



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

## FACULTAD DE QUÍMICA

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

**“Efecto de la fracción no digerible del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)  
cocido variedad Bayo Madero, sobre el estadio temprano de cáncer de colon”**

#### **Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**L. en N. Haydé Azeneth Vergara Castañeda**

QUERÉTARO, QRO., SEPTIEMBRE DE 2011



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

**“Efecto de la fracción no digerible del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido variedad Bayo Madero, sobre el estadio temprano de cáncer de colon”**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

**Presenta:**


**L. en N. Haydé Azeneth Vergara Castañeda**

**Dirigido por:**

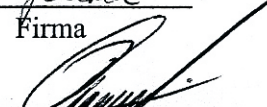
**Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña**

**SINODALES**

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Presidente

  
Firma

Dra. Rosalía Reynoso Camacho  
Secretario

  
Firma

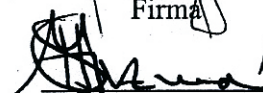
Dr. Ramón Guevara González  
Vocal

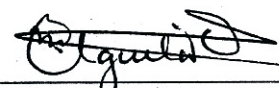
  
Firma

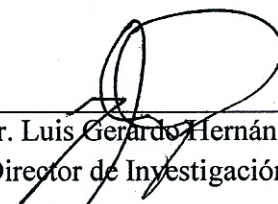
Dra. Minerva Ramos Gómez  
Suplente

  
Firma

Dr. S. Horacio Guzmán Maldonado  
Suplente

  
Firma

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

  
Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario.  
Querétaro, Qro.  
Septiembre de 2011.  
México.

## RESUMEN

El cáncer de colon es una de las principales causas de morbi y mortalidad a nivel mundial. El consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) presenta una asociación inversa con la recurrencia de pólipos adenomatosos colorectales. Esta propiedad puede atribuirse a la presencia de compuestos bioactivos (almidón resistente, oligosacáridos, fibra, compuestos fenólicos y péptidos bioactivos). Estudios previos han demostrado que el extracto de polisacáridos de frijol Negro 8025 inhibe el desarrollo del estadio temprano de cáncer de colon y la fracción no digerible (FND) de frijol Bayo Madero inhibe la proliferación de células transformadas HT-29. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto quimioprotector de la FND del frijol común cocido (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero, sobre el estadio temprano de cáncer de colon en ratas AOM-inducidas, así como proponer el mecanismo de quimioprotección mediante técnicas moleculares. El frijol variedad Bayo Madero presentó un considerable contenido de fibra, oligosacáridos, compuestos fenólicos y rendimiento de FND. El tratamiento con FND y frijol cocido (FC) disminuyó el desarrollo de fosas crípticas aberrantes (FCA) en la zona distal del colon en ratas AOM-inducidas. Ambos tratamientos redujeron la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en contenido cecal, colónico y fecal. El grupo FND+AOM moduló 72 genes al menos >1.1 veces (inducción o inhibición) con respecto al grupo AOM. Los genes p53, Gadd45a, Cdkn1a y Bax fueron altamente expresados, mientras que Cdc25c, Ccne2, E2f1 y Bcl2 fueron suprimidos, sugiriendo a la combinación de arresto al ciclo celular (fases G1/S y G2/M) y la inducción de apoptosis, entre otros mecanismos, como vías involucradas en el efecto quimioprotector de la FND sobre ratas AOM-inducidas. La inducción de apoptosis por la FND fue corroborada cuantificando los núcleos apoptóticos generados en colon distal. Los resultados aportan evidencia de que la FND de frijol común variedad Bayo Madero inhibe el desarrollo del estadio temprano de cáncer de colon en un modelo *in vivo* mediante la disminución en la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa y la modulación de genes que inducen arresto al ciclo celular, apoptosis, y reparan el ADN, contribuyendo a la quimioprotección del frijol común sobre la carcinogénesis colónica.

**(Palabras clave:** Frijol común; fracción no digerible; fosas crípticas aberrantes,  $\beta$ -glucuronidasa; cascada señalización de p53; genes).

## SUMMARY

Colon cancer is one of the most common causes of morbidity and mortality in the world. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) consume has an inverse association with colorectal adenomatous polyp recurrence. This property can be attributed to presence of bioactive compounds (resistant starch, oligosaccharides, fiber, phenolic compounds and bioactive peptides). Previous studies have shown that the extract of polysaccharide from bean Negro 8025 inhibits the early stage of colon cancer development and non-digestible fraction (NDF) from bean Bayo Madero inhibits the proliferation of HT-29 transformed cells. The aim of this study was to evaluate the chemopreventive effect of NDF from cooked common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Bayo Madero variety, on early stage of colon cancer in AOM-induced rats, and proposes the mechanism of chemoprotection by molecular techniques. Bayo Madero beans showed a considerable amount of fiber, oligosaccharides, phenolic compounds and NDF yield. Treatment with NDF and cooked beans (FC) decreased the aberrant crypt foci (ACF) development in distal colon of AOM-induced rats. Both treatments reduced the  $\beta$ -glucuronidase activity in ceecal, colonic and fecal contents. NDF+AOM group modulated 72 genes at least >1.1 fold (induction of inhibition) compared to AOM group. p53, Gadd45a, Cdkn1a and Bax genes were highly expressed, whereas Cdc25c, Ccne2, E2F1 and Bcl-2 were suppressed, suggesting a combination of cell cycle arrest (G1/S and G2/M phases) and apoptosis induction, among other mechanisms, as pathways involved in the chemoprotective effect of NDF in AOM-induced rats. Apoptosis induction by NDF was corroborated by quantifying of apoptotic nuclei generated in distal colon. The results provide evidence that NDF from common bean Bayo Madero variety inhibits the early stage of colon cancer development on *in vivo* model through  $\beta$ -glucuronidase activity decrease and modulation of genes involved in induction of arrest cell cycle, apoptosis and DNA repair, contributing to the common bean chemoprevention of colon carcinogenesis.

**(Key words:** Common bean; non-digestible fraction; aberrant crypt foci;  $\beta$ -glucuronidase; p53 signaling pathway; gene).

## DEDICATORIAS

Este logro es dedicado principalmente a mis padres, por su eterno apoyo, preocupación y paciencia. Ustedes son mi motivación para seguir superándome y el mayor orgullo que tengo. Gracias por su confianza, su impulso y por aguantar mis frecuentes momentos de mal humor y estrés.

A mis hermanos, porque ustedes representan un pilar importante de mi fortaleza e inspiración, a pesar de las diferencias me siento apoyada y protegida por ustedes.

A mis sobrinos, Darío, David y Daniel por esa luz tan hermosa que representan en mi vida, sus sonrisas, su inocencia y su cariño me acompañan a cada momento y me hacen muy feliz, aún en las situaciones más difíciles. No tengo cómo agradecer a Dios el regalo tan inmenso que me dio con ustedes.

A mis tías lelas, Chela y Élida, por siempre estar al pendiente de mí y mi superación, por consentirme aún y cuando no lo merezco.... no pude haber tenido mejores "segundas madres".

Quiero dedicar este logro muy especialmente a mi Ángel... fuiste y serás una de mis mayores motivaciones, sé que en todo momento estás conmigo, cuidándome y dándome fuerza, como siempre lo hiciste. Te extraño, te amo... nunca te olvidaré (QEPD).  
... y por siempre brillarás...

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de doctorado.

Agradezco infinitamente a la Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña por la confianza que depositó en mí desde el primer día, así como los conocimientos y amistad que me ofreció durante todo el posgrado.

A los miembros de mi Comité de Evaluación: Dra. Minerva Ramos Gómez, Dra. Rosalía Reynoso Camacho, Dr. Ramón Guevara González y Dr. Horacio Guzmán Maldonado, por sus valiosas aportaciones y asesorías para la realización de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, al Instituto Tecnológico de Celaya y al Agriculture and Agri-Food Canada por permitirme realizar parte de mis experimentos en sus instalaciones, por el uso de sus equipos y material.

Agradezco a mi amiga Rocío porque parte de este logro te lo debo a ti ... gracias por tu tiempo, dedicación, conocimientos y amistad... ya tenemos 12 años juntas... y vamos por más! Te quiero.

A Paty, por tu amistad desde el día que ingresamos al posgrado. Estoy muy agradecida por la increíble conexión que tuvimos, experiencias buenas y malas, trabajos y diversión que nos mantuvieron vivas estos 5 años. Finalmente, te agradezco profundamente tus hermosas palabras y apoyo en uno de los momentos más difíciles de mi vida. Te quiero amigui.

A Lupita Herrera, por la hermosa amistad que hemos hecho en estos 5 años. Tus regaños y buen humor me motivan a seguir adelante, te quiero amigui... aunque sea nutrióloga.

A Joel, por siempre estar al tanto de mí y mi investigación. Los momentos que pasamos juntos con nuestros hijos son verdaderamente especiales. Estoy orgullosa de poder contar con tu valiosa amistad. Te quiero chiquito.

Especialmente a Nataly, porque me haces la vida armónica todos los días en el laboratorio, tu sencillez, inteligencia y sincera amistad te hacen una personita esencial en mi vida, el apoyo que me has dado en los peores momentos es de lo más valioso para mí. Hemos hecho buen equipo chiquita, te quiero mucho nenita hermosa!

También agradezco a mis amigos Fabiola, Fernando, Poncho, Héctor, Tania Arroyo, Fanny, Estelita, Maricela, Sandra, Julián, Néstor y Gely por su ayuda, apoyo, ánimos, sonrisas, momentos de diversión y con algunos hasta discusiones... por las palabras de aliento en los momentos críticos de este largo periodo y la alegría que siempre me transmiten. Todos constituyen una parte importante de mi formación y de mi vida. Los quiero.

A mis hermanitos/as de laboratorio Susy, Aldrin, Claudia Grajeda, César, Angélica, Génesis, Rosario, Paola, Denisse, Claudia, Violeta, e Iván que día a día me ayudaron a sobrellevar el estrés, gracias por su ayuda en el laboratorio y los desayunitos que tanto extrañaré.

Al personal administrativo: Carmelita, Laurita, Marlene y Marigel, por su amable atención, paciencia y su diaria sonrisa.

# ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 CÁNCER	2
2.2 PROCESO DE CARCINOGENÉISIS	2
2.3 GENÉTICA MOLECULAR DEL CANCER	4
2.4 CÁNCER COLORECTAL	5
2.4.1 Epitelio del colon.	7
2.4.2 Fosas crípticas normales y aberrantes.	8
2.4.3 $\beta$ -glucoronidasa.	11
2.5 GENÉTICA MOLECULAR DEL CÁNCER DE COLON	12
2.5.1 Ciclo celular.	13
2.5.1.1 p53.	17
2.5.1.2 p21.	19
2.5.1.3 Retinoblastoma.	20
2.5.1.4 Ciclinas / cinasas dependientes de ciclinas.	21
2.5.2 Apoptosis.	23
2.5.2.1 Bcl-2.	25
2.5.2.2 Bax.	26
2.5.2.3 Caspasas.	27
2.5.2.4 Receptores de muerte de la membrana celular.	28
2.5.2.5 Nfkb.	28
2.5.2.6 Apoptosis independiente de caspasas.	29
2.5.3 Genes involucrados en reparación de ADN.	31
2.5.4 Genes involucrados en cáncer de colon e inflamación.	32
2.5.4.1 Nfkb.	32
2.5.4.2 Il-6.	32
2.6 FRIJOL COMÚN	33



2.6.1	Generalidades.	33
2.6.2	Composición del frijol.	34
2.6.3	Propiedades nutraceuticas.	36
2.6.3.1	Fibra dietética.	36
2.6.3.2	Oligosacáridos.	39
2.6.3.3	Almidón resistente.	41
2.6.3.4	Péptidos bioactivos.	42
2.6.4	Fermentación colónica de la fracción no digerible.	43
2.6.4.1	Derivados fenólicos producto de la fermentación bacteriana.	47
2.7	MODELO EXPERIMENTAL DE CÁNCER DE COLON.	47
2.7.1	Azoximetano.	48
3.	JUSTIFICACIÓN	51
4.	OBJETIVO GENERAL	53
5.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
6.	METODOLOGÍA	54
6.1	MATERIAL	54
6.1.1	Compuestos químicos	54
6.1.2	Material biológico	54
6.2	MÉTODOS	55
6.2.1	Cocción del frijol.	55
6.2.2	Extracción de la fracción no digerible.	55
6.2.3	Análisis proximal.	55
6.2.3.1	Determinación de cenizas.	56
6.2.3.2	Determinación de humedad.	56
6.2.3.3	Determinación de proteína total.	56
6.2.3.4	Determinación de grasa.	57
6.2.4	Determinación de fibra insoluble y soluble.	58
6.2.5	Cuantificación de oligosacáridos.	58
6.2.5.1	Extracción de oligosacáridos.	58
6.2.5.2	Identificación y cuantificación de oligosacáridos por HPLC.	59
6.2.6	Cuantificación de compuestos fenólicos.	59
6.2.6.1	Extracción de compuestos fenólicos.	59
6.2.6.2	Cuantificación de fenoles totales.	59
6.2.6.3	Cuantificación de taninos condensados.	60
6.2.7	Cuantificación de almidón resistente.	60
6.2.8	Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas.	61
6.2.9	Fase experimental <i>in vivo</i> .	61
6.2.9.1	Medición de pH cecal, colónico y fecal.	63
6.2.9.2	Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).	64
6.2.9.3	Actividad de $\beta$ -glucuronidasa.	64
6.2.9.4	Determinación de fosas crípticas aberrantes (FCA) en la zona distal del colon.	65

6.2.10	Análisis de la expresión de genes relacionados con la cascada de señalización de p53 mediante arreglos de PCR cuantitativo.	65
6.2.10.1	Extracción de ARN.	66
6.2.10.1.1	Detección y evaluación de la calidad de ARN.	68
6.2.10.2	Síntesis de ADNc de cadena sencilla.	68
6.2.10.3	Arreglos de PCR cuantitativo.	70
6.2.11	Análisis de la expresión de proteínas mediante electroforesis en geles de poli-acrilamida desnaturalizante.	72
6.2.11.1	Extracción de proteínas totales.	72
6.2.11.2	Cuantificación de proteínas totales.	72
6.2.11.3	Electroforesis SDS-PAGE y análisis de Western blot.	73
6.2.11.3.1	Procedimiento para la electroforesis.	73
6.2.11.3.2	Transferencia semiseca de proteínas a membranas de PVDF.	73
6.2.11.3.3	Western blot.	74
6.2.12	Determinación de núcleos apoptóticos TUNEL.	75
6.2.13	Diseño experimental y análisis estadístico.	76
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
7.1	Caracterización parcial de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) crudo, cocido y de la fracción no digerible de la variedad Bayo Madero.	77
7.1.1	Composición proximal de muestras de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedades Bayo Madero (BM) y Pinto Durango (PD).	77
7.1.2	Rendimiento de fracción no digerible de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido, variedades Bayo Madero (BM) y Pinto Durango (PD).	79
7.1.3	Contenido de oligosacáridos de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) crudo, cocido y en la FND de las variedades Bayo Madero (BM) y Pinto Durango (PD).	80
7.1.4	Contenido de fibra total, insoluble y soluble, almidón resistente, proteína, lípidos y digestibilidad <i>in vitro</i> de proteína en FND de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad Bayo Madero.	83
7.1.5	Contenido de fenoles totales y taninos condensados de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) crudo, cocido y en la FND variedad Bayo Madero.	85
7.2	Evaluación <i>in vivo</i> del efecto del FC y de la FND, variedad Bayo Madero, sobre el desarrollo de fosas crípticas aberrantes inducidas con azoximetano.	86
7.2.1	Efecto del FC y la FND administrados intragástricamente sobre el consumo de agua, alimento y ganancia de peso.	86
7.2.2	Evaluación del FC y de la FND sobre el desarrollo de FCA inducidas con AOM en ratas Sprague-dawley.	88
7.2.3	Efecto del FC y el FND sobre el nivel de pH en contenido cecal, colónico y fecal.	92
7.2.4	Efecto del FC y el FND sobre la producción de AGCC en contenido cecal, colónico y fecal.	94
7.2.5	Efecto del FC y el FND sobre la actividad enzimática de $\beta$ -glucuronidasa en contenido cecal, colónico y fecal.	99

7.3	Análisis de la expresión génica de la cascada de señalización de p53 en el tejido de colon distal de ratas tratadas con la FND de la variedad Bayo Madero e inducidas químicamente con AOM en comparación con el grupo AOM.	100
7.3.1	Propuesta del mecanismo de protección de la FND sobre ratas inducidas químicamente.	117
7.4	Análisis de la expresión proteica en el tejido de colon distal de ratas tratadas con la FND de la variedad Bayo madero e inducidas químicamente con AOM y el grupo AOM.	120
7.4.1	Perfil electroforético de proteínas.	120
7.4.2	Influencia de los diferentes tratamientos sobre la expresión de proteínas	121
7.5	Análisis de núcleos apoptóticos por TUNEL.	126
7.6	Propuesta del mecanismo de acción general de la FND sobre ratas inducidas inducidas con AOM.	130
8.	CONCLUSIONES	135
9.	LITERATURA CITADA	137
10.	ANEXOS	160

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Características de las criptas aberrantes.	10
2	Composición del frijol crudo.	35
3	Grupos de tratamiento.	62
4	Concentración de proteína, grasa, cenizas, fibra total, fibra soluble e insoluble de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L) variedades Bayo Madero y Pinto Durango.	78
5	Rendimiento de fracción no digerible de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido, variedades Bayo Madero y Pinto Durango.	80
6	Contenido de oligosacáridos de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) crudo, cocido y en la fracción no digerible de las variedades Bayo Madero y Pinto Durango.	81
7	Contenido de fibra total, insoluble y soluble, almidón resistente, proteína, lípidos y digestibilidad de proteína en la FND de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cocido, variedad Bayo Madero.	84
8	Contenido de fenoles totales y taninos condensados de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) crudo, cocido y en la FND variedad Bayo Madero.	85
9	Efecto del FC y la FND sobre el nivel de pH en contenido cecal, colónico, y fecal.	93
10	Efecto del FC y la FND sobre la producción de AGCC en contenido cecal, colónico y fecal.	95
11	Genes inducidos en tejido de colon distal tratadas con FND+AOM comparados con el grupo AOM.	102
12	Genes inhibidos en tejido de colon distal de ratas tratadas con FND+AOM comparados con el grupo AOM.	104

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Pasos de la carcinogénesis y los sucesos involucrados en cada paso.	3
2	Incidencia estimada de cáncer colorectal a nivel mundial en 2008 por la Organización Mundial de la Salud.	6
3	Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos por sexo estimada por la Organización Mundial de la Salud en 2008.	7
4	Capas de la pared del colon.	8
5	Epitelio colónico normal de la cripta y representación esquemática de la direccionalidad del proceso de diferenciación a través de la cripta.	9
6	Mucosa de colon de rata tratada con AOM teñida con azul de metileno.	11
7	Secuencia de adenoma a carcinoma y las alteraciones moleculares involucradas en el desarrollo de cáncer de colon.	13
8	El Ciclo Celular.	15
9	Regulación de la transición de la etapa G1 a S.	16
10	Cascada de señalización del gen p53.	19
11	Papel de la proteína pRb en el progreso del ciclo celular.	21
12	Regulación del ciclo celular por ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas.	22
13	Transducción de señales de la apoptosis.	25
14	Inducción de apoptosis dependiente e independiente de caspasas.	30
15	Modelo sugerido para el rol de Gadd45a, Pcná y APE1/Ref1 en la respuesta de reparación por escisión de bases.	31
16	Consumo <i>per cápita</i> de frijol en México.	34
17	Composición de la fibra total.	37
18	Mecanismo propuesta de arresto al ciclo celular en la fase G2/M por oligosacáridos.	41

19	Fermentación bacteriana en el colon.	44
20	Representación esquemática de la relación entre la activación de AOM en el hígado y colon de rata.	49
21	Administración intragástrica de los tratamientos.	62
22	Diseño experimental.	63
23	Diseño de la placa de arreglos para PCR en tiempo real de acuerdo con la casa comercial de manufactura.	71
24	Descripción de los ciclos aplicados para el desarrollo del PCR en tiempo real en la placa de arreglos de ADNc.	71
25	Identificación de oligosacáridos por cromatografía líquida de alta resolución, para la muestra de A) frijol cocido y B) fracción no digerible.	82
26	Consumo de alimento en grupos experimentales.	87
27	Consumo de alimento en grupos experimentales.	87
28	Ganancia de peso en grupos experimentales.	88
29	Fosas crípticas aberrantes (región distal) por grupo de tratamiento.	89
30	Fosas crípticas normales y aberrantes de colon distal del colon.	91
31	Actividad de la enzima $\beta$ -glucoronidasa en contenido cecal, colónico y fecal.	99
32	Comparación de las secuencias moduladas positivamente y negativamente, al menos 2 veces en su expresión, en tejido de colon distal de ratas tratadas con la FND e inducidas con AOM con respecto a las ratas inducidas con AOM.	106
33	Genes inducidos en su expresión en ratas tratadas con FND e inducidas con AOM respecto al grupo AOM.	107
34	Genes inhibidos en su expresión en ratas tratadas con FND e inducidas con AOM respecto al grupo AOM.	108
35	Cambios en la expresión de genes en la fase G1/S del ciclo celular en colon distal de ratas tratadas con FND e inducidas con AOM.	118
36	Cambios en la expresión de genes en la fase G2/M del ciclo celular y	

	reparación de ADN en colon distal de ratas tratadas con FND e inducidas con AOM.	119
37	Cambios en la expresión de genes en la cascada de apoptosis e inflamación celular en colon distal de ratas tratadas con FND e inducidas con AOM.	120
38	Perfil electroforético de proteínas	121
39	Efecto de FC y la FND sobre la expresión de Bax en estadio temprano de cáncer de colon en ratas inducidas con AOM.	122
40	Efecto de FC y la FND sobre la expresión de Bcl-2 en estadio temprano de cáncer de colon en ratas inducidas con AOM.	123
41	Efecto de FC y la FND sobre la expresión de Pcna en estadio temprano de cáncer de colon en ratas inducidas con AOM.	125
42	Núcleos apoptóticos evaluados por la técnica de TUNEL en colon distal de rata del grupo Control, AOM y grupo tratado con FND e inducido con AOM.	127
43	Fotografías representativas de núcleos apoptóticos evaluados por la técnica de TUNEL.	129
44	Mecanismo de acción de la FND sobre ratas inducidas con AOM.	131

## 1. INTRODUCCIÓN

En el 2006, los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte en México (INEGI, 2008). El cáncer de colon representó el 5.3% en hombre y el 5.1% en mujeres de las principales causas de defunción por tumores malignos (IARC, 2010). Diversos estudios confirman la importancia de la dieta en este padecimiento, destacando alimentos con alto contenido de fibra, como el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), por ejercer efecto sobre la prevención y/o desarrollo de cáncer (Bingham *et al.*, 2005; Lanza *et al.*, 2006).

