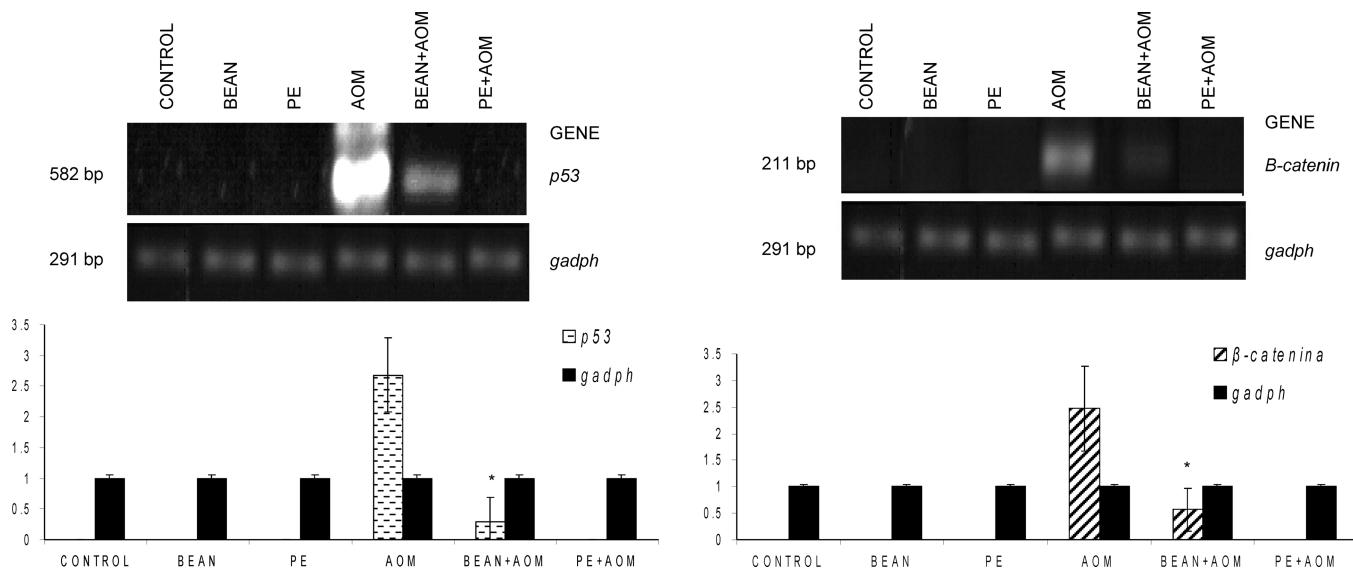


Figure 3. Expression and normalization of genes involved in cellular arrest and apoptosis in distal zone.