Los compuestos que no se degradan ni se absorben, como la fibra (soluble e insoluble), almidón resistente y oligosacáridos, algunos componentes fenólicos, entre otros, durante su paso del tracto gastrointestinal pueden ser degradados por las bacterias colónicas y los productos de la degradación se fermentan para producir los ácidos grasos de cadena corta (como ácido acético, propiónico y butírico), así como gases y agua (Swennen *et al.*, 2006).

Se ha sugerido que especialmente el ácido butírico juega un papel importante en la reducción del riesgo a sufrir cáncer de colon y que actúa como un tipo de agente supresor de este tipo de cáncer (Kautenburger *et al.*, 2005). A su vez, los galactooligosacáridos y algunos compuestos fenólicos que alcanzan el colon intactos y probables péptidos bioactivos presentes en la FND del frijol común, presentan funciones sobre la muerte celular programada, diferenciación e inhibición de crecimiento celular regulando genes y proteínas envueltas en dichos procesos (Veeriah *et al.*, 2007; Wenzel, 2000; Tzortzis *et al.*, 2005; Torruco-Uco *et al.*, 2009).

Estudios previos han demostrado que el extracto de polisacáridos de frijol Negro 8025 redujo el desarrollo de FCA en ratas inducidas con AOM y reguló la expresión de  $\beta$ -catenina, p53, p21, Rb, Bax y Caspasa 3, genes involucrados en proliferación celular, arresto al ciclo celular y apoptosis, respectivamente (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008). La FND de frijol Bayo Madero sujeto a un proceso de fermentación para simular las condiciones reales de digestión de un individuo monogástrico, moduló la expresión de genes



involucrados en arresto al ciclo celular, inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación sobre un modelo *in vitro* de estadio tardío de cáncer de colon usando células de adenocarcinoma de colon humano HT-29, contribuyendo así al efecto quimioprotector del frijol común contra el desarrollo de cáncer de colon (Campos-Vega *et al.*, 2010).

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 CÁNCER**

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células (WHO, 2011). Esta enfermedad se desarrolla con la acumulación de mutaciones en múltiples genes, las cuales son el resultado de la interacción entre los factores genéticos y factores externos, como la edad, el sexo, la raza, la dieta, el estilo de vida, estatus socio-económico y el medio en general, así como la infección por microorganismos (*Helicobacter pylori*, virus Epstein Barr, virus de papiloma humano y hepatitis B, y algunos parásitos). Todos estos son factores que actúan sobre el genoma de las células como iniciadores o promotores tumorales en la transformación celular (Ding *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007).

Una célula cancerosa se caracteriza por la manifestación de alteraciones esenciales en su fisiología, las cuales incluyen: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitoras de crecimiento, evasión de muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, e invasión y metástasis de tejidos (Hanahan y Weinberg, 2000).

### **2.2 PROCESO DE CARCINOGENÉISIS**

El cáncer se desarrolla como un proceso microevolutivo que requiere de la acumulación de múltiples eventos que tienen lugar en un clon de células y comprenden 3 estadios (Zorrilla-García *et al.*, 2004), mostrados en la Figura 1:

1. Inducción de mutación en el ADN de una célula somática (iniciación).

2. Estimulación de la expansión tumoral del clon mutado (promoción).
3. Malignización del tumor (progresión).

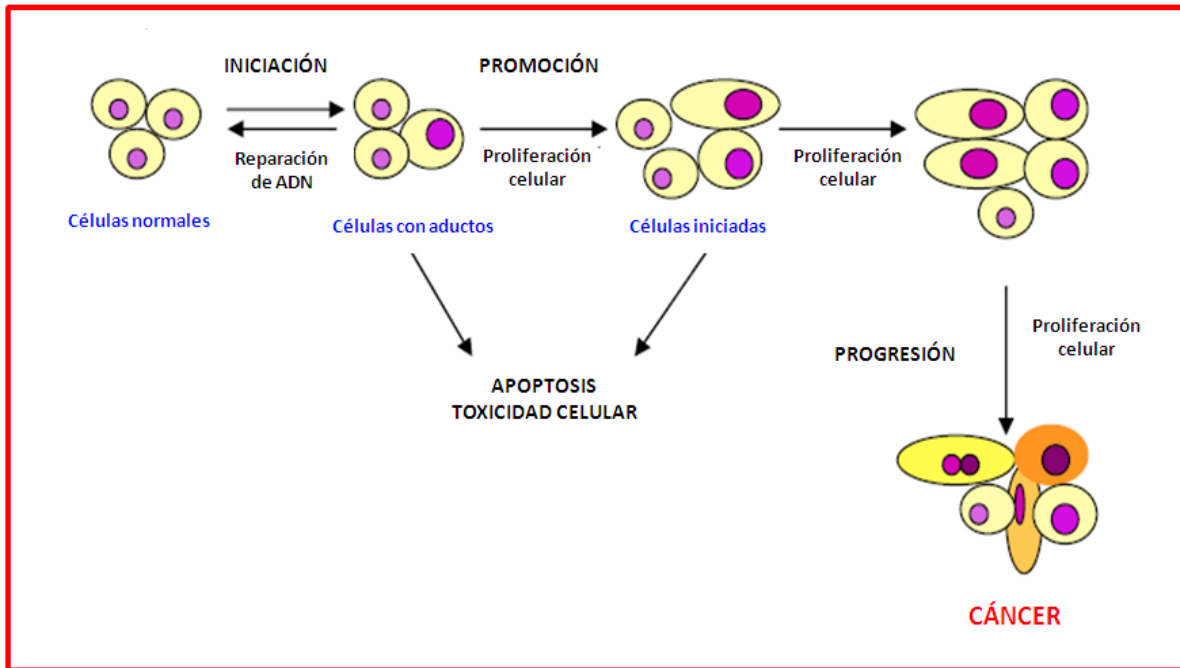


Figura 1. Pasos de la carcinogénesis y los sucesos involucrados en cada paso (Adaptado de Oliveira *et al.*, 2007).

Durante la división celular pueden ocurrir errores genéticos espontáneos. Se ha estimado que ocurren con una frecuencia de alrededor de  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  a través de los nucleótidos y la división celular (Oliveira *et al.*, 2007). Estos errores pueden afectar a los genes involucrados en la regulación de la división celular y se pierde la restricción de la proliferación normal. Las evidencias indican que es necesario que una célula sufra de 3 a 7 eventos independientes para que suceda una transformación neoplásica.

La etapa de iniciación comprende a los cambios genéticos que son irreversibles, y predisponen a las células normales sensibles a la evolución maligna y a la inmortalidad. La célula iniciada no es una célula neoplásica pero ha dado su primer paso hacia ese estado después de que se produzcan sucesivos cambios genotípicos y fenotípicos. Estas sufren mutaciones que inducen proliferación pero no diferenciación (Trosko *et al.*, 2003). La

iniciación como cambio molecular heredable no es un evento suficiente; la proliferación de las células alteradas requiere de otro paso: la promoción.

El efecto de los promotores es estimular la división celular en la región previamente expuesta donde un iniciador produjo un crecimiento pequeño a partir de una célula mutada. La célula iniciada responde ante la acción del promotor con un crecimiento distinto al de la normal (Díaz-Román *et al.*, 1998). Los compuestos promotores no interactúan directamente con el ADN pero sí desencadenan efectos biológicos sin ser metabólicamente activos. Estos agentes aumentan la proliferación celular en los tejidos sensibles, contribuyen a la fijación de mutaciones, producen alteraciones en la expresión génica y producen cambios en el control de crecimiento celular (Williams *et al.*, 2001; Gutiérrez y Salsamendi, 2001).

Durante el período de progresión las células, hasta entonces pre-malignas, hacen su conversión en células malignas a través de un proceso multifocal donde unas se transforman más rápido que otras. La progresión de clones iniciados puede ocurrir espontáneamente debido a la inestabilidad genética propia de la célula o puede ser acelerado por la exposición de elementos genotóxicos que actúan sobre éstas. La célula de un tumor es capaz de debilitar la adhesión a sus vecinas originarias, escapar del tejido de origen, refugiarse en otros tejidos, cruzar la lámina basal y el revestimiento endotelial del vaso, entrar y salir de la circulación y alojarse en un nuevo ambiente donde sobrevive y prolifera. Muchos tumores liberan células y sólo una pequeña proporción origina metástasis dado que para lograr esa capacidad deben sufrir nuevas mutaciones (Díaz-Román *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2007).

### **2.3 GENÉTICA MOLECULAR DEL CÁNCER**

El cáncer es una enfermedad genética dado que es el resultado de mutaciones de las células somáticas. Se han podido identificar muchos genes que habitualmente se encuentran alterados en los cánceres humanos. Hay dos rutas mutacionales hacia la proliferación e invasión incontroladas de la célula, características del cáncer. Los genes de

la primera ruta se llaman protooncogenes y el gen hiperactivo debido a una mutación oncogénica; la mutación de una sola copia de un proto-oncogén puede tener sobre la célula un efecto dominante favorecedor del crecimiento. Los protooncogenes son los genes celulares que controlan los procesos de proliferación y diferenciación. Los oncogenes son versiones alteradas de genes que codifican para proteínas cuya función es controlar los procesos de proliferación y diferenciación celular (Hernández-Menéndez y Ríos-Hernández, 1999). Los genes de la segunda ruta se llaman genes supresores de tumores. En éstos, generalmente las mutaciones que provocan cáncer son recesivas: para observar el efecto es necesario que en la célula somática diploide ambas copias del gen hayan desaparecido o estén inactivadas (Alberts *et al.*, 2004b). La inactivación de los genes supresores de tumores, generalmente cuando ambas copias son alteradas por delección o mutación, proporciona una ventaja competitiva del crecimiento (Kern, 2001).

## **2.4 CÁNCER COLORECTAL**

En el 2006, los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte en México con 63,888 personas fallecidas, y esta cantidad representa el 12.9% del total de las defunciones registradas (INEGI, 2008).

Por otro lado, el cáncer colorectal es una enfermedad maligna en la cual ocurren múltiples alteraciones genéticas de oncogenes y genes supresores de tumores por etapas durante el desarrollo del tumor (Luo *et al.*, 2006). Este tipo de cáncer es un problema de salud pública importante, no sólo para países con forma de vida occidental, en los últimos años se ha presentando cada vez en otras partes del mundo. Globalmente, el cáncer colorectal representa el tercer lugar en la frecuencia de incidencia (9.4%) y mortalidad (7.9%), con un número similar de hombres y mujeres (Vainio y Millar, 2003), presentando una distribución aproximada a la que se observa en la Figura 2 (IARC, 2010):

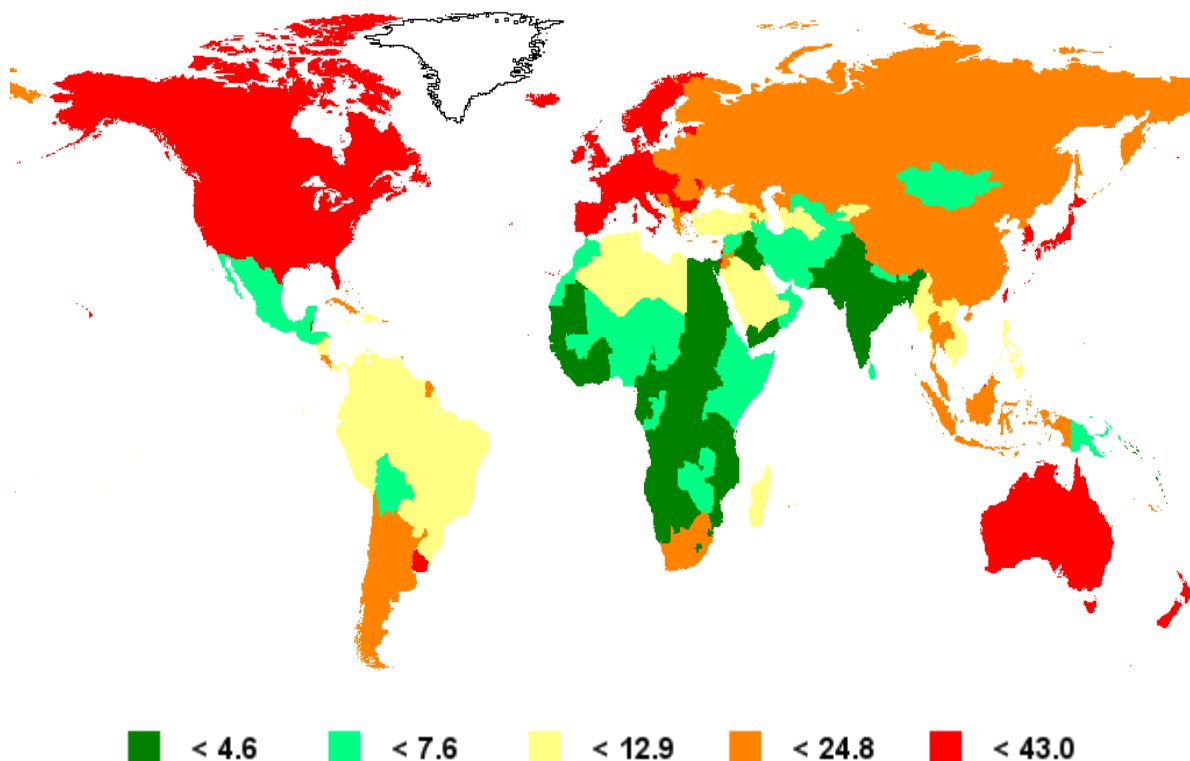


Figura 2. Incidencia estimada de cáncer colorectal a nivel mundial en 2008 por la Organización Mundial de la Salud (IARC, 2010).

Estudios realizados alrededor del mundo indican un aumento en los últimos años en la incidencia de cáncer colorectal a partir de los 40 años, y se ha señalado que los pacientes menores de 50 años presentan una mayor probabilidad de enfermedad avanzada y rápida progresión (Cooley *et al.*, 2009; Rozen *et al.*, 2011).

En México, los tumores malignos en colon en hombres representan el 5.3% y en mujeres el 5.1% de las principales causas de defunción, como se muestra en la Figura 3 (IARC, 2010).

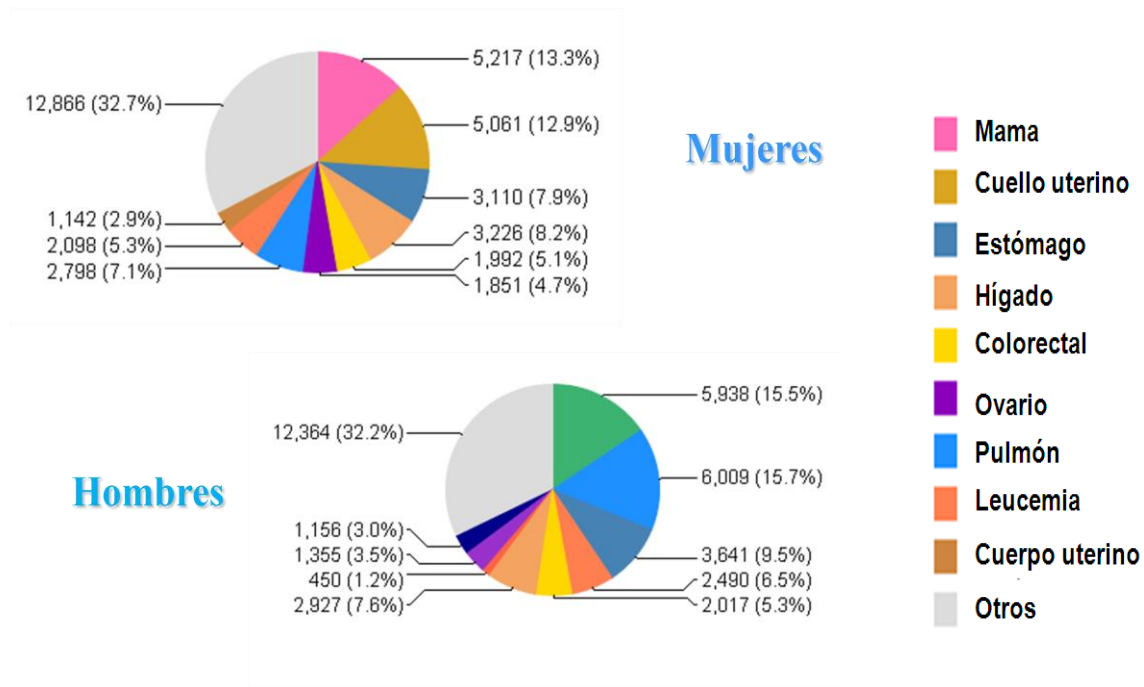


Figura 3. Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos por sexo estimada por la Organización Mundial de la Salud en 2008 (IARC, 2010).

Existen 2 tipos de cáncer colorectal, los que presentan predisposición genética y los esporádicos. Los que se presentan por disposición genética se dividen en cáncer colorectal hereditario no polipoideo (HNPCC) y la poliposis adenomatosa familiar (FAP), pero éstos sólo representan una pequeña fracción de cánceres colorectal. Los cánceres colorectales que con mayor frecuencia ocurren son los esporádicos, que tienen ausencia de un factor hereditario reconocido (Kinzler y Vogelstein, 2002). Se estima que el 80% de los casos de cáncer colorectal son esporádicos y no asociados con alguna mutación hereditaria conocida. La edad, ciertamente, es un factor de riesgo.

#### 2.4.1 Epitelio del colon

El colon o intestino grueso mide de 137 a 152 cm de longitud; se compone del ciego, apéndice vermiforme, colon (ascendente, transversal, descendente y sigmoide), recto y canal anal (McCormick *et al.*, 2002). Las células epiteliales intestinales representan una importante barrera entre el contenido del lumen y las células inmunes subyacentes. La función de la barrera es regulada por una variedad de factores producidos por las células

mucosas, las bacterias entéricas y las mismas células epiteliales (McCole y Barrett, 2003). El moco secretado por las células lubrica la mucosa para proteger la pared contra la escoriación y para que sea un medio adherente para sostener las heces (McCormick *et al.*, 2002). La pared del colon está compuesta por diferentes capas: mucosa, muscular, subserosa y serosa (Figura 4).

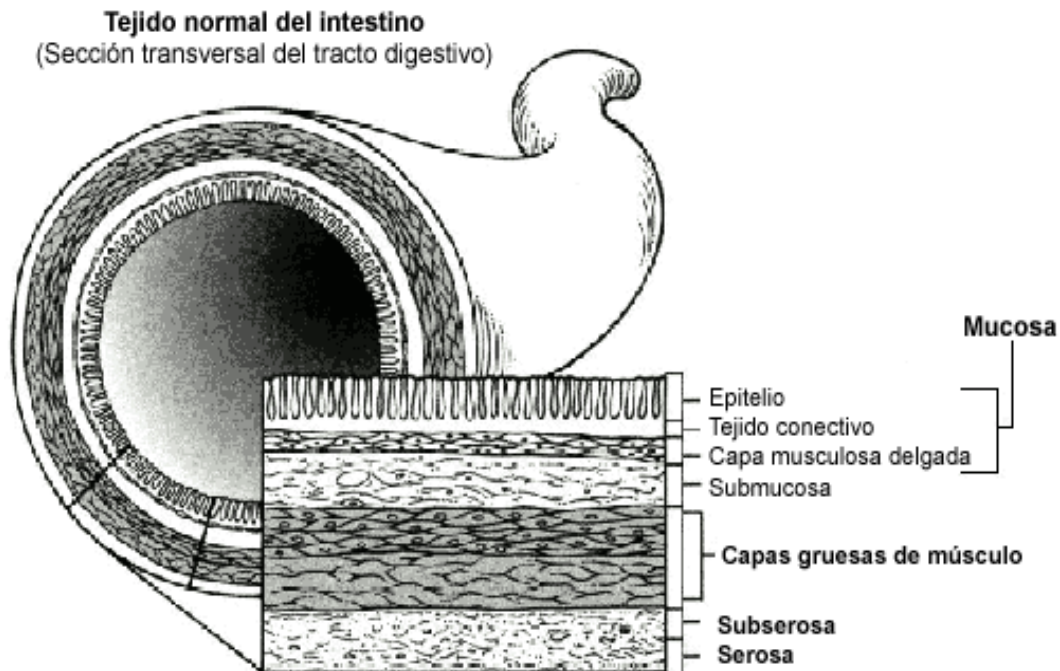


Figura 4. Capas de la pared del colon ([www.nccn.org](http://www.nccn.org)).

#### 2.4.2 Fosas crípticas normales y aberrantes

Histológicamente, el colon se compone de una capa de células epiteliales que forman invaginaciones, llamadas criptas. 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 (stem) 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 5).

La homeostasis celular del epitelio es mantenida por un balance dinámico entre la división celular continua y el desprendimiento 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 y tarda de 3 a 6 días (Kinzler y Vogelstein, 2002; Kim y Shibata, 2002; Lamprecht *et al.*, 2002).

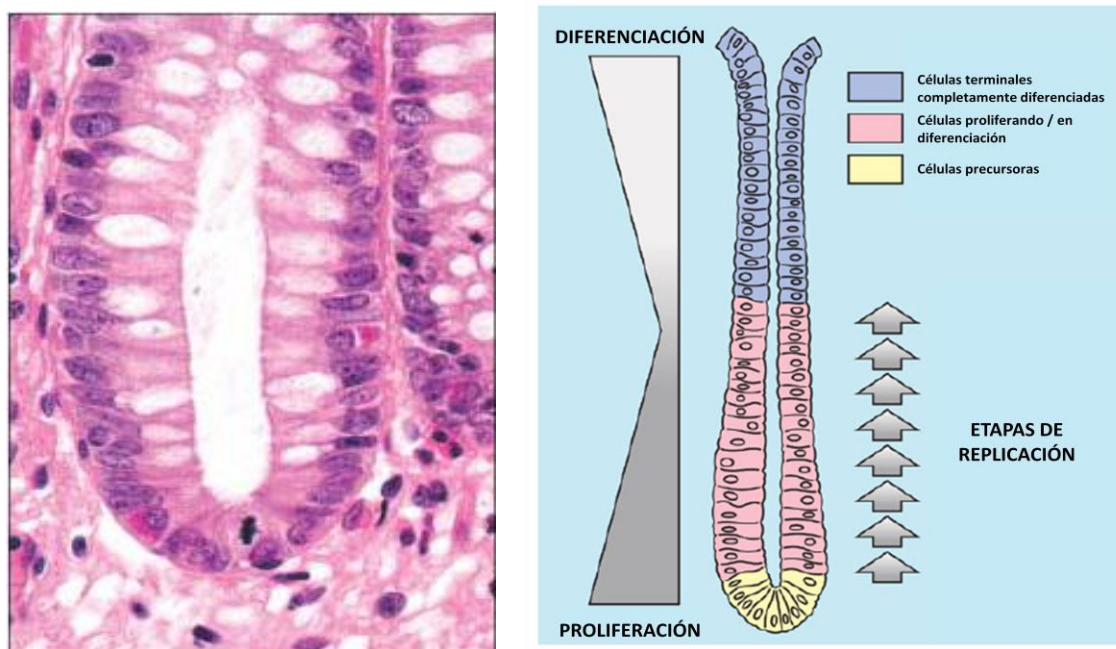


Figura 5. Epitelio colónico normal de la cripta y representación esquemática de la direccionalidad del proceso de diferenciación a través de la cripta (Niederhuber *et al.*, 2004; adaptado de (Kim y Shibata, 2002; Lamprecht *et al.*, 2002).

Las fosas crípticas aberrantes (FCA) son lesiones precursoras de adenomas y carcinomas que pueden ser desarrollados en colon. El número de FCA varía con el tiempo y fluctúa en el número, lo cual indica que están en un estado dinámico y pueden remodelarse (Bird y Good, 2000). Las características de las criptas aberrantes son descritas en el Cuadro 1:



Cuadro 1. Características de las criptas aberrantes.

<b>Características de las criptas aberrantes</b>
Inducidas por carcinógenos específicos de colon dependiendo de una dosis.
Cada FCA es envuelta a partir de una cripta alterada.
Exhiben características preneoplásticas (displasia, patrón proliferativo anormal, mutación en <i>K-ras</i> ).
El tamaño y multiplicidad de la cripta aumentan con el tiempo.
Las características de número y crecimiento predicen el tumor resultante y cuantifican el riesgo.
Presente en individuos con alto riesgo a desarrollar cáncer de colon.

(Bird y Good, 2000).

Las FCA comparadas con las normales, tienen criptas más grandes, las paredes tienen un incremento en el grosor con lúmenes a menudo ovalados o con espículas más que redondo y tienen un incremento en el área pericriptal. Además, no están en el mismo plano focal microscópico que las criptas normales adyacentes y no aparecen como unidad cuando la FCA contiene más de una cripta (Luo *et al.*, 2006) (Figura 6). Las FCA son consideradas el “estándar de oro” de los biomarcadores de carcinogénesis del colon y su determinación ha sido extensamente usada para la identificación de potenciales agentes quimioprotectores (Corpet y Tache, 2002).

En FCA aumenta la expresión de  $\beta$ -catenina, y sufre mutación en los genes supresores de tumores K-ras, Apc y p53. La displasia de las FCA se relaciona fuertemente con progresión neoplásica. Las alteraciones epigenéticas como metilación de islas ricas en pares de citosina-fosfato-guanina (CpG) y alteraciones genéticas fenotípicas como inestabilidad microsátélites también juegan un papel importante en la formación de FCA. La metilación de CpG silencia regiones promotoras, como las de homólogo 1 de mut-L humano (hMLH1) y O<sup>6</sup>-metil guanina metiltransferasa (MGMT), que son genes

reparadores de DNA. Son frecuentes las metilaciones en CpG en FCA displásicas de cáncer esporádico (Cheng y Lai 2003).

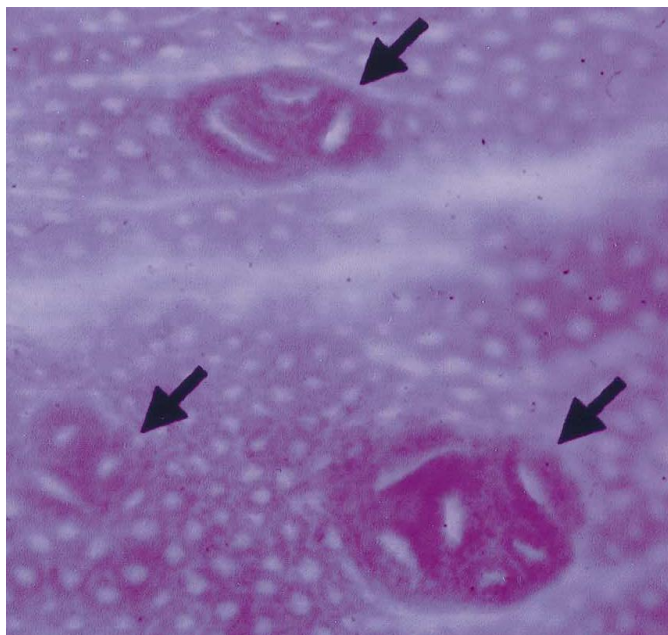


Figura 6. Mucosa de colon de rata tratada con AOM teñida con azul de metileno. Las flechas indican FCA con criptas alargadas, con epitelio más grueso y alterado (Yamada y Mori, 2003).

Las FCA en humanos están más frecuentemente localizadas en el colon medio y distal que en proximal a corto y largo plazo, lo cual ha sido verificado en modelos animales. La inducción de FCA con carcinógenos específicos para el colon a corto plazo (4 semanas) es fuertemente correlacionado con el desarrollo de adenocarcinomas bien diferenciados en medio plazo (30 semanas), como fue comprobado por Rodriguez *et al.* (2002) en ratas Wistar inducidas con DMH.

### 2.4.3 $\beta$ -glucoronidasa

La glucoronidación es el mejor proceso de detoxificación que convierte a un gran número de xenobióticos y sustancias endógenas en metabolitos más hidrofílicos (Tephly y Burchell, 1990; Guéraud y Paris, 1998). Parte de estos glucurónidos son secretados a través de la ruta biliar al intestino. Estos son pobremente absorbidos en la circulación sanguínea y son eficientemente eliminados del cuerpo. Sin embargo, una parte son hidrolizados en el

intestino grueso por la acción de enzimas  $\beta$ -glucuronidasas (Geier *et al.*, 2006). La enzima bacteriana  $\beta$ -glucuronidasa tiene la habilidad de hidrolizar muchos glucurónidos debido a que es un sustrato muy específico y así puede liberar carcinógenos agliconados en el lumen intestinal, que es la forma biológicamente activa de los xenobióticos y otros compuestos (Rafter, 2002).

Diversos autores han demostrado que la administración de la cepa *E. coli* en ratas incrementa el número de fosas crípticas aberrantes y que el incremento es debido a la alta actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, excretada por dicha cepa bacteriana (Arimochi *et al.*, 1999). Se ha sugerido que la suplementación con dietas con diferentes tipos de fibra contribuye a la inhibición del cáncer de colon por incremento de bacterias no-patógenas, fermentación de la fibra y reducción de la  $\beta$ -glucuronidasa intestinal (Nakanishi *et al.*, 2003; Manoj *et al.*, 2001).

## **2.5 GENÉTICA MOLECULAR DEL CÁNCER DE COLON**

Se ha demostrado que el modelo genético molecular para la tumorigénesis colorectal se compone de una serie de cambios genéticos cromosómicos y somáticos específicos que ocurren como acumulación secuencial, mientras que el proceso oncogénico procede con la iniciación, la promoción, y la progresión. Estas alteraciones genéticas incluyen deleciones y mutaciones puntuales de genes supresores de tumores como Apc, p53 y en el gen de deleción en cáncer colorectal (Dcc), así como mutaciones oncogénicas de K-ras (Niederhuber *et al.*, 2004). Las mutaciones en Ras, principalmente en K-ras, se desarrollan en el 50% de los cánceres de colon y se muestran en las etapas cercanas a la progresión neoplásica; así como las mutaciones que inactivan al gen receptor II TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$  -RII) están presentes en el 30% de los cánceres de colon y son temporalmente coincidentes con la posterior progresión de adenoma a carcinoma (Markowitz *et al.*, 2002). En la Figura 7 se muestra la secuencia de adenoma a carcinoma y alteraciones moleculares involucradas en el desarrollo de cáncer de colon.

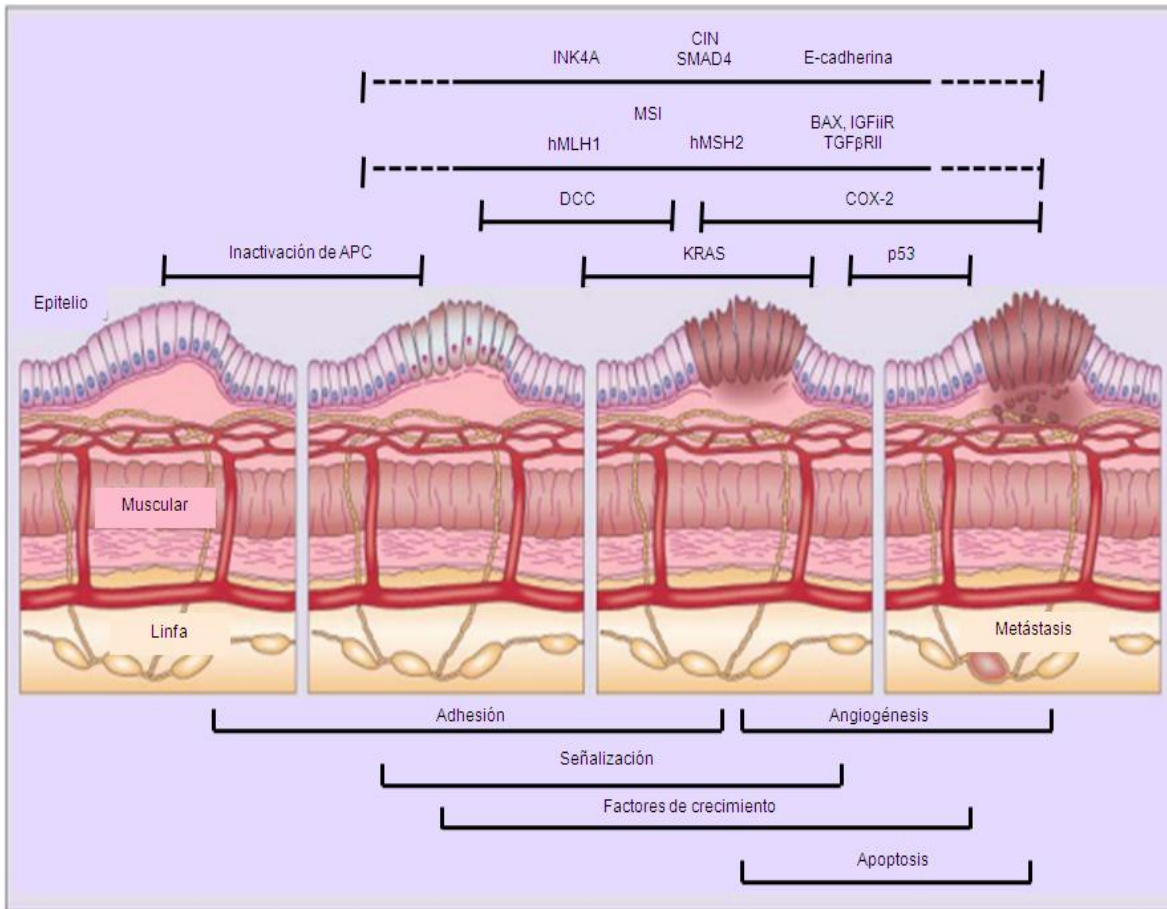


Figura 7. Secuencia de adenoma a carcinoma y las alteraciones moleculares involucradas en el desarrollo de cáncer de colon (Niederhuber *et al.*, 2004).

### 2.5.1 Ciclo celular

Las células eucariotas viven de acuerdo con un reloj interno; progresan a través de una secuencia de fases, llamadas en conjunto ciclo celular, en la cual se duplica el ADN durante la fase de síntesis (S) y las copias se distribuyen en extremos opuestos de la célula durante la fase mitótica (M) (Lodish *et al.*, 2003a). La función más importante del ciclo celular es duplicar con exactitud el ADN de los cromosomas y luego segregar las copias con precisión en dos células hijas idénticas (Alberts *et al.*, 2004a).

Las fases funcionales del ciclo celular son el copiado exacto del ADN, conocida como fase S o réplica de ADN, y la duplicación exacta de cromosomas entre células hijas, que corresponde a la fase M o mitosis. La célula se prepara bioquímicamente para la fase S

en una fase conocida como G1 y la preparación para la mitosis se lleva a cabo en la fase conocida como G2. Las células que no estén activamente dividiéndose se pueden eliminar permanentemente a partir de esta fase o arrestar temporalmente en un estado no cíclico conocido como G0 (Kastan, 1997).

La fase G1 resulta tras la división celular. En este punto, la célula contiene dos copias de cada cromosoma, estado diploide normal (Mathews *et al.*, 2002). Los eventos moleculares en la fase G1 de un ciclo celular preparan a la célula para la fase de síntesis de DNA. Hay una etapa dentro de G1 conocida como punto de restricción (R), después del cual se confía a la célula para progresar dentro de la fase de síntesis o fase S (Kastan, 1997). Durante ésta, el ADN se replica y las histonas y proteínas no histonas se depositan sobre las moléculas hijas de ADN para reproducir las estructuras de la cromatina. Cuando se ha completado la replicación, la célula pasa a la fase G2. En este momento tiene un contenido de ADN de cuatro veces la cantidad haploide (4C). Esta fase es llamada interfase, en la que la cromatina está dispersa por todo el núcleo y ocupada activamente en la transcripción. Al final de la fase G2, la célula entra en el proceso de mitosis, que consta de varias subetapas (Mathews *et al.*, 2002).

Durante la primer subetapa, la profase, los cromosomas replicados, cada uno compuesto de dos cromátidas idénticas, se condensan en estructuras compactas y quedan liberados en el citoplasma, una vez que se desintegra la membrana nuclear (Lodish *et al.*, 2003a) y se forma el huso mitótico. El huso está formado por microtúbulos contráctiles que traccionan los pares de cromátidas separándolas, de manera que cada una de las células hijas reciba un conjunto idéntico de cromosomas, esta es la denominada anafase (Mathews *et al.*, 2002). A continuación, la célula se escinde en dos mediante la división citoplasmática o citocinesis, y la división celular finaliza (Alberts *et al.*, 2004a). Tras la división, los cromosomas de las células hijas se condensan y comienza una nueva fase G1 (Mathews *et al.*, 2002). En la Figura 8 se muestra el ciclo celular de manera general.

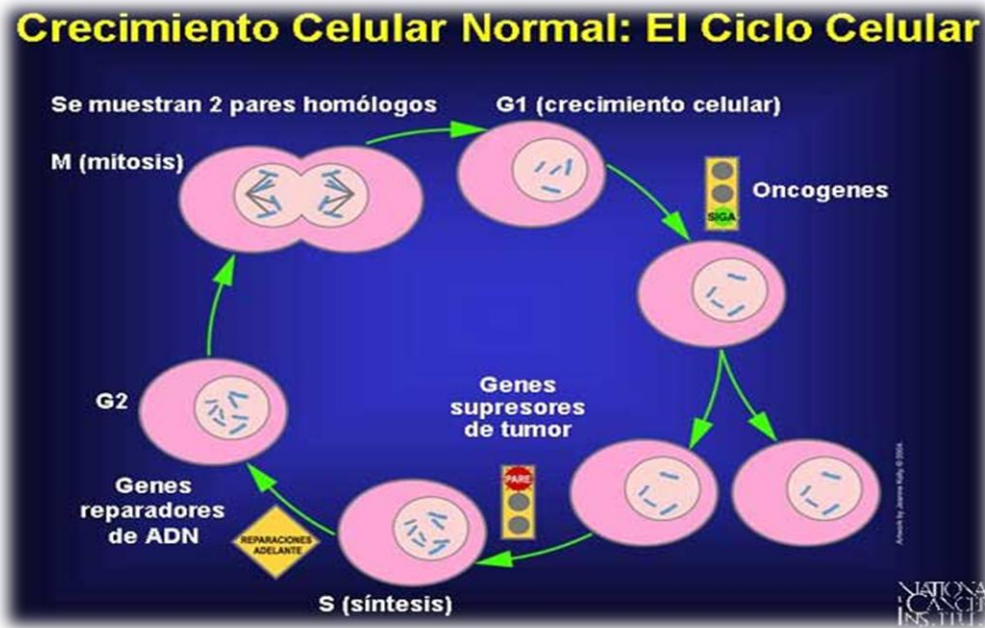


Figura 8. El Ciclo Celular ([www.nci.nih.gov](http://www.nci.nih.gov)).