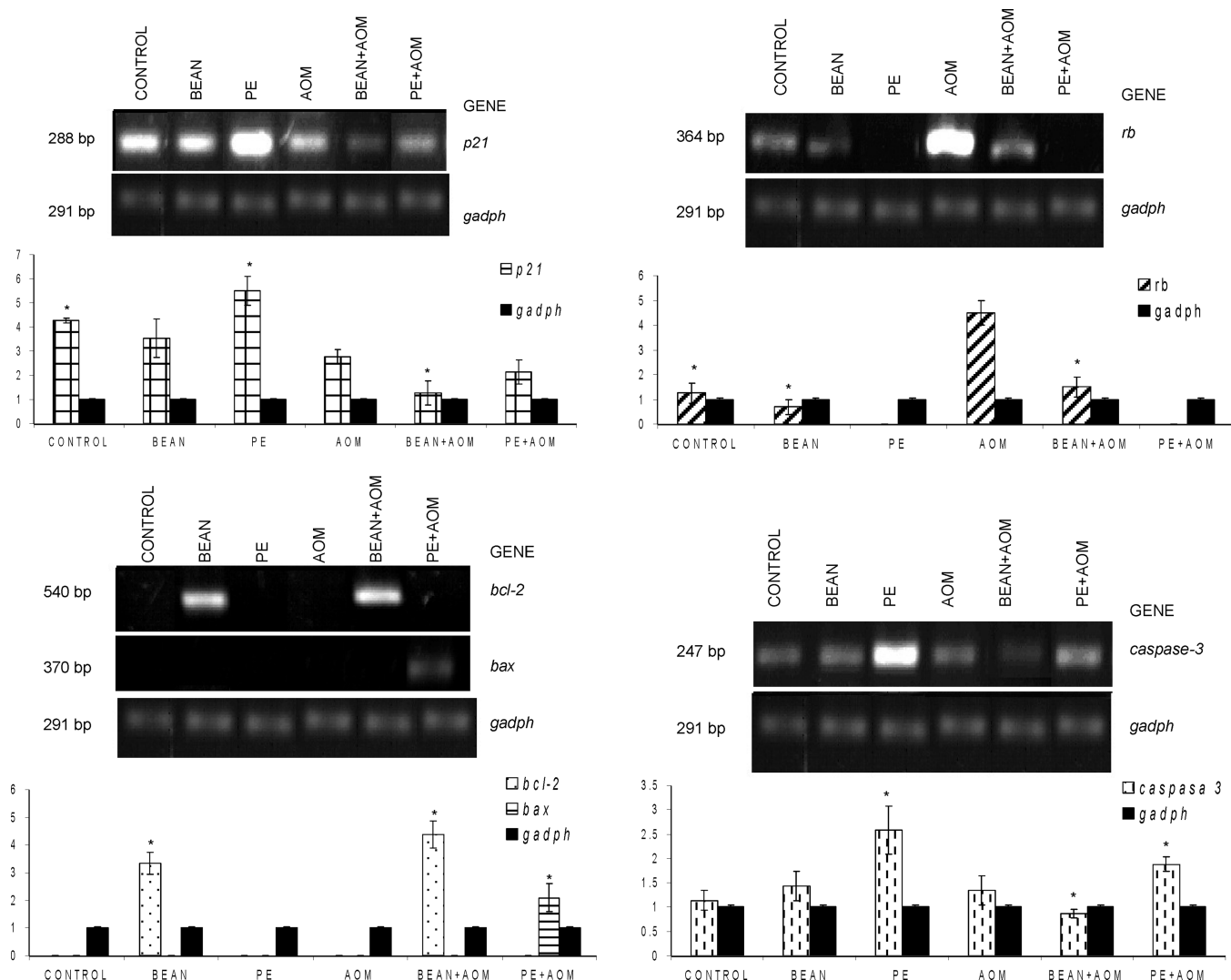


Figure 4. Expression and normalization of genes involved in apoptosis in distal zone.

flavonoid, respectively. The absorbance was monitored in each sample test and determined as the percentage of recuperation of the standard [(+)-catechin or rutin]. For the reproduction tests, both intra-assay and interassay reproducibility of standard and sample were determined. The intra-assay reproducibility was obtained by analyzing the same sample four times in the same day. The interassay test results were determined

by analyzing different samples up to four times. Raw bean, cooked bean, PE samples, and ME were fortified with 39.18, 39.01, 8.84, and 78.37 mg of (+)-catechin, respectively. For the total flavonoid determination, all samples were fortified with 35.8 mg of rutin.

Animal Studies. Sprague-Dawley rats with an initial weight of 79 ± 5 g at 4 weeks of age were used in this study. The rats were

maintained in an air-conditioned animal room with an ambient temperature of 21 °C, 55% humidity, and 12–12 h light–dark cycle. The animals were given free access to a basal diet (2018S Harlan Tekland) and regular tap water. Both cooked beans and PE were administered intragastrically once a day during the experimental period. One week after the acclimation, the rats were randomly placed into six groups ($n = 10$): (1) control, basal diet and water ad libitum; (2) bean, basal diet plus cooked bean (3.2 g/kg of body weight); (3) PE, basal diet plus PE (1.84 g/kg of body weight); (4) AOM, basal diet plus subcutaneous injection of AOM (15 mg/kg of body weight, dissolved in 1 mL of physiological saline) once a week for 2 weeks; (5) bean + AOM, basal diet plus AOM and common bean; and (6) PE + AOM, basal diet plus AOM and PE (Figure 1). All of the animals were sacrificed 5 weeks after the last injection, and the colons were removed from the cecum to the anus. Cecal and colonic contents (midcolon and distal colon) and feces samples were collected at the time the animals were sacrificed, immediately frozen, and stored at -20 °C until analysis. The colon was divided into ascending (proximal) and descending (distal) zones. The distal colon was fixed in phosphate-buffered formalin for further analyses.