El ciclo celular consta de varios puntos de control, en los que el ciclo puede detenerse si los acontecimientos previos no se han completado. La espera en estos puntos de control del daño en el ADN proporciona tiempo para que el ADN dañado sea reparado (Alberts *et al.*, 2004a). Esta regulación al ciclo celular es posible gracias a las cinasas heterodiméricas. Las subunidades reguladoras de estas cinasas son llamadas ciclinas y sus subunidades catalíticas se denominan cinasas dependientes de ciclinas (Cdk), porque carecen de actividad cinasa a no ser que se asocien con una ciclina.

El primer blanco de estos complejos ciclina D/Cdk4,6 son los productos del gen Retinoblastoma (Rb). La fosforilación de la proteína Rb (pRb) marca la entrada al punto de restricción y ocurre en dos fases: la fosforilación inicial es mediada por el complejo Ciclina D/Cdk4,6 (Murakami y Vande-Woude, 2001) seguido por la activación de Cdk2 por Ciclina E, quienes completan la fosforilación de pRb (Kaldis y Aleem, 2005). El gen Rb actúa como activador de la transcripción de genes que suprimen la proliferación celular, participando en el arresto al ciclo celular en G1/S (Fojer y te Riele, 2006). La proteína pRb interactúa físicamente con factores de transcripción de la familia E2F, quien regula genes necesarios para la replicación y su expresión es requerida para que las células entren a la

fase S; pRb inhibe la acción de E2f1 (Sherr, 2004). El proceso antes mencionado se muestra gráficamente en la Figura 9.

Los complejos de ciclinas-Cdk son regulados en G1 por dos clases de proteínas inhibidoras endógenas: la familia Ink4 (inhibidores de Cdk4) (p16, p15, p18 y p19) y por la familia Cip1/kip1 (Murakami y Vande-Woude, 2001), como Cdk p21<sup>WAF1/CIP1</sup> y p27<sup>KIP1</sup>, los cuales inhiben sus actividades cinasas y previenen la progresión del ciclo celular (Edgar y Orr-Weaver, 2001).

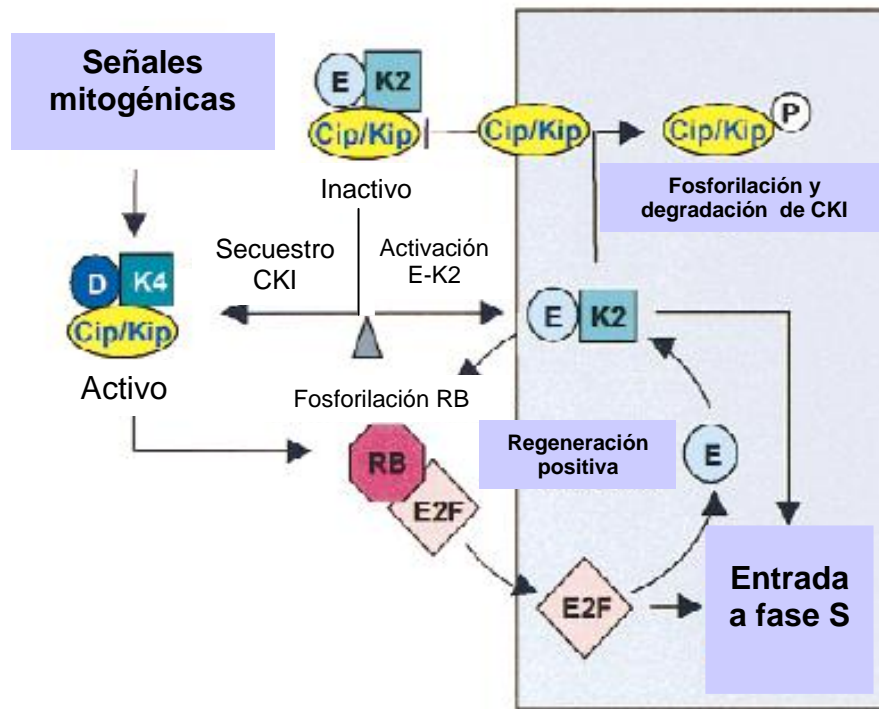


Figura 9. Regulación de la transición de la etapa G1 a S (Sherr y Roberts, 1999).

La proteína en mamíferos más notable como punto de control es p53, la cual en ciclos celulares normales se mantiene en baja concentración, pero cuando sucede un daño al ADN sus niveles incrementan dramáticamente. La inducción de p53 resulta en la transcripción de una variedad de genes que regulan el arresto al ciclo celular, provocando el bloqueo del ciclo en la fase G<sub>1</sub> y posiblemente en la fase G<sub>2</sub>, permitiendo que la reparación del material genético tenga lugar antes del comienzo de la síntesis de ADN y de la mitosis, promoviendo también apoptosis (Murakami y Vande-Woude, 2001).

La transición de la fase G2 a M está regulada por Ciclina A y B en complejo con Cdk1. La entrada a la mitosis es inhibida cuando Cdk1 presenta fosforilaciones en 2 residuos o por el secuestro del complejo Cdk1/Ciclina B fuera del núcleo. Esto se logra por las proteínas Chk1 y Chk2, quienes se activan durante el daño al ADN y fosforilan a Cdc25. La fosforilación de Cdc25 inhibe su actividad y promueve su secuestro por 14-3-3 $\sigma$  o Stratifin (Sfn), quien a su vez evita la activación del complejo Cdk1/Ciclina B promoviendo el arresto al ciclo celular antes de la entrada a la mitosis (Vermeulen *et al.*, 2003; Lindqvist *et al.*, 2009).

### **2.5.1.1 p53**

El gen p53 es un regulador transcripcional, fue el primer gen supresor de tumores ligado a apoptosis; las mutaciones en p53 ocurren en la mayoría de los tumores humanos y son a menudo asociados con etapas avanzadas del tumor (Lowe y Lin, 2000). Está localizado en el cromosoma 17 y codifica una fosfoproteína de 53 kD que actúa como factor de transcripción, regulador positivo o negativo de la expresión de diversos genes secundarios que participan en el control del ciclo celular (Díez-Alonso *et al.*, 2001). Cuando p53 se encuentra mutado las células dañadas no pueden morir y continúan proliferando, acumulando muchas más mutaciones genéticas que pueden transformarlas en tumorales (Alberts *et al.*, 2004b). Su incremento se observa cuando las células se exponen a agentes que dañan al ADN, e induce a que se detengan al final de la fase G1 para que sean reparados los daños en el ADN, antes de continuar con su replicación en fase S. Las células con p53 mutado no interrumpen el ciclo celular aún después de que el ADN ha sufrido daño. p53 es requerido para apoptosis inducida por el mal funcionamiento del telómero; así, las células mutadas en p53 sobreviven esa respuesta y son genómicamente inestables. La pérdida combinada de telomerasa y p53 estimula el desarrollo del tumor. Las mutaciones en p53 son generalmente los últimos acontecimientos en el desarrollo del tumor porque una célula que adquiere una mutación en p53 no puede tener ventaja selectiva hasta que el tumor que es convertido encuentra condiciones hipóxicas o alcanza suficiente erosión del telómero (Lowe y Lin, 2000).



La regulación río abajo dependiente de proteínas de p53 necesarias para la mitosis requiere de diversos pasos, los cuales incluyen la acumulación de la proteína p21/WAF1, la inhibición de la actividad de Cdk, la acumulación de proteínas de retinoblastoma hipofosforiladas, la represión de promotores blanco de E2f/Rb y la disminución de los niveles del estado constante de las proteínas que codifican (Jackson *et al.*, 2005).

En general, los genes regulados transcripcionalmente por p53 se agrupan dependiendo de las funciones que realizan como: inhibición del ciclo celular (p21, Gadd45a, 14-3-3 sigma, Reprimo, entre otros), reparación del daño en el ADN (Gadd45a, p21, p48, entre otros), inhibición de la angiogénesis e inducción de la apoptosis (Bax, Noxa, Puma, Apaf- 1, Dr5, Pig3 y Fas, entre otros) entre otros. La cascada de señalización de p53 se muestra en la Figura 10 (Ballesteros *et al.*, 2007).

La incidencia de sobreexpresión de p53 en cáncer colorectal reportado en la literatura es similar a las mutaciones en p53. Tanto las mutaciones como la sobreexpresión ocurren más frecuentemente en tumores distales (zona izquierda del colon) comparados con los tumores proximales (zona derecha del colon) (Iacopetta, 2003).

Akkiprik *et al.* (2007) observaron ocurrencia de mutaciones en regiones conservadas de p53, las cuales fueron menos frecuentes en la parte proximal que en la distal en cánceres de colon. La sobreexpresión de p53 fue menos frecuente en tumores localizados en colon distal comparado con el proximal. Esto sugiere que existen diferentes factores etiológicos involucrados en la patogénesis de zona distal y proximal en cáncer de colon.

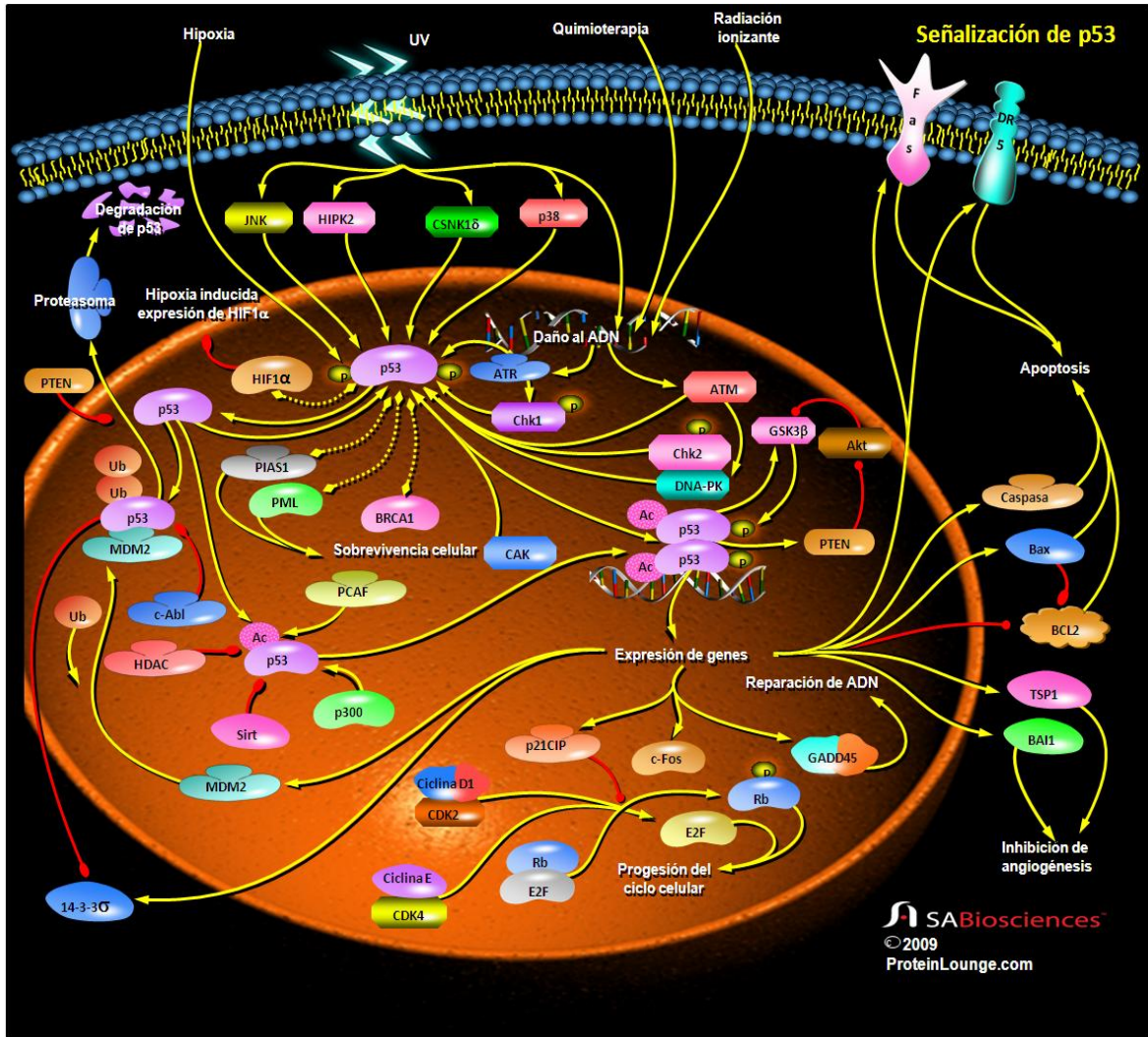


Figura 10. Cascada de señalización del gen p53 (Sabiosciences, 2009).

### 2.5.1.2 p21

Cuando se produce una alteración en la secuencia normal del ADN, la proteína producida por p53 activa la síntesis de la proteína p21, producida por el gen *Cdkn1a*, la cual actúa como un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina con alta especificidad por Cdk que actúan durante G/S (Damia y Brogini, 2004). p21 se acopla al complejo Cdk-Ciclina D1, impidiendo la fosforilación de proteínas que intervienen en la replicación del ADN (en el paso de la fase G1 a la fase S), lo que bloquea la progresión del ciclo celular y permite que la célula pueda reparar algún daño (Díez-Alonso *et al.*, 2001).

Waldman *et al.* (1995) demostraron que las células de cáncer de colon HCT116 requieren de p21 como punto de control en G1 dependiente de p53, después de provocar un daño genómico por irradiación o por agentes. Sus resultados implican a p21 como mediador importante de la acción de p53 en G1, requerido para las características inhibitorias del ciclo celular después de la estimulación en su expresión.

### **2.5.1.3 Retinoblastoma**

El gen retinoblastoma (Rb) codifica a una fosfoproteína nuclear de 105 kD que en estado no fosforilado puede ligar y suprimir a los factores de transcripción E2f1, cuya actividad es esencial para la transición G1/S (Foiyer y te Riele, 2006).

La proteína retinoblastoma (pRb) es supresora de tumores. Está asociada con E2f1 durante la fase G1, y cuando es fosforilada libera a E2f1, la cual participa en la transcripción de varios genes requeridos en el ciclo celular. El gen Rb también actúa como activador de la transcripción de genes que suprimen la proliferación celular, y se conoce que pRb puede participar en el proceso de apoptosis mediada por p53 (Peralta-Zaragoza *et al.*, 1997). La fosforilación de las proteínas de pRb a mitad de la fase G1 es funcionalmente importante porque está asociada a la pérdida de las actividades represoras de crecimiento que presentan dichas proteínas. Esta fosforilación se lleva a cabo por complejos de cinasas dependientes de ciclinas, D/cdk, E/cdk2 y A/cdk2, por lo que éstas regulan negativamente la actividad de pRb (Graña *et al.*, 1998) (Figura 11).

En tumores humanos donde Rb está mutada, ésta se hiperfosforila y pierde la capacidad de suprimir la proliferación celular, por lo que Rb puede actuar como un precursor tumoral. 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).

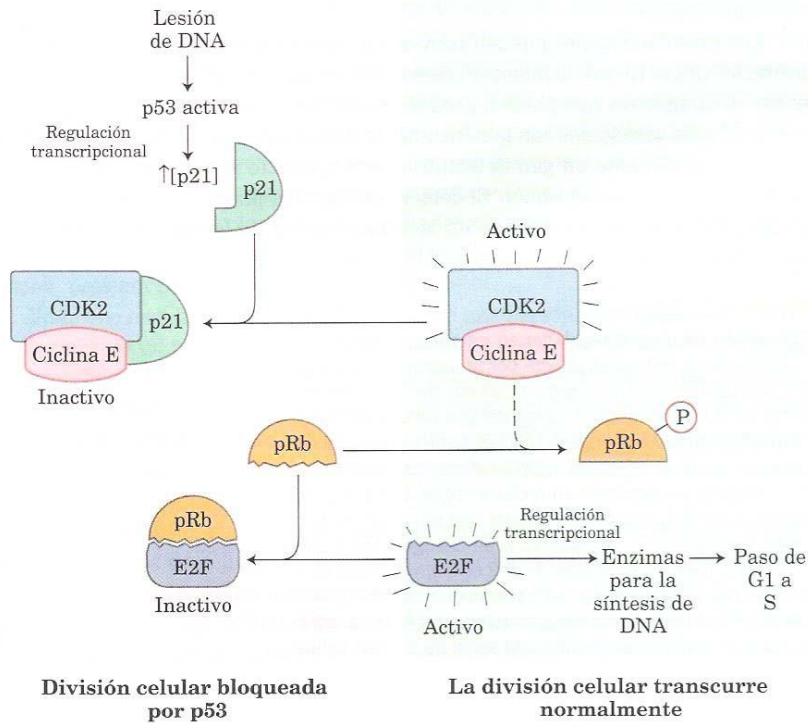


Figura 11. Papel de la proteína pRb en el progreso del ciclo celular (Nelson, 2000).

#### 2.5.1.4 Ciclinas / cinasas dependientes de ciclinas

Las proteínas clave reguladoras del ciclo celular son las cinasas dependientes de ciclinas (Cdk), una familia de proteínas serin/treonin cinasas que son activadas en puntos específicos durante el ciclo celular (Vermeulen *et al.*, 2003). La actividad cinasa de todas las Cdk requiere la unión a su regulador positivo conocido como ciclina, además de la fosforilación de Cdk en un residuo de treonina. Cada de las fases del ciclo celular es caracterizada por la expresión de diferentes tipos de ciclinas y las fluctuaciones en los niveles de ciclinas representan el mecanismo primario por el cual la actividad de Cdc es regulada (Obaya y Sedivy, 2002). La Figura 12 muestra las cascadas de señalización controladas por los complejos Cdk/Ciclinas.

Hasta ahora se han identificado nueve Cdk de las cuales cinco son activadas durante el ciclo celular: en la fase G1 se activan Cdk4, Cdk6 y Cdk2; en la fase S se activa

Cdk2; en las fases G2 y M se activa Cdk1. Cuando éstas son activadas, inducen procesos río abajo por la fosforilación de proteínas selectas (Vermeulen *et al.*, 2003).

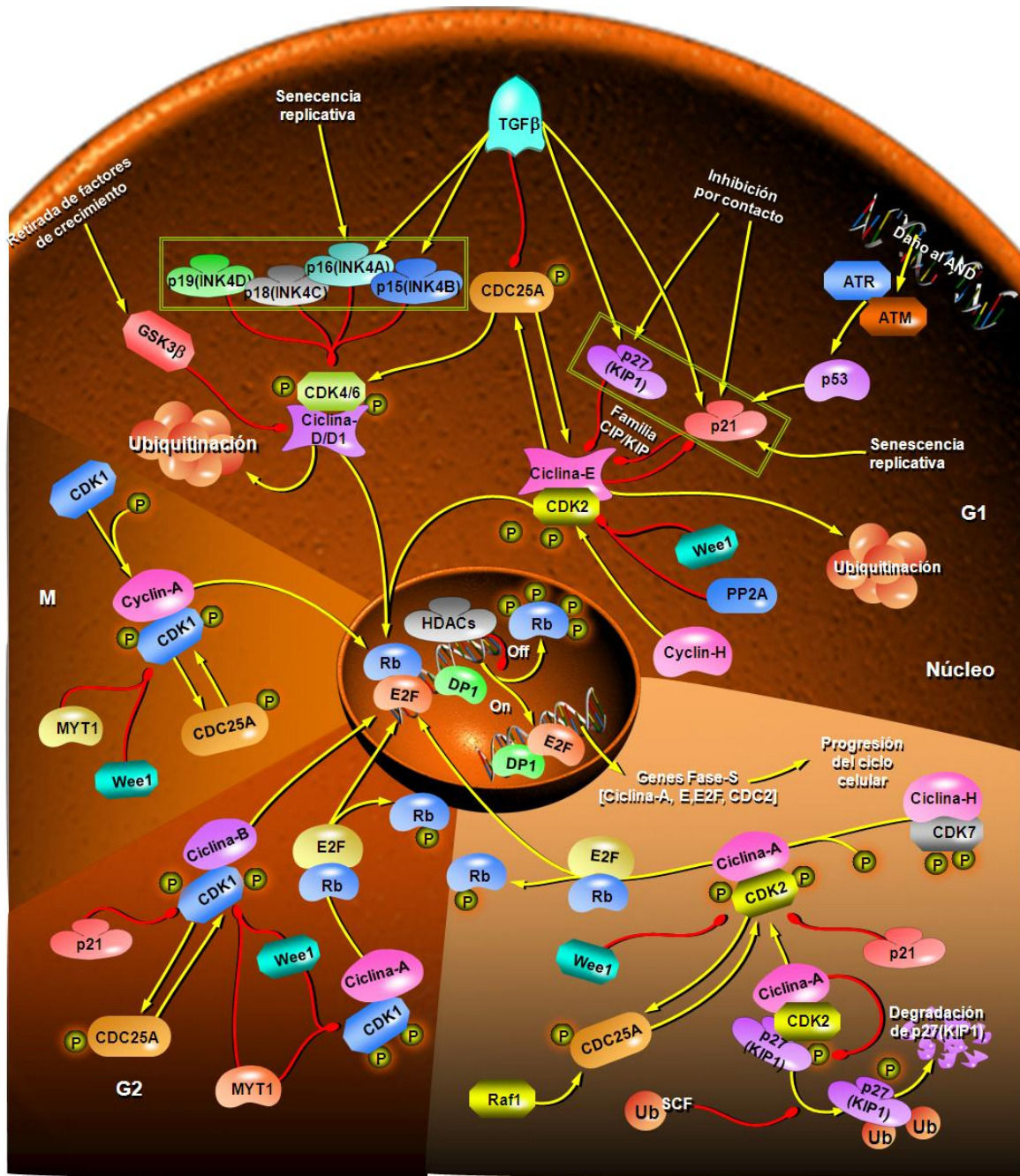


Figura 12. Regulación del ciclo celular por ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (Sabiosciences, 2009).

Por su parte las ciclinas se asocian con las diferentes fases: Ciclina D se asocia con G1; Ciclina E y A con la fase S y la Ciclina B y A con la fase M. Cada ciclina tiene un papel individual a lo largo del ciclo celular (Murray, 2004).

El blanco de fosforilación más importante para los complejos Cdk/ciclinas es el producto del gen supresor de tumor retinoblastoma (Rb). Cdk 4-6/Ciclina D fosforila a Rb y esto conduce a la disrupción del complejo con la proteína histona deacetilasa (Hdac) y libera al factor de transcripción E2f1 y DP1, quienes regulan positivamente la transcripción de genes cuyos productos son requeridos para la progresión a la fase S del ciclo celular. El estado fosforilado de Rb lo mantiene Cdk2/Ciclina E, y este mismo complejo también fosforila histona H1 que es importante para la condensación de cromosomas requerida durante la replicación de ADN (Obaya y Sedivy, 2002; Vermeulen *et al.*, 2003).

### **2.5.2 Apoptosis**

La apoptosis es una cascada ordenada de eventos enzimáticos que culmina en muerte de la célula y la unión del ADN en fragmentos nucleosomales característicos (Pawlowsky y Kraft, 2000). Existe evidencia que indica que las alteraciones en el control de la muerte celular o sobrevivencia contribuyen a la patogénesis de muchas enfermedades humanas, incluidas el cáncer, enfermedades autoinmunes y degenerativas, entre otras (Zörning *et al.*, 2001).

La apoptosis es la forma predominante de muerte celular fisiológica, en contraste a la necrosis celular. El primer signo visible de la apoptosis es la condensación del núcleo y la fragmentación del ADN; también disminuye el tamaño del cuerpo celular, aunque los organelos permanecen intactos; más adelante se fragmentan el núcleo y el citoplasma y se forman cuerpos apoptóticos, que son fagocitados por células circundantes (macrófagos) sin dejar rastro ni inducir una respuesta inflamatoria. Una célula es dirigida al suicidio cuando un factor esencial desaparece del medio extracelular o cuando se activa una señal interna (Lodish *et al.*, 2003b; de la Rosa *et al.*, 2000). La habilidad de p53 para eliminar exceso,

daño o células infectadas por medio de la apoptosis es vital para la apropiada regulación de la proliferación celular en organismos multicelulares (Haupt *et al.*, 2003).

Existen dos vías conocidas para la activación de la apoptosis en las células de mamíferos: la extrínseca y la intrínseca, mostradas en la Figura 13.

La muerte celular vía extrínseca (Figura 13) es activada a través de receptores de señales extracelulares de muerte en la membrana celular tales como Fas/L y el receptor de factor de necrosis tumoral (Tnfr1) por ligandos específicos. Esta vía participa principalmente en condiciones patológicas en las que la inflamación es predominante (Alberts *et al.*, 2004a; Fischer y Schulze-Osthoff, 2005).

En la vía intrínseca mitocondrial (Figura 13), la cual es iniciada por múltiples formas de estrés celular, los miembros de la familia Bcl-2 Bax y Bak se traslocan a la mitocondria. La proteína BH3 activa a Bax y Bak para regular el lanzamiento de citocromo C al citosol y éstos bloquean la sobreexpresión de Bcl-2. Esto acciona el complejo del apoptosoma (Apaf-1 y caspasa 9) y la activación de caspasa 3, resultando en la subsecuente degradación de sustratos de muerte celular. IAPs se une directamente a las caspasas e inhibe su actividad enzimática. La inhibición de la función de IAPs es contraria a la de Smac (Fischer y Schulze-Osthoff, 2005; Lowe y Lin, 2000).

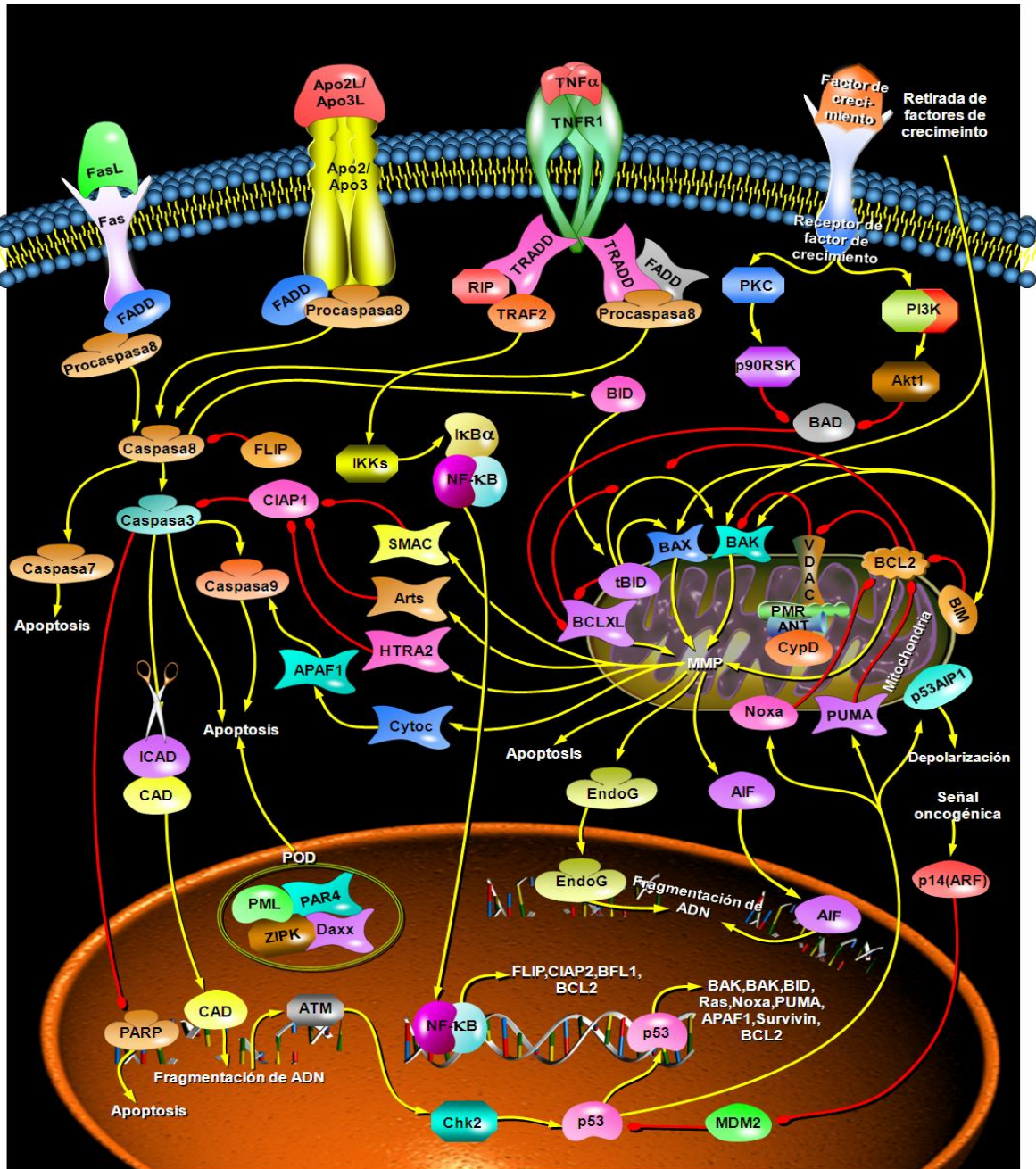


Figura 13. Transducción de señales de la apoptosis (Sabiosciences, 2009).

### 2.5.2.1 Bcl-2

La familia de proteínas Bcl-2 consiste de por lo menos 16 miembros que poseen uno o más de los 4 dominios conservados referidos como dominios homólogos Bcl-2 o BH1 por BH4 (Kimmelman *et al.*, 2001). El gen Bcl-2 actúa como agente oncogénico que



estimula la supervivencia celular, más que la proliferación celular, por lo que es considerado como regulador que suprime la vía apoptótica (Lodish *et al.*, 2003b).

La función de los miembros de la familia Bcl-2, en parte, es el bloqueo del lanzamiento del citocromo C desde la mitocondria (Pawlowsky y Kraft, 2000). La sobreexpresión de las proteínas de la familia Bcl-2 como Bcl-2, Bcl-xL, A1 o Mcl-1, son frecuentemente observadas en tumores de distintos orígenes (Fischer y Schulze-Osthoff, 2005).

### **2.5.2.2 Bax**

Bax, una proteína de 21 kDa inmunoprecipitada con Bcl-2, ha sido definida como un promotor de muerte celular cuya función pro-apoptótica, es directamente antagonizada por Bcl-2 a través de la formación de heterodímeros Bax/Bcl-2. La proteína Bax es un homólogo de Bcl-2, Bax puede ligarse a Bcl-2 formando heterodímeros o puede ligarse consigo mismo formando homodímeros Bax/Bax. El cociente Bax/Bcl-2 determina la susceptibilidad de una células a la apoptosis (Bai y Meng, 2005).

En contraste a los miembros de la familia Bcl-2, la inserción de los miembros de la familia Bax dentro de la membrana mitocondrial induce el lanzamiento del citocromo C y la inducción de muerte celular por apoptosis. Los miembros de proteínas de la familia Bax son activados por unión a caspasas, inhibición de proteínas cinasas y/o activación de fosfatasas, y un incremento en el pH intracelular (Pawlowsky y Kraft, 2000).

Jansson y Sun, 2002, demostraron que la expresión de Bax en tumores colorectales primarios disminuye desde bien/moderadamente diferenciados (66%), a tumores pobremente diferenciados (45%), sugiriendo que la expresión de este gen está envuelta en la diferenciación del tumor; en cáncer colorectal; la baja expresión de Bax fue correlacionada con mayor profundidad de la invasión de tumor, invasión de la linfa, etapa avanzada y con un peor pronóstico.

### 2.5.2.3 Caspasas

Las caspasas son proteasas de cisteína que son expresadas como pro-enzimas inactivas (Lowe y Lin, 2000). Los miembros de la familia de caspasas forman el motor de la apoptosis y están implicados en la iniciación, ejecución y fases reguladoras de este camino. El subconjunto de caspasas selecciona los substratos para producir los cambios típicos de la alteración asociados a apoptosis se conocen como caspasas efectoras, que en los mamíferos son caspasas -3, -6, y -7. Las caspasas efectoras son activadas por caspasas iniciadoras, incluyendo caspasa -8, -9, y -10 (Fischer y Schulze-Osthoff, 2005).

Cuando las células están dañadas o estresadas pueden auto-eliminarse induciendo la segregación y activación de las procaspasas desde el interior de la célula. Las mitocondrias son inducidas a liberar la proteína transportadora de electrones citocromo C al citosol, donde se une y activa una proteína adaptadora llamada Apaf-1, la cual contiene un dominio de reclutamiento caspasa N-terminal (Alberts *et al.*, 2004a).

Las caspasas efectoras 3 y 7 son reguladas por la proteína Apaf-1. Cuando la proteína Apaf-1 es homodimerizada en presencia de dATP y el citocromo C es lanzado de la mitocondria, Apaf-1 se liga a dos moléculas de caspasas 9 juntas, de tal modo que activa la caspasa iniciadora. La activación de caspasa 9 entonces induce la unión de efectores de proteasas, caspasa 3 y 7, activando su actividad proteasa. El efector de caspasas es responsable del proceso de degradación controlada que es característica de la muerte celular apoptótica (Pawlowsky y Kraft, 2000). Caspasa-9 y su adaptador Apaf-1 son esenciales componentes río abajo de p53 en la muerte inducida por oncogenes (Lowe y Lin, 2000). La apoptosis es esencial para mantener el balance normal entre nacimientos y muertes celulares. En los organismos pluricelulares las células mueren por apoptosis cuando advierten que algo no funciona; la resistencia a la apoptosis es una de las características de las células malignas, vital para permitir su crecimiento y supervivencia en lugares extraños (Alberts *et al.*, 2004b).

#### **2.5.2.4 Receptores de muerte de la membrana celular**

Los receptores de muerte son receptores de la superficie celular que transmiten señales de apoptosis iniciadas por ligandos específicos. Activan la cascada de la apoptosis segundos después de haberse ligado. Estos receptores pertenecen a la familia de genes del factor de necrosis tumoral alfa ( $Tnf\alpha$ ) (Calderón-Velasco, 2005). Para inducir apoptosis se requieren receptores de muerte como Fas/CD95, cuyo dominio de muerte contiene los receptores Trail, Trail-R1/Dr4 y Trail-R2/Dr5; Tnfr1, Dr3 y Dr6 (Andera 2009).

La unión del ligando de muerte a su receptor pro-apoptótico va a tener como consecuencia la trimerización del receptor y el reclutamiento de proteínas citoplasmáticas adaptadoras con dominios DD homólogos al del receptor, para formar así el denominado inductor de señales de muerte (DISC). Además de dominios DD, algunas de estas proteínas adaptadoras, como Fadd, presentan dominios efectores de muerte (DED), que van a permitir el reclutamiento y activación de las caspasas iniciadoras 8 o 10 a nivel del DISC, mismas que posteriormente activan a caspasa 3 desencadenando de esta manera la cascada apoptótica vía extrínseca (Kischkel *et al.*, 2000).

#### **2.5.2.5 Nfkb**

El factor de transcripción Nfkb puede intervenir positivamente en la cascada apoptótica por su capacidad de regular la expresión de Trail y de sus receptores de muerte (Baetu *et al.*, 2001). En células T maduras, la apoptosis ocurre a través de la transducción de señales iniciada por el ligando Fas. Fas pertenece a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (Tnf). Nfkb activa la expresión de ligandos Fas (FasL) seguido de la acción del receptor de células T, por lo tanto Nfkb presenta un rol pro-apoptótico dependiendo del estímulo (Barkett y Gilmore, 1999). Kasibhatla *et al.* (1998) demostró que la activación de los factores de transcripción Nfkb y AP-1 es crucialmente involucrada en la expresión de FasL inducida por irradiación UV.

Por otro lado, la cascada de señalización de  $\text{Nf}\kappa\text{b}$  también es un potencial inductor de la actividad de p53 y estabilizador del mismo en respuesta a agentes quimioterapéuticos (Fujioka *et al.*, 2004), lo que podría contribuir a la inducción de apoptosis bajo un daño al ADN como consecuencia al desencadenamiento de las funciones de p53.

Así, dependiendo del contexto de células cancerosas y tipo de estímulo, la activación de  $\text{Nf}\kappa\text{b}$  en células pre-cancerosas puede tener funciones de sobrevivencia y promover la conversión maligna o, por otro lado, tener un papel pro-apoptótico aumentando la muerte celular para eliminar estas células iniciadas (Wu y Miyamoto, 2008).

#### **2.5.2.6 Apoptosis independiente de caspasas**

En células de mamíferos, bajo ciertas circunstancias, pueden desencadenar el proceso apoptótico de una manera independiente de caspasas a través de la disrupción del potencial de la membrana mitocondrial y la liberación y traslocación de AIF y endonucleasa G (endo G) al núcleo, en donde inducen la condensación de la cromatina y/o la fragmentación a gran escala del ADN (Cregan *et al.*, 2004) (Figura 14).

Después de la activación apoptótica, endo G y AIF se traslocan del citosol al núcleo, en donde inducen la condensación de la cromatina y la fragmentación de ADN de alto peso molecular (50 kpb), aún en células deficientes en Apaf-1 y caspasa 3, por lo que se corrobora la inducción de apoptosis independientemente de la activación de caspasas (Figura 14) (Ravagnan *et al.*, 2002; Mohamad *et al.*, 2005).

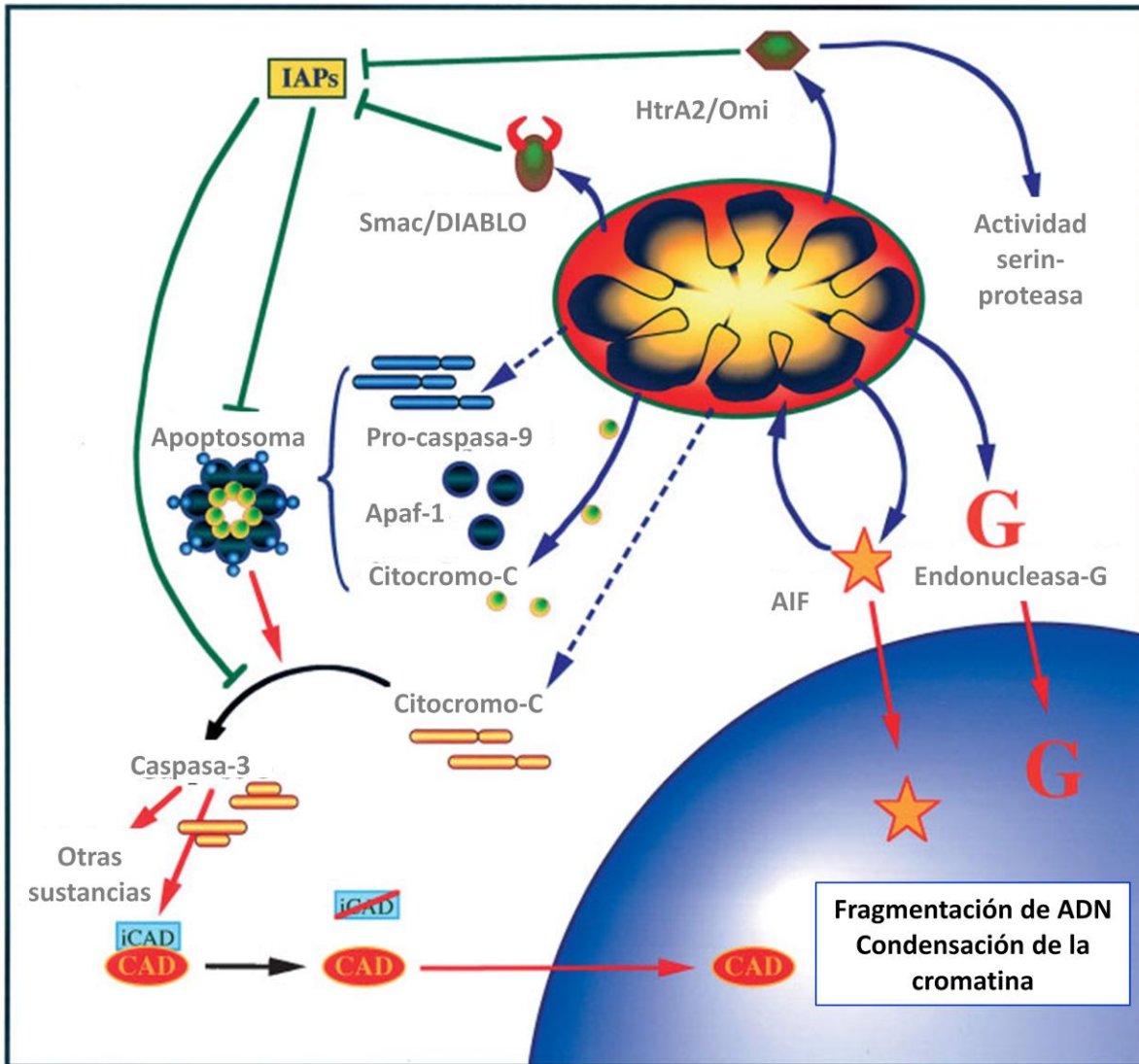


Figura 14. Inducción de apoptosis dependiente e independiente de caspasas (Ravagnan *et al.*, 2002; Cregan *et al.*, 2004).