SCFA Analysis. One gram of cecal or colon contents or feces samples was suspended in 5 mL of water and homogenized for about 3 min. Each sample was centrifuged (Hermel Z323K USA) at 8000g for 10 min at 4 °C. Eight hundred microliters of the supernatant was adjusted to pH 2.9–3.1 with 1 M HCl, and a 750 μ L portion was transferred to a flask and mixed with 120 μ L of formic acid. A 1.5 μ L aliquot of the resulting material was injected into a gas chromatograph (HP 6890 Plus GC) system coupled to a flame detector. A chromatography column HP (30M), Carbowax 30M, capillary 25.0 m \times 320 μ m \times 0.30 μ m nominal, was used. Helium was supplied as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min. The initial oven temperature was 95 °C, maintained for 2 min, increased to 20 °C, held for 1 min, then increased to 140 °C, and held for 20 min. The amounts of acetic, propionic, and butyric acid were calculated by using standard curves of acetic, propionic, and butyric acid standards, respectively.

ACF Analysis. The colon was removed, washed with PBS, opened longitudinally, and fixed in 10% buffered formalin for at least 24 h. After fixation, the colons were stained with 0.2% methylene blue and examined under a stereomicroscope. ACF were distinguished from adjacent normal crypts by their larger sizes, greater staining intensity, elongated pericryptal area, and thickened layer of epithelial cells according to the method used by Bird (5). Briefly, the distal colon was dissected and embedded in paraffin (20). Paraffin-embedded sections (5 μ m) parallel to the mucosal surface were mounted on slides. The sections were deparaffinized in xylenes and stained with Dapi (20) to identify the ACF. The numbers of ACF were counted and reported as the mean per colon zone.

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The RT-PCR analysis consisted of obtaining the first chain of cDNA according the conditions recommended by the manufacturer (SuperScript One-Step RT-PCR System; Invitrogen, Carlsbad, CA), and the second chain of cDNA was obtained using the following conditions: 95 °C 1 min and then 27 cycles of 95 °C–5 s/65 °C–5 s/68 °C–6 min. Furthermore, specific PCR amplifications were carried out using 1 μ L of each sample obtained above and amplified with specific primers for each evaluated gene in the study (Table 1). RT-PCR reaction mixtures (50 μ L) contained 1 μ L (61.17 ng) of total RNA, 1 μ L of gene-specific sense and antisense primers (10 μ M), 1 μ L of SuperScript II RT/Platinum Taq Mix, 25 μ L of 2 \times Reaction Mix buffer, and 21 μ L of sterile deionized water. In each case, a RT-PCR analysis was carried out for each gene from samples of colonic tissues from rats either treated or untreated with azoxymethane.

Statistical Analysis. Results are expressed as mean \pm standard error. Statistical significance was determined using Tukey's procedure ($\alpha = 0.05$) (21).

RESULTS AND DISCUSSION

Composition of Raw and Cooked Beans. Table 2 shows the protein, carbohydrate, fiber, polysaccharides, oligosaccharides, fat, and ash contents in raw and cooked beans (*P. vulgaris*

L.) cv. Negro 8025. Protein content increased with the cooking process from 20.99 to 23.15%; these levels were in the ranges previously reported (6.25 and 26%) (2, 22, 23). The fat contents were similar in raw (1.54%) and cooked beans (1.41%), and these levels were lower than those in common beans cv. Flor de Mayo as reported by Costa de Oliveira et al. (22) (2.12%) and González de Mejía et al. (1) (2.56%).