Estas moléculas pro-apoptóticas son liberadas de la mitocondria independiente de Bax/Bak por perturbaciones celulares que causan un incremento repentino en los niveles de calcio intracelular como se ve después de una lesión aguda como el infarto de miocardio o accidente cerebrovascular. Por lo tanto, los estímulos múltiples de muerte con o sin la participación de la familia clásica de proteínas Bcl convergen en la mitocondria para activar la liberación de moléculas pro-apoptóticas para iniciar la cascada de la muerte (Cregan *et al.*, 2004).

### 2.5.3 Genes involucrados en reparación de ADN

El cáncer de colon también puede ser producto de inestabilidad genética (MSI, por sus siglas en inglés Microsatellite instability,) que corresponde a un defecto en el sistema de reparación de errores del ADN y se han encontrado hasta en un 12-15% de los casos de tumores esporádicos (Casimiro, 2002). El camino MSI involucra la pérdida de la función de genes reparadores de ADN como Mlh1, Msh2, Pms1, Pms2 y Msh6 generando errores durante la replicación. Este camino se ha referido como camino mutador, porque involucra muchas mutaciones de genes clave (Itzkowitz y Yio, 2004).

Otro gen clave en la reparación por escisión de pares de bases es Gadd45a, quien es un efector clave de la señalización de p53 involucrada en la protección del daño de carcinógenos. Gadd45a interactúa con PcnA en la fase temprana del proceso de reparación de ADN. PcnA participa en el paso de incisión mediada por la endonucleasa APE1/Ref1 y en la resíntesis mediada por la ADN polimerasa (Figura 15) (Jung *et al.*, 2007). PcnA también interactúa con los reparadores de ADN Msh2, Msh3 y Msh6 y aumenta su especificidad (Maga y Hübscher, 2003).

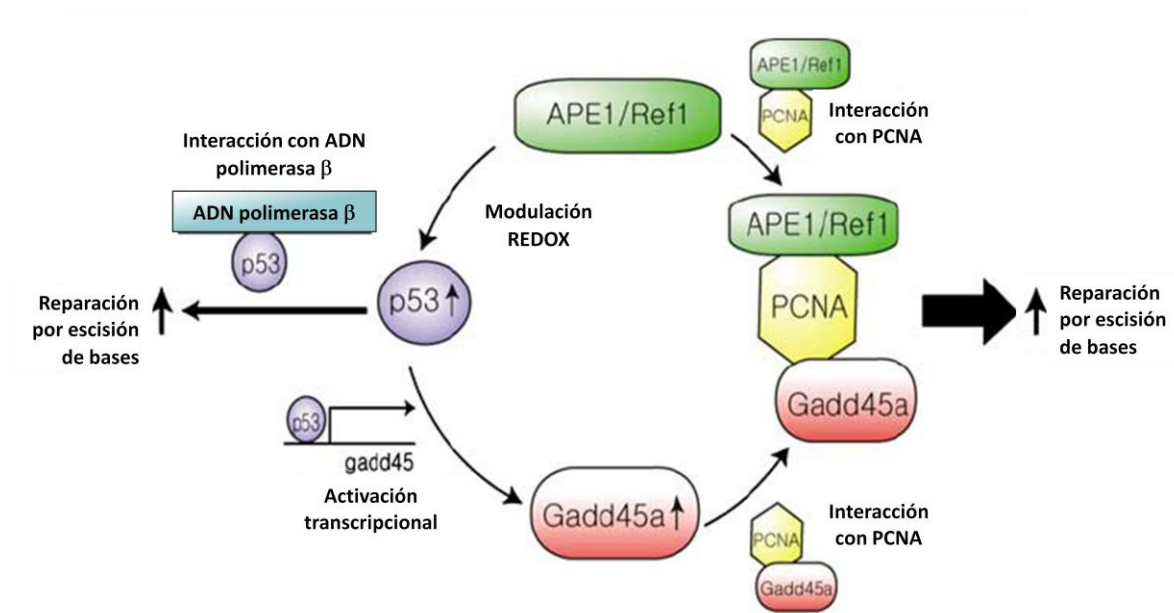


Figura 15. Modelo sugerido para el rol de Gadd45a, PcnA y APE1/Ref1 en la respuesta de reparación por escisión de bases (Jung *et al.*, 2007).

## **2.5.4 Genes involucrados en cáncer de colon e inflamación**

Estudios han demostrado que el proceso de inflamación también juega un papel importante durante la progresión de la carcinogénesis de colon. Se han establecido algunas proteínas de suero y expresión de genes como biomarcadores eficaces para identificar el riesgo a desarrollar estas patologías que incluyen  $Tnf\alpha$ ,  $Nfkb$ ,  $Il-6$ , entre otros. Muchos de estos marcadores se han visto alterados como resultado de la inducción de cáncer con azoximetano (Mentor-Marcel *et al.*, 2009; Takahashi y Wakabayashi, 2004).

### **2.5.4.1 $Nfkb$**

$Nfkb$  es un factor de transcripción que juega un papel central en el proceso inflamatorio en diversas enfermedades como artritis reumatoide, esclerosis múltiple y asma, entre otras (Tergaonkar *et al.*, 2002), a través de su habilidad para inducir la transcripción de genes pro-inflamatorios, como  $Tnf\alpha$ ,  $Il-1\beta$ ,  $Il-6$ ,  $Il-8$  y  $Cox-2$ , entre otros (Tak y Firestein, 2001). La activación constitutiva de  $Nfkb$  es frecuentemente observada en cáncer de colon y juega un papel importante en la angiogénesis, promoviendo el crecimiento del tumor. Se ha demostrado que la inhibición de  $Nfkb$  es suficiente para inhibir la angiogénesis mediada por células tumorales, por lo que puede ser una potente terapia antiangiogénica en el cáncer colorectal (Sakamoto *et al.*, 2009).

### **2.5.4.2 $Il-6$**

$Il-6$  es una citocina multifuncional que fue originalmente caracterizada como un regulador de la respuesta inmune e inflamatoria; sin embargo, se ha detectado elevada expresión de  $Il-6$  en múltiples tumores epiteliales. Dado que se ha reportado que  $Il-6$  y sus blancos transcripcionales participan en la proliferación celular, sobrevivencia y metabolismo, no es sorprendente que la señalización de  $Il-6$  haya sido implicada en tumorogénesis (Schafer y Brugge, 2007). Se ha demostrado que  $Il-6$  incrementa la formación de colonias de células de carcinoma de colon *in vitro* de forma dosis-

dependiente, lo que sugiere que Il-6 puede impulsar el crecimiento del cáncer de colon (Schneider *et al.*, 2000).

## **2.6 FRIJOL COMÚN**

### **2.6.1 Generalidades**

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un alimento que está ampliamente distribuido en el mundo y se consume principalmente en países de Latinoamérica y África. Esta leguminosa, junto con el maíz, ha sido la base de la alimentación de México y Latinoamérica, principalmente por sus raíces culturales e históricas. El 70 % de la producción nacional se obtiene de áreas temporales, donde los principales estados productores se ubican en la Zona Noroeste (aportan entre el 60 al 70 % de la producción nacional); su cultivo en el campo mexicano sigue siendo relevante, ocupando el segundo lugar dentro de los 30 principales cultivos del país. Su cultivo se realiza en 32 estados de la República, sin embargo, los estados de Zacatecas, Sinaloa, Durango, Nayarit y Chihuahua concentran el 63% de la superficie sembrada y el 65% de la producción nacional (SAGARPA, 2007). El frijol Negro, junto con el Flor de Mayo y el Bayo, son de las variedades más demandadas en el ámbito nacional (SIAP y SAGARPA, 2004). La preferencia de la variedad de frijol dentro de México depende de la zona geográfica. En la región Noreste las principales clases comerciales consumidas son Pinto, seguida por Bayo, y en menor dominio Flor de Mayo y Flor de Junio. En la región Noroeste la principal clase comercial que se consume es el tipo azufrado. En la región Centro, se consumen prácticamente todas las clases comerciales, excepto el frijol pinto. Por último, en la región Sur se prefiere al frijol negro, seguido por el Bayo (Castellanos *et al.*, 1997).

Actualmente, esta leguminosa se enfrenta a modificaciones importantes ante una sociedad cambiante, incluidos los hábitos alimenticios, a consecuencia del urbanismo, la migración y el empleo, así como el paso de una economía cerrada a una economía global; todo lo cual está ejerciendo presiones en diversas etapas de la cadena de producción, comercialización, transformación y consumo, proceso que se ha reflejado en el consumo



*per cápita* en México. Como se muestra en la Figura 16, en el periodo 2000-2002 existió una tendencia ascendente; sin embargo, en 2003 y 2004, desciende en 2 y 4 puntos porcentuales en relación con 2002, respectivamente (SIAP y SAGARPA, 2004).

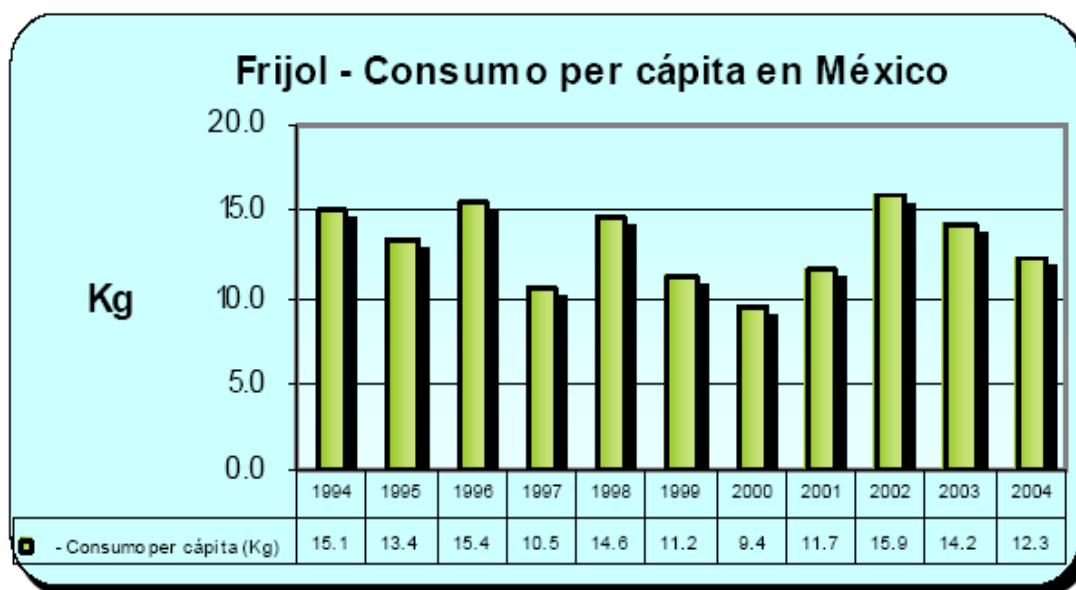


Figura 16. Consumo *per cápita* de frijol en México (SIAP y SAGARPA, 2004).

### 2.6.2 Composición del frijol

El frijol común tiene un contenido elevado de proteínas, carbohidratos, es rico en fibra dietaria (tanto soluble como insoluble) y tiene poco contenido de lípidos, aunque es rico en ácido linoléico; también es considerado una buena fuente de vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B<sub>6</sub> y ácido fólico), y de algunos minerales (calcio, magnesio, hierro, fósforo, potasio y zinc) (Serrano y Goñi, 2004). Se ha demostrado que el consumo de frijol común contribuye a la prevención y/o tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas, como obesidad, diabetes, cáncer y enfermedades cardiovasculares, tanto por su aporte de micronutrientes (particularmente ácido fólico y magnesio) como por su alto contenido de fibra, taninos, fitoestrógenos y aminoácidos no esenciales (Rodríguez-Castillo y Fernández-Rojas, 2003). El frijol es una fuente adecuada de aminoácidos aromáticos, lisina, leucina e isoleucina, aunque es deficiente en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), valina, triptofano y treonina. Sin embargo, el frijol se consume habitualmente con

tortillas de maíz, lo que supone una complementación de ambas proteínas, originando una proteína de alto valor nutricional (Serrano y Goñi, 2004). La composición química de frijol crudo se muestra en el Cuadro 2:

Cuadro 2. Composición del frijol crudo

Componente	Composición	Componente	Composición
Proteínas (g)	18.4 ± 0.1	Fitatos (mg/g)	13.82 ± 0.57
Lípidos (g)	2.3 ± 0.0	Taninos (mg/g)	13.78 ± 0.57
Cenizas (g)	0.6 ± 0.0	Vitaminas (mg/70.5 mg)	
Carbohidratos (g)	64.7	Tiamina	0.99
Fibra dietaria total	27.0	Riboflavina	0.201
(% materia seca)			
Fibra soluble	4.5	Niacina	1.93
Fibra insoluble	22.6	Vitamina B6	0.285
Almidón resistente	26.9	Ácido fólico	0.447
Almidón total	42.9	Fósforo	380.3
(% materia seca)			
Oligosacáridos (g/100g)		Potasio	1424.3
Rafinosa	0.40 ± 0.03	Calcio	5.2
Estaquiosa	3.23 ± 0.18	Magnesio	92.3
Verbascosa	0.12 ± 0.01	Zinc	195.6

(Costa de Oliveira *et al.*, 2001; Serrano y Goñi, 2004).

Entre los compuestos considerados como no nutritivos del frijol se pueden mencionar los inhibidores de enzimas (tripsina y  $\alpha$ -amilasa), fitatos, oxalatos, compuestos fenólicos y saponinas, entre otros. Sin embargo, se ha demostrado que a dosis controladas, éstos podrían ejercer efectos benéficos en la salud y en este sentido muchos autores los clasifican como compuestos bioactivos (Jenab y Thompson, 2002; Kennedy *et al.*, 2002; Serrano y Goñi, 2004, Gálvez-Ranilla *et al.*, 2007; Oboh y Omofoma, 2008).

### **2.6.3 Propiedades nutraceuticas**

El consumo de frijol común como fuente de fibra produce mayor saciedad, debido a un mayor volumen de alimentos; mayor tiempo de tránsito intestinal, lo que produce una mayor sensación de plenitud intestinal; niveles elevados de la hormona colecistoquinina, relacionado con reducciones en los niveles plasmáticos de glucosa e insulina en pacientes diabéticos (Bourdon *et al.*, 2001).

Al consumo de frijol se le ha atribuido un efecto hipocolesterolémico debido a su contenido de fibra dietaria que influye sobre el nivel de las lipoproteínas, disminuyendo las lipoproteínas de baja densidad (LDL). El consumo de frijol también se ha relacionado con la alteración de la excreción de ácidos biliares y esteroides, y de disminuir el coeficiente de digestibilidad de grasas (Duane, 1997), así como un incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta durante la fermentación colónica (Sengupta *et al.*, 2006).

Los componentes de la dieta que no son digeridos en la parte superior del tracto intestinal y los glicanos endógenos (mucinas, glicosfingolípidos, etc.) constituyen los principales nutrientes para la flora que reside en la parte distal del intestino delgado y en el colon. Entre éstos, los hidratos de carbono complejos (oligo- y polisacáridos) aportados por la dieta constituyen el grupo de sustratos más abundantes y fermentables por la flora (Sanz *et al.*, 2004). Estos carbohidratos son hidrolizados y fermentados por las bacterias intestinales, produciendo gases y en su mayoría ácidos grasos de cadena corta, como acético, propiónico y butírico (Granito *et al.*, 2001).

#### **2.6.3.1 Fibra dietaria**

La definición clásica de fibra incluye a la fracción de los alimentos derivada de la pared celular de las plantas, que resisten la hidrólisis por las enzimas digestivas en humanos (García-Peris *et al.*, 2002).

La fibra se ha clasificando, según su grado de solubilidad, en soluble e insoluble, tal como lo muestra la Figura 17. La fibra soluble es viscosa y fermentable, en cambio la insoluble no es viscosa y es escasamente fermentable (Valenzuela y Maiz, 2006). La fibra soluble en contacto con el agua forma un retículo donde queda atrapada, originándose soluciones de gran viscosidad. Los efectos derivados de la viscosidad de la fibra son los responsables de sus acciones sobre el metabolismo lipídico, hidrocarbonado y en parte su potencial anticarcinogénico. La fibra insoluble es capaz de retener agua en su matriz estructural formando mezclas de baja viscosidad; esto produce un aumento de la masa fecal que acelera el tránsito intestinal; contribuyendo en la disminución de la concentración y el tiempo de contacto de potenciales carcinogénicos con la mucosa del colon (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006).

El componente soluble es fermentado casi totalmente por la flora bacteriana para producir ácidos grasos volátiles, mientras que el componente insoluble se fermenta sólo una fracción y lo demás se excreta en concentraciones pequeñas en las heces (Park y Floch, 2007).



Figura 17. Composición de la fibra total (adaptado de Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006).

La fibra dietaria, especialmente la soluble, disminuye efectivamente el colesterol sérico y las concentraciones de LDL, lo cual puede contribuir a su papel protector contra enfermedades coronarias (Anderson *et al.*, 1995).

Por otro lado, existen datos experimentales que indican los efectos benéficos de la fibra soluble (carbohidratos no digeribles) sobre la reducción significativa de la incidencia de cáncer de colon en modelos animales, como rata y ratón. La protección que brinda esta fibra dietaria es a través de la inhibición de la activación de carcinógenos, prevención de mutaciones, y efectos de antiprogresión y apoptóticos (Niba y Niba, 2003).

La fibra dietaria que no se degrada ni se absorbe durante su paso del tracto gastrointestinal puede ejercer efectos importantes alimenticios como el retraso en el vaciamiento gástrico y en la asimilación de nutriente en el intestino delgado. Cuando pasan por el intestino grueso, éstos pueden ser degradados por las enzimas bacterianas y los productos de la degradación se fermentan para producir los ácidos grasos de cadena corta, así como gases y agua (Swennen *et al.*, 2006).

Los ácidos grasos de cadena corta brindan protección contra el desarrollo de cáncer, esto lo llevan a cabo por varios mecanismos, los cuales incluyen supresión de tumores, apoptosis, proliferación celular, y por otro lado afectan enzimas proteolíticas y antiproteolíticas (Emenaker *et al.*, 2001). Especialmente el ácido butírico, se ha sugerido que juega un papel central en la reducción del riesgo de cáncer y que actúa como un tipo de agente supresor de cáncer (Kautenburger *et al.*, 2005). El ácido butírico a concentraciones fisiológicas de 1-10 mmol/mL, detiene el crecimiento de los enterocitos neoplásicos en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular en múltiples líneas celulares en cultivo e *in vivo*, donde la experiencia es más limitada (Rouet-Benzineb *et al.*, 2004; Young-Ho *et al.*, 2004; Li y Elsasser, 2005).

Hangen y Bennink (2002) demostraron que el consumo de frijol negro y/o frijol navy reduce significativamente la incidencia de cáncer de colon en ratas inducidas con azoximetano, así como la multiplicidad total del tumor.

### 2.6.3.2 Oligosacáridos

Los oligosacáridos son polímeros formados de 2-10 unidades de monosacáridos. Tienen propiedades prebióticas y son fermentados por *Bifidobacterias* y *Lactobacilos* que se encuentran sobre la superficie de las células epiteliales y en las criptas en el intestino grueso (Niba y Niba, 2003).

La baja digestibilidad de los oligosacáridos resulta de la configuración del enlace glucosídico entre las unidades monoméricas del azúcar o la selectividad del sustrato por las enzimas digestivas gastrointestinales. La mayoría de los oligosacáridos tienen una  $\beta$ -configuración y no pueden ser degradados por las enzimas digestivas gastrointestinales humanas con sus específicos enlaces  $\alpha$ -glucosídicos (Swennen *et al.*, 2006). Ciertos oligosacáridos al no ser digeridos, pueden beneficiar al tracto gastrointestinal por la fermentación y la proliferación de bacterias benéficas. Como resultado de la fermentación de dichos oligosacáridos se producen ácidos grasos de cadena corta como acético, propiónico y butírico, los cuales se ha sugerido que pueden modular funciones entéricas y proporcionar resistencia a cáncer colorectal, y esto a su vez permite disminuir los niveles de pH en colon (Hsu *et al.*, 2004).

Debido a la reducción en el pH del colon, el metabolismo de los oligosacáridos puede modular las actividades de algunas enzimas genotóxicas, en especial la fuerte supresión de  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -glucoronidasa, ésta última indispensable para la desconjugación del ácido glucurónico en el colon (McBain *et al.*, 2001).

A su vez, los oligosacáridos promueven el incremento en la población bacteriana de bifidobacterias y lactobacilos activando vías de señalización asociadas a la respuesta a la infección. Es conocido que los lactobacilos interactúan con las células del intestino delgado y grueso por medio de su internalización, y así hacen contacto con tejidos inmunitarios subyacentes e inducen la producción de citocinas por macrófagos en una manera dependiente de la concentración (Winkler *et al.*, 2007). Asimismo, las bifidobacterias sintetizan sustancias antimicrobianas que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas y

son capaces de modular óxido nítrico y citocinas pro-inflamatorias como las interleucinas (Il-1 $\beta$ , Il-6, Il-12) y el factor de necrosis tumoral (Tnf- $\alpha$ ) en macrófagos murinos (Trebichavsky *et al.*, 2009).

Específicamente los galactooligosacáridos incrementan significativamente la respuesta inmune innata, por medio del incremento en la actividad de células NK y la actividad fagocítica, la cual es la primer línea de defensa para la eliminación de patógenos invasores, células infectadas o (en el caso de la actividad de NK) células tumorales (Vulevic *et al.*, 2008) y además, las sulfomucinas resultan en mayores cantidades en la mucosa colónica y bajas cantidades de sialomucinas en ratas alimentadas con dietas ricas en fructo-oligosacáridos e inulina (Ten Bruggencate *et al.*, 2003; Cherbut, 2002).

Los oligosacáridos actúan como análogos de receptores intestinales debido a que las bacterias enteropatógenas y sus toxinas utilizan la parte oligosacárida de las glicoproteínas como diana para su adhesión (Kunz *et al.*, 2000). Las membranas celulares de mamíferos contienen glicoproteínas y glicolípidos y la estructura de la membrana es tal que las cadenas de oligosacáridos de glicoconjugados de la membrana celular sobresalen en la región extracelular. Las cadenas de carbohidratos complejos participan en las interacciones célula-célula y pueden actuar como receptores para mediadores humorales así como para hormonas. También actúan como receptores de anticuerpos, toxinas y patógenos. Hay sitios comunes donde los virus y bacterias se adhieren a las células huésped blanco para inhibir el proceso patogénico. Los oligosacáridos, que son probablemente similares estructuralmente a los encontrados a las superficies, pueden actuar como homólogos solubles a los receptores de superficie que son blancos de patógenos específicos, inhibiendo su unión a células huésped y pos consiguiente el proceso de colonización (Newburg, 2000; Dai *et al.*, 2000; Zhang y Normark, 1996).

Debido a esta unión específica con receptores de células epiteliales intestinales, se ha demostrado que los oligosacáridos inducen arresto al ciclo celular en la fase G2/M a través de la modulación en los niveles de ARN mensajero de genes clave en la regulación del ciclo celular, como Ciclina-B, Ciclina A, p21, p27, fosforilación de EGFR (por sus

siglas en inglés: Epidermal Growth Factor Receptor) y el desencadenamiento de la cascada de señalización EGFR/Ras/Raf/ERK (Kuntz *et al.*, 2009), como se muestra en la Figura 18.

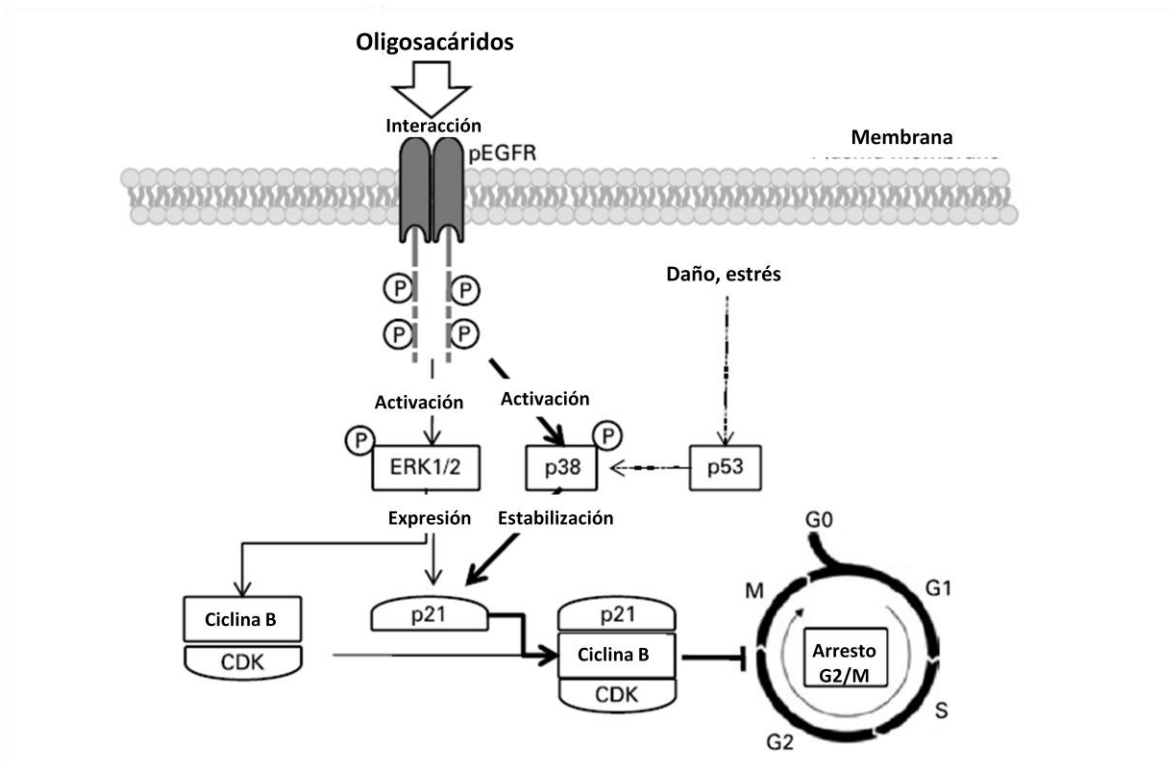


Figura 18. Mecanismo propuesta de arresto al ciclo celular en la fase G2/M por oligosacáridos (Kuntz *et al.*, 2009).

### 2.6.3.3 Almidón resistente

El almidón resistente se define como la suma de almidón y productos de su degradación que no han sido absorbidos en el intestino delgado de individuos sanos. En el colon son fermentados, aunque una pequeña proporción escapa a esa degradación y se elimina por las heces (Valenzuela y Maiz, 2006).

El almidón resistente (AR) fue originalmente clasificado en 3 tipos principales, pero ha sido añadido un cuarto tipo. El AR1 corresponde a los almidones inaccesibles, donde hay barrera física para amilolisis. La molienda y masticación pueden hacer estos almidones más accesibles y menos resistentes. El almidón resistente de las leguminosas entra en esta clasificación. El AR2 comprende los gránulos de ciertas plantas cuya



cristalinidad provocan que sean hidrolizadas lentamente por las  $\alpha$ -amilasas. El AR3 comprende el almidón retrogradado, formadas en alimentos cocinados o almacenados a temperaturas bajas; el frijol también contiene este tipo de almidón. El AR4 comprende almidones químicamente modificados, que son usados para la manufactura de alimentos para mejorar las características funcionales del almidón (Topping y Clifton, 2001).

Le Leu *et al.* (2007) reportaron que el AR incrementa significativamente la concentración total de ácido acético y butírico en el colon distal y en contenido cecal. Por otro lado, el AR también disminuyó la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa significativamente y protegió contra la formación de adenocarcinomas en intestino delgado y colon de ratas inducidas químicamente. Por último, demostraron que el almidón resistente puede modular los efectos de la fermentación de proteínas dietarias.

#### **2.6.3.4 Péptidos bioactivos**

Se han llevado a cabo diversas investigaciones en las que se ha demostrado que los péptidos bioactivos, derivados de las proteínas de la dieta, pueden estar presentes como entidades independientes o codificadas en la proteína original y que durante la digestión gastrointestinal o procesamiento de los alimentos, estos péptidos son liberados de la proteína precursora (Vioque *et al.*, 2006).

Los péptidos bioactivos han sido aislados de fuentes tanto animal como vegetal. Entre las fuentes animales de biopéptidos se pueden mencionar a la caseína, el queso a base de suero de la leche, de leche fermentada, del músculo de pollo y pescado entre otras y de origen vegetal se han aislado del gluten de trigo, soya, girasol, espinaca, frijol mungo, etc., los cuales han presentado diversas actividades biológicas como antihipertensivos, opioides, antioxidantes, anticolesterolémicos, antimicrobianos, anticariogénicos, antitrombóticos, anticancerígenos e inmunomoduladores (Torruco-Uco *et al.*, 2008).

La actividad anticancerígena de algunos péptidos liberados de los alimentos, se ha atribuido a su capacidad de arrestar al ciclo celular e inducir apoptosis. Lunasina, un

péptido encontrado en hidrolizados de soya, inhibe la acetilación de histonas en células cancerosas y se liga competitivamente a la membrana de las integrinas requeridas por las células metastásicas para su conexión a la matriz extracelular y/o la proliferación (Gonzalez de Mejia *et al.*, 2003; Hernández-Ledesma *et al.*, 2009). Por su parte el inhibidor de proteasas Bowman-Birk impide la liberación del radical anión superóxido y peróxido de hidrógeno a partir de células estimuladas con agentes promotores de tumor, por lo que también presenta una potente actividad antiinflamatoria, la cual es cercanamente asociada con la carcinogénesis, y se ha demostrado que este péptido suprime la carcinogénesis de colon en más de una especie (Kennedy, 1998; Kennedy *et al.*, 2002).

A pesar de que los péptidos con actividad biológica han sido mayormente estudiados en alimentos como soya, amaranto y algunos otros cereales, en años recientes ha despertado el interés por identificarlos y caracterizarlos en frijol común. Torruco-Uco *et al.* (2009) hidrolizaron semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) mexicano variedad Jamapa con diferentes enzimas obtuvieron péptidos de bajo peso molecular de entre 13 y 26.5 kDa, observados a través de un patrón electroforético SDS-PAGE, y dichos hidrolizados presentaron actividad antioxidante determinado por el ensayo ABTS. Este y otros estudios recientes, advierten la presencia de péptidos con posible actividad anticarcinogénica en semillas de frijol común aún no descubiertos, que pudieran presentar actividades específicas sobre mecanismos moleculares para inhibir el desarrollo de cáncer en diferentes etapas de su desarrollo.

#### **2.6.4 Fermentación colónica de la fracción no digerible**

La fermentación de la fibra dietaria, almidón resistente, oligosacáridos y algunos compuestos fenólicos por la flora colónica produce ácidos grasos de cadena corta y ácidos grasos de cadena corta hidroxilados respectivamente, los cuales han sido postulados como importantes moléculas efectoras (Sengupta *et al.*, 2006). La fracción no digerible llega al intestino grueso de forma inalterada y aquí las bacterias del colon, con sus numerosas enzimas de gran actividad metabólica, pueden digerirla en mayor o menor medida dependiendo de su estructura; como resultado de esta fermentación bacteriana, se produce

hidrógeno, dióxido de carbono, gas metano, y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como: acético, propiónico y butírico, en una proporción molar casi constante 60:25:15 (Escudero-Álvarez y González-Sánchez, 2006).

Existen dos vías para la metabolización del piruvato (Figura 19). 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 ácido butírico (García-Peris *et al.*, 2002).

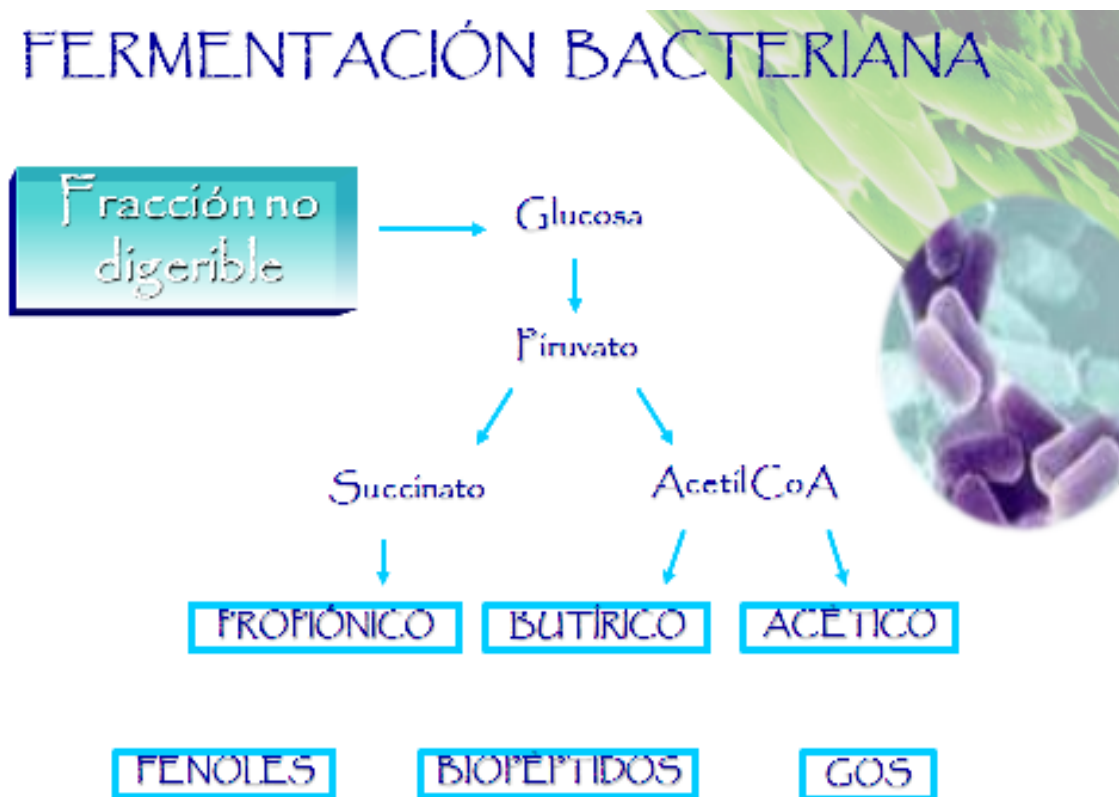


Figura 19. Fermentación bacteriana en el colon (adaptado de García-Peris *et al.*, 2002).

Bednar *et al.* (2001) informaron que por cada gramo de materia orgánica de frijol rojo, negro, del norte y navy, se produjeron 7.28, 7.24, 7.73 y 6.79 mmol de ácidos grasos de cadena corta, respectivamente.

El ácido butírico es metabolizado en los enterocitos, el acético y el propiónico se reabsorben y llegan intactos al hígado a través de la vena porta. La presencia de acetil-CoA sintetasa en el citosol de los adipocitos y glándulas mamarias permite el uso del ácido acético para la lipogénesis una vez que se incorpora a la circulación sistémica. El ácido acético es el primer sustrato para la síntesis de colesterol (Wong *et al.*, 2006). Una vez que el acético entra en el hepatocito se activa la enzima acetil-coenzima A sintetasa 2 citosólica y queda incorporado a los procesos de colesterogénesis y lipogénesis. De forma contraria, el propiónico es un inhibidor competitivo de la proteína que se encarga de la entrada del acético a la célula hepática, un fenómeno que contribuye a la disminución de la lipogénesis y colesterogénesis, lo que explica la disminución de niveles séricos y hepáticos de colesterol en ratas alimentadas con almidones resistentes o fructanos; por lo tanto el cociente acético-propiónico que alcanza al hígado, es un marcador que puede ser usado como predictor de las propiedades hipolipemiantes de los prebióticos y de los hidratos de carbono no digeribles fermentables (del Moral *et al.*, 2003).

Daubioul *et al.* (2002) demostraron que el ácido propiónico producido por la fermentación de un tipo de fibra, fructano, muestra un buen efecto protector contra la acumulación de triacilglicéridos en hígado de rata obesa Zucker, esto debido a la disminución de la incorporación del acético producido igualmente durante la fermentación en los lípidos totales. La absorción de ácido acético y propiónico regula el metabolismo hepático de la glucosa en tanto que reduce la glicemia postprandrial y por tanto la respuesta insulínica. Se ha sugerido que la producción de ácidos grasos de cadena corta favorece la sensibilidad celular a la insulina, y podría prevenir el desarrollo de insulino-resistencia y de diabetes no insulino dependiente (Guarner, 2002).

El ácido butírico, un ácido graso de 4 carbonos, ha recibido mayor atención como un agente potencial quimiopreventivo (Sengupta *et al.*, 2006). El ácido butírico es el sustrato predominante de energía para los colonocitos y se ha demostrado que modula la diferenciación celular, invasión celular, proteólisis, adhesión, proliferación, motilidad y apoptosis celular, así como regulador de genes del ciclo celular (Emenaker *et al.*, 2001). También que el potencial anticancerígeno del ácido butírico se debe a la inducción de la

expresión de mRNA y actividad de glutatión S-transferasa (GST) en células de tumores colónicos humanos, lo cual resulta en una mayor capacidad de destoxificación del intestino (Knoll *et al.*, 2005).

Se ha observado que el efecto del ácido butírico sobre la muerte celular apoptótica inducida se presenta a través de caminos dependientes de caspasas, así como el incremento en la expresión de algunas proteínas pro-apoptóticas como p21 e independiente del gen supresor de tumor *p53* (Hague *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2006). El butírico induce niveles de mRNA y la proteína p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, lo cual puede bloquear el ciclo celular en G1, resultando en la inhibición de la proliferación celular. Este bloqueo del ciclo celular en G1 permite la reparación del ADN de inestabilidad genómica o mutaciones, mediada por un punto de control (Scheppach y Weiler, 2004).

La activación de la caspasa-3 aparentemente es el mejor camino involucrado en la apoptosis inducida por ácido butírico, esto fue demostrado en la línea celular CaCo-2. Otro evento implicado en la apoptosis por medio del ácido butírico, es que éste ácido graso disminuye la expresión de Bcl-2 en algunas líneas celulares y aumenta la expresión de Bax, produciendo una disminución de la relación Bcl-2/Bax (Avivi-Green *et al.*, 2002). El gen Bcl-2 es conocido como gen represor de apoptosis y Bax se conoce como promotor de muerte celular (Chen y Tony-Kong, 2005).

Otros genes en los cuales influye el ácido butírico son los protooncogenes Ras, Src y c-myc disminuyendo su expresión (Rouet-Benzineb *et al.*, 2004). También se ha observado que el ácido butírico está involucrado en la regulación de otros genes, incluyendo la Ciclina D1, que es un regulador clave en la fase G1/S del ciclo celular y la proliferación nuclear celular del antígeno PcnA en células epiteliales colónicas. Así mismo, el ácido butírico interviene en la expresión del gen Apc, gen supresor de tumor, el cual está asociado con  $\beta$ -catenina. Una mutación en este gen incrementa la expresión citoplasmática de  $\beta$ -catenina, el cual ha sido detectado en tumores de colon (Augenlicht *et al.*, 2002).