Common beans are an important source of carbohydrates and have also been reported to be a good source of dietary fiber. Carbohydrate content increased with cooking (from 59.83 to 71.85%). Our results agree with those reported by Ratnayake et al. (24), Osório-Díaz et al. (25), and Tharanathan and Mahadevamma (26), who demonstrated that the thermal process increased total carbohydrate content including resistant starch. The milling bean process before curing or dehydrating can increase the physical exhibition of the amylose and the amylopectin to interact with other components, thus increasing the content of carbohydrate.

The content of crude fiber in lyophilized beans was 5.95%, in agreement with Costa de Oliveira et al. (22), at 5.7%, and De Almeida Costa et al. (23), at 6.26%. The small variations in fiber content could be explained by the four different cultivars used in those studies.

The concentrations of oligosaccharides in the raw and cooked bean were 5.0 and 6.8 mg/g equiv of raffinose/g of lyophilized sample, respectively. Guillon and Champ (27) showed an interval of 2.6–6.6 mg/g of dry matter, whereas Granito et al. (28) reported 1.7 mg/g of dry matter in a black bean cultivar. The variations could also be explained by genetic differences and environmental growing conditions.

The amounts of total polysaccharides, resistant starch, oligosaccharides, and fiber contents are important due to their implications as health benefits, through the fermentation of these components by the colon bacteria to produce SCFA (29).

Total fiber was statistically different in raw and cooked beans (28.41 ± 0.31 and $26.0 \pm 0.4\%$, respectively) (Table 2). Our results are in agreement with those reported by Granito et al. (28) and Alfonso-González (30), whereas De Almeida Costa et al. (23) reported a range of 19.9–22.6%.

Resistant starch (RS) in raw and cooked bean (33 and 30%, respectively) was not statistically different (Table 2) and agrees with data reported by Shiga et al. (16), whereas Guillon and Champ (27) reported higher RS with a range of 33–35% in raw and cooked bean, respectively. Rehman et al. (31) reported 30.9 and 31.8% RS for two varieties of cooked kidney beans (red and white, respectively). Osorio-Díaz et al. (25), using the same extraction method (17), reported a lower RS content for black (23.5%) and Flor de Mayo beans (24.3%). The differences could be attributed to the different cultivars and growing conditions used in these studies.

In the PE, the RS content was 39.32%, and to our knowledge, this is the first time that RS content has been reported in PE from black beans. RS levels in raw and cooked beans are statistically different, and this could be due to retrogradation of the starch, as was reported by Osorio Díaz et al. (25). Guillon and Champ (27) showed that RS concentration increases with the boiling processes over time or after a cooking–cooling cycle. Additionally, changes in granule structure were measured by X-ray diffraction after soaking, prolonged cooking, and pressure cooking of common white and red kidney beans, where the starch granules from beans were classified as C by X-ray diffraction pattern with 33–35% of starch.

Condensed Tannins and Total Flavonoids. To validate the method of quantification of total phenolics and flavonoids in a

microplate assay, the raw beans, cooked beans, and polysaccharide extracts were fortified with (+)-catechin (in the range 8.84–78.37 mg) and rutin (35.8 mg). Samples were quantified by interpolation of their absorptions in standard curves of (+)-catechin and rutin.

The condensed tannins and total flavonoids in raw beans, cooked beans, and PE are displayed in **Table 3**. A methanolic extract was included as a reference, because the concentration of condensed tannins in cooked bean ME was determined previously (10). In general, the recovery (percent) was acceptable and >70%, being superior for the total flavonoid assay (92.6–94.1%).

Condensed tannins were statistically different in the raw beans, cooked beans, and PE [21.04, 15.15, and 9.11 mg of (+)-catechin, respectively]. Previous studies in the literature demonstrate that total phenolic compounds are dependent on the growing and storage conditions as well as thermal treatment (10, 11). Barroga et al. (32) reported that thermal treatment induced changes in the solubility of phenolic compounds, thus affecting their determinations.

Our results agree with those of other researchers. For example, Guzmán-Maldonado et al. (33) reported 26.5 mg equiv of (+)-catechin for whole bean seeds in the cv. FEB174. Aparicio-Fernández et al. (10) found lower values for the black beans cv. Jamapa [13.76 ± 1.2 and 5.20 ± 0.69 mg equiv of (+)-catechin/g in stored and newly harvested beans 1999 and 2003, respectively]. Oomah et al. (19) reported a concentration of 3.38 mg equiv of (+)-catechin for a black bean cultivar. Those differences can be attributed to the climatic conditions during the growing season, or the type of soil used where the beans were grown, as well as the bean genotype and the storage conditions. To our knowledge, this is the first report on tannins condensed in a PE of common bean.

Total flavonoids were similar among raw and cooked beans and polysaccharide samples (1.9, 1.8, and 1.6 mg equiv of rutin, respectively). Nevertheless, total flavonoid content in raw beans was higher than the content reported by Oomah et al. (19) for a black bean cultivar (0.86 mg of rutin). This difference can also be attributed to the genotype, as well as to the time of storage.

SCFA in Cecal, Colon, and Feces Contents. SCFA concentrations in the colon contents and feces samples from the animals of the different treatments are shown in **Table 4**. Overall, acetate, propionate, and butyrate concentrations were higher in cecal content, followed by colon content and feces except for the PE + AOM group, for which a higher concentration of these SCFAs was found in feces > colonic content > cecal content. In cecum, the control group had the lowest acetate concentration, whereas the bean and bean + AOM groups had the highest acetate concentrations; the bean + AOM group presented the lowest propionate and butyrate concentrations. Similar significantly elevated SCFA levels were observed in cecum and feces of rats fed a diet with high-amylose corn starch (34). Nakanishi et al. (35) demonstrated that rats fed high-amylose maize starch (HAS) and *Clostridium butyricum* spores strain MIYAIR1588 (CBM588) showed an increase in butyrate concentration in the cecum, indicating that HAS and CBM588 changed the metabolism of colonic microbiota.

Propionate (6.92 mM/g of sample) and butyrate (6.70 mM/g of sample) concentrations in the cecum of the PE group were higher than that of the other treatments, suggesting that NDC increase the butyrate production. The increase in butyrate was also noted by other researchers, who showed that butyric acid

production was increased as a result of a diet rich in nondigestible compounds (36, 37).

The acetate concentration in colon contents show no statistical differences, whereas the highest propionate production (7.96 mM/g of sample) was obtained in the bean + AOM group; this result is lower than that reported by Nakanishi et al. (35) (10.9 mM/g), who evaluated the addition of high-amylose maize starch into the diet. The difference would be attributable to the RS composition of diets.

In feces, we observed a lower acetic acid production in the bean + AOM group (30.8 mM/g of sample). Group PE + AOM presents the highest propionic acid production (7.02 mM/g sample), whereas the control group presented the lowest production of propionic acid (3.07 mM/g of sample). The RS content in the PE was higher (39.32%) than in whole cooked beans (30%). Furthermore, PE + AOM treatment showed the highest butyric acid concentration (5.49 mM/g of sample). Le Leu et al. (34) reported that rats fed RS (10% high-amylose maize starch) showed a significant increase in butyrate concentration in the distal colon zone (feces). To our knowledge, this is the first report on the production of SCFA from polysaccharides of common beans.

ACF Analysis. The number of ACF obtained from both histological analyses (methylene blue or Dapi stain) is shown in **Figure 2**. For the methylene blue stain, bean and PE groups did not show positive ACF, whereas PE + AOM treatment decreased the ACF number (24.5 ± 8.2 per colonic zone) compared to AOM treatment (35.0 ± 18.9 per colonic zone). On the other hand, in the histological analysis by Dapi, the bean + AOM and PE + AOM groups showed lower ACF numbers (2.2 ± 0.6 and 2.0 ± 0.8 ACF per colonic zone, respectively) compared with AOM (4.2 ± 0.6 ACF per colonic zone). Our results indicate that cooked beans and PE are rich in insoluble fiber, RS, and oligosaccharides, which, after fermentation by the colonic bacteria, produce SCFA in cecal and colonic contents and feces, where the butyrate concentration was higher in feces after PE + AOM treatment. Therefore, these results suggest that SCFA, mainly butyrate, are involved in the chemoprotection of PE against AOM.

Butyrate is an energy source for large intestinal epithelial cells. It has been demonstrated that butyrate also induces cell cycle arrest and apoptosis (6). Several researchers have demonstrated that diets rich in nondigestible compounds increase butyrate concentration (36, 37), such as soluble and insoluble fiber, RS, and nondigestible oligosaccharides (NDO) (4). Le Leu et al. (34) reported that rats fed RS (10 and 20% of high-amylose maize starch in the diet) showed reduced numbers of ACF and significantly increased total SCFA concentration, mainly butyrate, in the distal colon. Nakanishi et al. (35) demonstrated that rats fed high-amylose starch showed decreased numbers of ACF and that the coadministration of *C. butyricum* spores (CBM588) as probiotics helped to decrease the number of ACF (from 69.1 ± 31.3 to 53.9 ± 28.2 ACF per colonic zone, respectively). To our knowledge this is the first report of the chemopreventive effect of a PE from cooked beans on ACF numbers.

Gene Expression Analysis. The gene expression in the distal colon is shown in **Figures 3** and **4**. The PE + AOM group did not show β -catenin and p53 expression compared with the AOM group. Interestingly, a higher p21 expression independent of p53 and an increased expression of *bax* and *caspase-3* as well as a decreased expression of *rb* and *bcl-2* was found in the colon of animals treated with PE + AOM. Our data suggest that polysaccharides from common beans can induce gene expression

involved in proliferation, cell cycle arrest, and apoptosis in vivo in a similar way to that of in vitro studies.

Butyrate is a SCFA that has been related to the decrease in ACF in in vivo models and acts as a physiological regulator of colonic epithelial cell differentiation cell cycle arrest and apoptosis. Recently, microarray studies have been used to investigate the anticancer effects of butyrate on *p53*, *p21*, *rb*, different *cyclins*, *E2F*, and *histones*, demonstrating a complex cascade of reprogramming in SW620 colonic epithelial cells upon treatment with butyrate. The reprogramming was also characterized by the progressive recruitment of gene sets as a function of time (7). Butyrate responsive elements have been identified in the promoters of a number of genes and up-regulate the β -catenin signaling (38). Therefore, altered accessibility of cis acting elements to trans acting factors by changes in extent of histone acetylation may all contribute to modulation of transcription by butyrate, thus reducing the expression of β -catenin. Furthermore, butyrate has been related to the up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor, *p21^{waf1/Cip1}*, which induces cell cycle arrest (8). Other researchers have shown that *p21* expression can be stimulated independently of *p53*. Mahyar-Roemer and Roemer (8) demonstrated that butyrate can induce the expression of *p21* with immediate-early kinetics and independent of *p53* to levels comparable to those obtained with adriamycin treatment, the topoisomerase II inhibitor etoposide, and the DNA- and RNA-damaging agent 5-FU [Fluoracil (Acrucil)].

Butyrate has also been related to the induction of apoptosis via mitochondria mechanisms, by inhibiting *bcl-2* expression and increasing the expression of *bax*. Hass et al. (39) showed that colonocytes incubated with butyrate showed a difference that was lower in the transcript levels of *bcl-2* and an increased expression of *bax* in colonic mucosa. Other studies demonstrated that several SCFA-producing *Propionibacteria* induced typical signs of apoptosis including a loss of mitochondria transmembrane potential, generation of reactive oxygen species, *caspase-3* processing, and nuclear chromatin condensation (9). Here it has been demonstrated that PE + AOM treatment decreased the expression of *bcl-2* and increased the expression of *bax* and *caspase-3* compared to AOM treatment. Consequently, the results suggest an apoptotic process was induced by butyrate via mitochondria mechanisms.

Conclusions. The common bean (*P. vulgaris* L.) cv. Negro 8025 can be a reliable source of polysaccharides and phenolic compounds. Total phenolic compounds and total flavonoids were determined by a scaled-down method. The recovery was >70%, validating the utility of this method.

PE contains considerable amounts of nondigested carbohydrates that are fermented in the large intestine to produce SCFA, mainly butyrate, which was related to the decrease in ACF and to the induction of the expression of genes involved in proliferation, cellular arrest, and apoptosis (*b-catenin*, *p53*, *p21*, *rb*, *bax*, and *caspase-3*).

LITERATURE CITED

- González de Mejía, E.; Valdez-Vega, M. C.; Reynoso-Camacho, R.; Loarca-Piña, G. Tannins, trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) beans. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2005**, *60*, 137–145.
- Reyes-Moreno, C.; Paredes-López, O. Hard-to-cook phenomenon in common beans, a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1993**, *33* (3), 227–286.
- Champ, M. M. Non-nutrient bioactive substances of pulses. *Br. J. Nutr.* **2002**, *88* (3), 307–319.
- Hangen, L.; Bennik, M. R. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutr. Cancer* **2002**, *44* (1), 60–65.
- Bird, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* **1987**, *30*, 147–151.
- Mentschel, J.; Claus, R. Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and a shift to the stem cell compartment. *Metabolism* **2003**, *52* (11), 1400–1405.
- Mariadason, J. M.; Georgia, A. C.; Augenlicht, L. H. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4561–4572.
- Mahyar-Roemer, M.; Roemer, K. p21Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. *Oncogene* **2001**, *20*, 3387–3398.
- Jan, G.; Belzacq, A. S.; Haouzi, D.; Rouault, A.; Métivier, D.; Kroemer, G.; Brenner, C. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell. Death Differ.* **2002**, *9* (2), 179–188.
- Aparicio-Fernández, X.; Manzo-Bonilla, L.; Loarca-Piña, G. F. Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans *Phaseolus vulgaris* against aflatoxin B₁. *J. Food Sci.* **2005**, *70*, S73–S78.
- Cardador-Martínez, A.; Castaño-Tostado, E.; Loarca-Piña, G. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B₁. *Food Addit. Contam.* **2002**, *19* (1), 62–69.
- Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, 17th ed.; AOAC: Arlington, VA, 2002; Methods 920.105, 925.23, 945.46, 985.29, 991.43.
- Kurtzman, R. H. J. R.; Halbrook, W. U. Polysaccharides from dry Navy beans *Phaseolus vulgaris*: its isolation and stimulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* **1970**, *20* (5), 715–719.
- Gulewicz, P.; Ciesiolka, D.; Frias, J.; Vidal-Valverde, C.; Frejnagel, S.; Trojanowska, K.; Gulewicz, K. Simple method of isolation and purification of α -galactoside from legumes. *J. Agric. Food. Chem.* **2000**, *48*, 3120–3123.
- Brenes, A.; Slominski, B. A.; Marquardt, R. R.; Guenter, W.; Viveros, A. Effect of enzyme addition on the digestibilities of cell wall polysaccharides and oligosaccharides from whole, dehulled, and ethanol-extracted white lupins in chickens. *Poult. Sci.* **2003**, *82*, 1716–1725.
- Shiga, M. T.; Lajolo, M. F.; Filisetti, M. T. Cell wall polysaccharide of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas* **2003**, *23* (2), 141–148.
- Saura-Calixto, F.; Goñi, I.; Bravo, L.; Mañas, E. Resistant starch in foods: modified method for dietary fiber residues. *J. Food Sci.* **1993**, *58* (3), 642–643.
- Deshpande, S. S.; Cheyran, M. Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *J. Food Sci.* **1987**, *52*, 332–334.
- Oomah, B. D.; Cardador-Martínez, A.; Loarca-Piña, G. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 935–942.
- Castro, J.; Heiden, T.; Wang, N.; Tribukait, B. Preparation of cell nuclei from fresh tissues for high-quality DNA flow cytometry. *Cytometry* **1993**, *14*, 793–804.
- Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S. *Statistics for Experimenters*; Wiley: New York, 1978.
- Costa de Oliveira, A.; Silva-Queiroz, K.; Machado, S.; Carraro, F. O processamento domestico do feijao-comun ocasionou uma reducao nos fatores antinutricionais fitato e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulencia rafinose, estaquiose e verbascose. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2001**, *51*, 276–283.

- (23) De Almeida-Costa, G. E.; da Silva Queiroz-Monici, K.; Pissini-Machado, R. S. M. P.; Costa de Oliveira, A. Chemical composition, dietary fiber and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chem.* **2006**, *94*, 327–330.
- (24) Ratnayake, W. S.; Hoover, R.; Shahidi, F.; Perera, C.; Jane, J. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of starches from four field pea (*Pisum sativum* L.) cultivars. *Food Chem.* **2001**, *74*, 189–202.
- (25) Osório-Díaz, P.; Bello-Perez, L. A.; Sayago-Ayerdi, S. G.; Benitez-Reyes, M. D. P.; Tovar, J.; Paredes-López, O. Effect of processing and storage time on in vitro digestibility and resistant starch content of two bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83* (12), 1283–1288.
- (26) Tharanathan, R. N.; Mahadevamma, S. Grain dry pulses—a boom to human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* **2003**, *14* (12), 507–518.
- (27) Guillon, F.; Champ, M. M.-J. Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *Br. J. Nutr.* **2002**, *88* (Suppl. 3), S293–S306.
- (28) Granito, M.; Champ, M.; David, A.; Bonnet, C.; Guerra, M. Identification of gas-producing components in different varieties of *Phaseolus vulgaris* by in vitro fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 543–550.
- (29) Kles, A. K.; Chang, E. B. Short-chain fatty acids impact on intestinal adaptation, inflammation, carcinoma and failure. *Gastroenterology* **2006**, *130*, S100–S105.
- (30) Alfonzo-González, G. C. Efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de fibra dietética total, soluble e insoluble en algunas leguminosas. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2000**, *50* (3), 281–285.
- (31) Rehman, Z.; Salariya, A. M.; Zafar, S. I. Effect of processing on available carbohydrate content and starch digestibility of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem.* **2001**, *73*, 351–355.
- (32) Barroga, C. F.; Laurena, A. C.; Mendoza, E. N. Polyphenols in mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Determination and removal. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *36*, 1157–1159.
- (33) Guzmán-Maldonado, S. H.; Castellanos, J.; González de Mejía, E. Relationship between theoretical and experimentally detected tannin content of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem.* **1996**, *55*, 333–335.
- (34) Le Leu, R. K.; Brown, I. L.; Hu, Y.; Morita, T.; Esterman, A.; Young, G. P. Effect of dietary resistant starch and protein on colonic fermentation and intestine tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis* **2007**, *28* (2), 240–245.
- (35) Nakanishi, S.; Kataoka, K.; Kuwahara, T.; Ohnishi, Y. 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. *Microbiol. Immunol.* **2003**, *47* (12), 951–958.
- (36) McBain, A. J.; Macfalane, G. T. Modulation of genotoxic enzyme activities by non-digestible oligosaccharides metabolism in *in vitro* human gut bacterial ecosystems. *J. Med. Microbiol.* **2001**, *50*, 833–842.
- (37) Roy, C. C.; Kien, C. L.; Bouthiller, L.; Levy, E. Short-chain fatty acids: ready for prime time. *Nutr. Clin. Pract.* **2006**, *21* (4), 351–366.
- (38) Bordonaro, M.; Mariadason, J. M.; Aslam, F.; Heerdt, B. G.; Augenlicht, L. H. Butyrate induced cell cycle arrest and apoptotic cascade in colonic carcinoma cells: modulation of the B-catenin-Tcf pathway, and concordance with effects of sulindac and trichostatin, but not curcumin. *Cell. Growth. Differ.* **1999**, *10*, 713–720.
- (39) Hass, R.; Busche, R.; Luciano, L.; Reale, E.; Engelhardt, W. V. Lack of butyrate is associated with induction of Bax and subsequent apoptosis in the proximal colon of guinea pig. *Gastroenterology* **1997**, *112* (3), 875–881.

Received for review March 7, 2008. Revised manuscript received July 21, 2008. Accepted July 29, 2008. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Grant 57536 and the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, The Bajío Station (INIFAP, Celaya).

JF8007162