#### **2.6.4.1 Derivados fenólicos producto de la fermentación bacteriana**

Además del ácido butírico, propiónico y acético producidos por fermentación de fibra por bacterias colónicas, también existen otras fuentes nutricionales productoras de ácidos grasos de cadena corta como los polifenoles. Algunos estudios han reportado que la biodisponibilidad de polifenoles bioaccesibles en intestino delgado es muy baja, del 5 al 10%, por lo que el porcentaje restante transita hacia el colon de manera intacta unidos a la fibra insoluble del alimento por lo que no pueden ser absorbidos ni metabolizados en intestino delgado. Entre ellos, los taninos condensados son los que presentan la más baja bioaccesibilidad en intestino delgado. Entonces llegan al colon, donde pueden ser sustratos de fermentación por las bacterias colónicas junto con la fracción no digerible del alimento. Una parte se absorbe en el epitelio colónico y pasa a la circulación sanguínea, y la otra parte se hidroliza a metabolitos (Clifford, 2004; Saura-Calixto *et al.*, 2007). Estos son transformados durante su tránsito gastrointestinal en derivados aromáticos de AGCC como fenilacetato o fenilbutirato detectables en agua fecal humana. Otros metabolitos intestinales de polifenoles son 3-OH-fenilacetato, 3-fenil-propionato, 3-(4-OH-fenil)-propionato y ácidos aromáticos como ácido trans-cinámico, ácido *p*-cumárico y ácido caféico (Gonthier *et al.*, 2003; Waldecker *et al.*, 2008).

La actividad biológica demostrada para estos compuestos derivados de polifenoles incluyen la supresión del crecimiento en diferentes líneas celulares de cáncer, inhibición de histona deacetilasa (HDAC), alteración en el ciclo celular por la reducción en la expresión de Cdc2 y Ciclina B e inducción de apoptosis a través de la vía de señalización mediada por Fas dependiente de p53 (Gao *et al.*, 2006; Veeriah *et al.*, 2007; Waldecker *et al.*, 2008).

### **2.7 MODELO EXPERIMENTAL DE CÁNCER DE COLON**

Los modelos animales proporcionan una oportunidad única de estudiar la biología del proceso de enfermedad, y de probar las hipótesis ligadas a los factores ambientales en la etiología y la prevención del cáncer de colon (Bird y Good, 2000).

La rata es el animal que se ha usado comúnmente como un modelo experimental para estudiar la etiología del cáncer de colon. Las ratas exhiben semejanzas con los seres humanos en la historia natural de la enfermedad. Los neoplasmas colónicos inducidos en ratas por dimetilhidracina (DMH) o por azoximetano (AOM) parecen ser similares a los neoplasmas colónicos en sus características histológicas y de proliferación. Ambos, humanos y ratas, muestran lesiones precancerosas conocidas como fosas crípticas aberrantes cuando son tratados con carcinógenos específicos para el colon (Alabaster *et al.*, 1996).

### **2.7.1 Azoximetano**

El modelo de azoximetano (AOM) en roedores ha sido utilizado extensamente para investigar aspectos moleculares y genéticos del cáncer colorectal. La respuesta del roedor al cáncer colorectal inducido con AOM refleja la ocurrencia del cáncer colorectal no familiar en seres humanos, incluyendo una prevalencia de tumores en colon distal, que son patológicamente similares al cáncer colorectal esporádico en esa zona del colon en humanos (Sohn *et al.*, 1987; Bissahoyo *et al.*, 2005). Los tumores inducidos con AOM en roedores comparten muchas características histopatológicas con tumores humanos (Corpet y Pierre, 2003).

El azoximetano a dosis de 10-20 mg/kg peso produce carcinoma intestinal en el 100% de las ratas, tanto con administración subcutánea como intramuscular (Williamson *et al.*, 1980). En la parte distal del colon, la mayoría de los carcinomas inducidos con AOM son adenocarcinomas bien diferenciados, mientras que en el colon proximal predominan los adenocarcinomas mucinosos (Reddy *et al.*, 1976). El tratamiento con AOM induce fosas crípticas aberrantes en roedores. Las FCA se localizan principalmente en colon distal y pocos en colon proximal (Davies *et al.*, 1999).

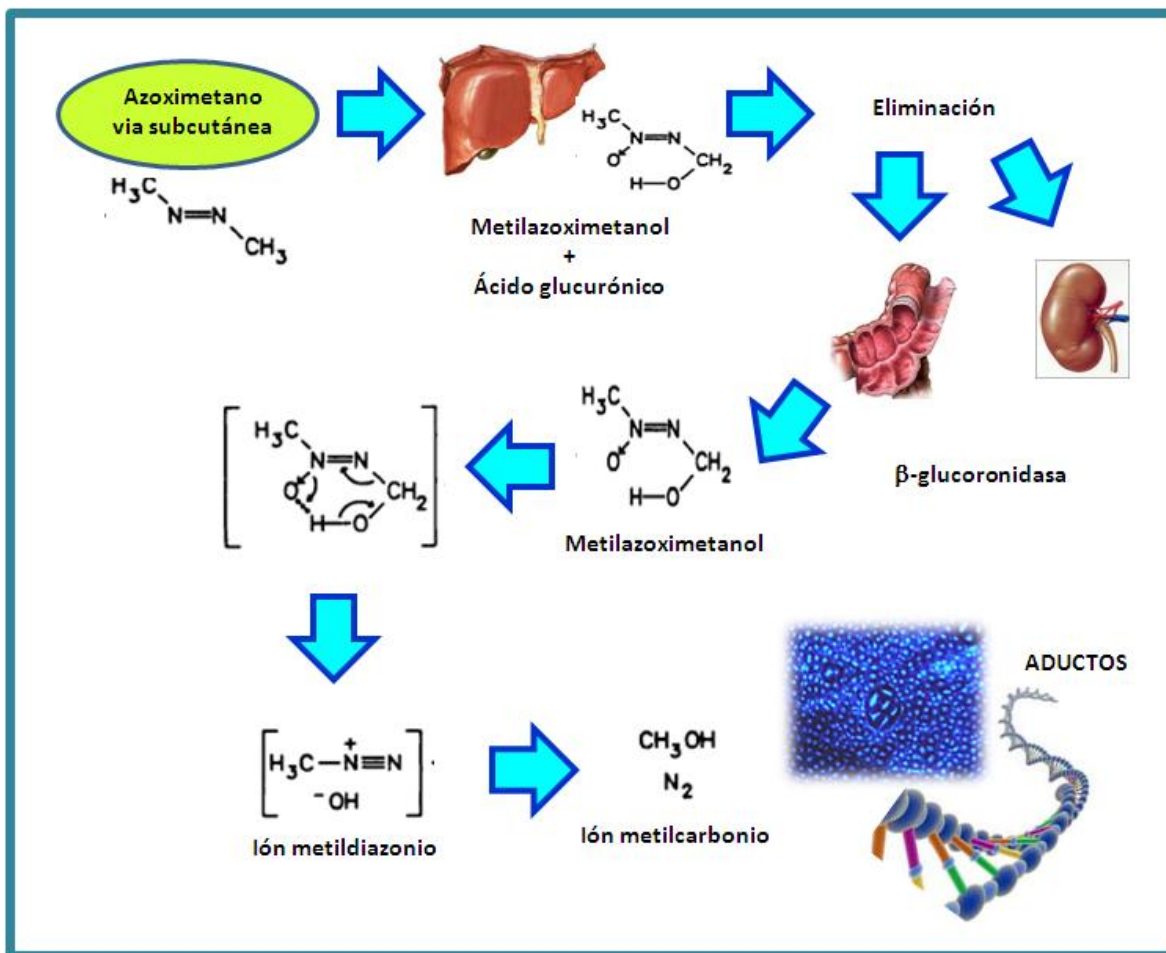


Figura 20. Representación esquemática de la relación entre la activación de AOM en el hígado y colon de rata (Adaptado de Mohammad y Hopfinger 1980; Fiala *et al.*, 1987; Sohn *et al.*, 1987; González, 2007).

Una vez que el AOM es inyectado subcutánea o intramuscularmente, viaja vía vena porta al hígado, en donde es metabólicamente activado por enzimas de fase I (CYP2E1) a metilazoximetanol (MAM) y  $\text{CO}_2$ , aunque también puede ser metabolizado por enzimas como la alcohol deshidrogenasa (Gonzalez, 2007). El MAM es conjugado con ácido glucurónico enzimas de fase II (UDP-glucuronosil transferasa – UGT) para ser eliminado por orina o por heces. Al ser eliminado por vía intestinal, el conjugado llega al intestino donde puede ser biotransformado por la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (Klurfeld, 1995) y debido a que MAM no conjugado es inestable, con un tiempo de vida media de 12 horas bajo condiciones fisiológicas, se descompone liberando formaldehído, agua y nitrógeno y produce especies reactivas como el ion metildiazonio, el cual se forma por una ruptura espontánea de MAM o por oxidación enzimáticamente catalizada. Luego el metildiazonio



es escindido en nitrógeno molecular ( $N_2$ ) y un ion carbonio  $CH_3^+$ . Pierde el  $N_2$  con facilidad, y da lugar al carbocatión ( $CH_3$ ) que reaccionará con cualquier nucleófilo que exista en el medio (Sohn *et al.*, 1987; Fiala, *et al.*, 1987). Tanto el metildiazonio como el carbocatión pueden alquilar fácilmente el  $O_6$  de la guanina como primer sitio y  $N_7$  tanto en adenina como guanina como el segundo sitio más favorable (Mohammad y Hopfinger 1980). El mecanismo completo del AOM en un organismo se sintetiza en la Figura 20.

El AOM induce transiciones de guanina a adenina en el gen K-ras y/o en el gen  $\beta$ -catenina. Las mutaciones en el codón 12 en K-ras pueden contribuir a la inducción de cambios hiperplásicos, mientras que las mutaciones en  $\beta$ -catenina parecen estar implicadas en la generación de lesiones displásicas. Las mutaciones en K-ras activa las vías de señalización de Mapk y P13k, y regula a ciclina D1 y Cox-2, también aumenta la expresión de iNOS en presencia de estímulos inflamatorios. Las mutaciones en  $\beta$ -catenina estabilizan la proteína  $\beta$ -catenina en el citoplasma y activan la transcripción de los blancos de señalización de  $\beta$ -catenina/Tcf, como ciclina D1 y c-myc (Takahashi y Wakabayashi, 2004).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer colorrectal es una de las neoplasias con mayor prevalencia a nivel mundial. México no es la excepción y la tasa de mortalidad por este tipo de cáncer ha mostrado una creciente tendencia en las últimas décadas.

La dieta en México a lo largo de su historia se ha basado en maíz y frijol, siendo el principal aporte de proteínas y carbohidratos en la población de bajos recursos; no obstante, su consumo ha disminuido en los últimos años debido a los cambios en el estilo de vida de la población que ha resultado en un cambio en la alimentación.

Por otro lado, diversos estudios epidemiológicos han demostrado un efecto protector de la dieta sobre enfermedades crónico degenerativas. Recientemente, el consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) ha sido un punto de atención hacia dicho beneficio y el efecto benéfico de esta leguminosa se ha atribuido a su composición, entre los que destacan los compuestos fenólicos, la fibra, el almidón resistente y los oligosacáridos.

La fibra del frijol ocupa un lugar muy importante en cuanto a su relación con la reducción del cáncer de colon, entre otras enfermedades. Esto se debe a que la fracción indigerible de la fibra no es metabolizada por las enzimas del humano en el intestino delgado y llega al colon en donde es fermentada por bacterias colónicas. La fermentación de esta fracción puede generar AGCC (acético, propiónico y butírico, entre otros compuestos) con efectos fisiológicos importantes. El ácido butírico es el más estudiado y se ha demostrado en estudios *in vitro* que inhibe la proliferación celular por medio de arresto en la fase G1 del ciclo celular e induce apoptosis, así como también se ha observado que modula la expresión de genes implicados en la carcinogénesis colorrectal e induce enzimas que detoxifican al colon de carcinógenos de la dieta. Además, se ha informado que algunos compuestos fenólicos (principalmente taninos condensados) llegan intactos al colon y pueden ser fermentados por la flora colónica, ejerciendo también efectos fisiológicos importantes contra el desarrollo el cáncer de colon. De manera similar, los

oligosacáridos y péptidos con actividad biológica alcanzan el colon donde ejercen su función fisiológica.

Estudios previos en el laboratorio demostraron que la fracción no digerible (FND) de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Bayo Madero modula la expresión de genes en células de adenocarcinoma de colon humano HT-29, sugiriendo de esta manera una protección por parte de esta FND contra el desarrollo de cáncer de colon. Sin embargo, este estudio hace referencia a un estadio tardío de cáncer, por lo que en el presente trabajo el objetivo fue completar el análisis de los efectos de la FND del frijol común Bayo Madero sobre la modulación génica y proteica en un estadio temprano de cáncer como una estrategia de prevención y utilizando ratas como contraparte de modelo biológico.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la fracción no digerible (FND) del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido de la variedad Bayo Madero sobre el estadio temprano de cáncer de colon inducido químicamente en ratas Sprague-dawley.

#### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la composición proximal del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) crudo, cocido y de la FND de frijol cocido de la variedad Bayo Madero.
2. Evaluar *in vivo* el efecto del frijol cocido y de la FND, variedad Bayo Madero, sobre el desarrollo de fosas crípticas aberrantes (FCA) inducidas con azoximetano en ratas Sprague-dawley.
3. Determinar el nivel de pH, producción de ácidos grasos de cadena corta y la actividad enzimática de  $\beta$ -glucuronidasa en contenido cecal, colónico y fecal.
4. Estudiar el mecanismo de acción molecular involucrado en el efecto quimioprotector del FND sobre el desarrollo de FCA.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 MATERIAL

#### 6.1.1 Compuestos químicos

El carcinógeno azoximetano (AOM) se obtuvo de la marca Sigma Chemical Col, (USA), así como  $\alpha$ -amilasa, proteasa, amiloglucosidasa, dimetil sulfóxido, ácido tánico, estándares de rafinosa y estaquiosa, Hepes.

Los reactivos para electroforesis: acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, persulfato de amonio, Tris, azul de Coomassie, mercaptoetanol, etc, se obtuvieron de BioRad (Hercules, CA, USA). Kit de quimioluminiscencia y solución bloqueadora marca Roche.

Acetona, etanol, ácido clorhídrico, acetronilo grado HPLC, cloroformo, metanol y demás reactivos fueron de la marca J.T. Baker.

El kit utilizado para la extracción de RNA Rneasy Mini Kit se obtuvo de la marca Qiagen. El kit para la síntesis de ADN complementario SMART-PCR se adquirió de Clontech Laboratories. El arreglo de PCR y el SYBR Green/Rox PCR Master Mix se obtuvieron del proveedor SABiosciences. Los anticuerpos para actina y las proteínas que fueron evaluadas, se obtuvieron de la marca Santa Cruz. Las películas y soluciones de revelado son marca Kodak.

#### 6.1.2 Material biológico

Se usaron 73 ratas macho Sprague-dawley recién destetadas, de 4 semanas de edad que fueron adquiridas de Harlan, Inc. Los animales se mantuvieron en jaulas metálicas con ciclos de luz-oscuridad 12/12, agua y alimento *ad libitum*.

Se utilizó frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad Bayo Madero, proporcionado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Centro Experimental Bajío (INIFAP, México), cosecha 2007.

## **6.2 MÉTODOS**

### **6.2.1 Cocción del frijol**

El frijol se sometió a tratamiento térmico de acuerdo con el protocolo de Aparicio-Fernández *et al.* (2005). Brevemente, se colocaron 50 g 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 (que incluyó semilla más el caldo de cocción) se formó un homogenizado el cual se liofilizó y almacenó a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### **6.2.2 Extracción de la fracción no digerible**

Para la extracción de la fracción no digerible se utilizó la técnica descrita por Kurtzman y Halbrook (1970). Brevemente, a 300 g de frijol cocido molido se le adicionó 1500 ml de agua y se agitó por 1 min. Se centrifugó y al precipitado se le adicionó 100 ml de ácido tánico al 10% y se ajustó el pH a 4. Se sometió a agitación durante 5 min y se centrifugó a 9,000 g por 10 min. 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 min. El precipitado que se obtuvo es la fracción no digerible.

### **6.2.3 Análisis proximal**

Se determinó el contenido de cenizas, humedad, grasa, proteína y fibra total, soluble e insoluble tanto al frijol crudo, cocido y la fracción no digerible de la variedad Bayo Madero, empleando las metodologías descritas por la Asociación Americana de Químicos Analistas (AOAC, 2002).

### **6.2.3.1 Determinación de cenizas (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 550-600°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 del frijol

M2 = Peso del frijol calcinado

### **6.2.3.2 Determinación de humedad (Técnica No. 925.23)**

Brevemente, se pesaron 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. Finalmente se pesó.

Cálculos:

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

Donde:

W2 = Peso de la cápsula + peso muestra de frijol

W1 = Peso de la cápsula + peso muestra de frijol (después de secado)

### **6.2.3.3 Determinación de proteína total (Técnica No. 920.15)**

Se colocó de 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, hasta que el contenido tomó un color verde claro, se dejó enfriar un poco y se colocó el tubo en el destilador, donde se

adicionó agua destilada e hidróxido de sodio al 40%. El producto destilado se recibió en un matraz conteniendo 25 ml de ácido bórico, rojo de metilo y verde de bromocresol como indicador. 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:

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

Donde:

A = ml solución gastados del frijol

B = ml solución gastados del blanco

C = meq N<sub>2</sub> 0.014

D = Normalidad del ácido

M = Peso del frijol

#### **6.2.3.4 Determinación de grasa (Técnica No. 920.39)**

La determinación de grasa se realizó por medio de extracto etéreo. Dentro de un cartucho de celulosa se colocó de 2 a 5 g de muestra, se tapó con un pedazo de algodón y se colocó en el compartimento de extracción Soxhlet. Éste a su vez se ensambló a un matraz receptor, el cual contenía el solvente y a un refrigerante. A continuación se calentó moderadamente por aproximadamente 5 a 6 horas. Al final, se quitó el matraz colector y se recuperó el disolvente por simple destilación. El matraz se colocó en la estufa para la completa eliminación de solvente y humedad, con el fin de obtener únicamente el peso de la fracción lipídica.

Cálculos:

$$\% \text{ de grasa} = \frac{\text{Pf} - \text{Po}}{M} \times 100$$

Donde:

Pf = Peso del recipiente después de la extracción (en gramos)



Po = Peso del recipiente antes de la extracción (en gramos)

m = Peso del frijol (en gramos)

#### **6.2.4 Determinación de fibra insoluble y soluble (Técnica No. 991.43)**

Brevemente, un gramo de muestra previamente cocida, liofilizada y pulverizada, se incubó en baño María con 100  $\mu$ l  $\alpha$ -amilasa (0.1 ml) en 50 ml de solución amortiguadora de fosfato 0.08 mM a pH 6 y a 95°C, agitando cada 5 minutos, con el frasco tapado y protegido de la luz. Luego se atemperó y se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 0.275 N. Posteriormente, se adicionó 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 adicionó 0.3 ml de amiloglucosidasa y se incubó nuevamente en baño María por 30 minutos a 60°C con agitación continua. Para determinar fibra insoluble, la muestra se filtró y se realizaron 2 lavados con agua caliente, se secó y pesó el filtro. Para determinar fibra soluble, al residuo de la filtración anterior se le adicionó etanol al 80%, mismo volumen que el residuo y se dejó 24 horas. Después de filtrarse, se realizaron 2 lavados con acetona de 15 ml cada uno, se secó y pesó el filtro.

#### **6.2.5 Cuantificación de oligosacáridos**

##### **6.2.5.1 Extracción de oligosacáridos**

Para la extracción de oligosacáridos se siguió la metodología descrita por Díaz-Batalla *et al.* (2006) con algunas modificaciones, en la cual se pesaron 500 mg de muestra (FND o harina de frijol cocido), se adicionaron 10 ml de agua y la muestra se colocó en baño maría a 80°C durante una hora con agitación cada 5 minutos. Posteriormente, la muestra se atemperó y el sobrenadante se inyectó en HPLC para su identificación y cuantificación.

### **6.2.5.2 Identificación y cuantificación de oligosacáridos por HPLC**

Se realizó siguiendo la metodología de Muzquiz *et al.* (1999). El extracto de oligosacáridos obtenido a partir de la FND y harina de frijol cocido, se resuspendió en 2 ml de agua destilada y 8 ml de acetonitrilo (volumen total 10 ml), se filtró a través de una unidad Millipore (0.45  $\mu\text{m}$ ) y se inyectó volúmenes de 25  $\mu\text{l}$  en un equipo de HPLC marca Waters con 6000 A U6K, a través de una columna  $\mu\text{Bondapack}/\text{carbohydrate}$  (3.9 mm X 30 cm), empleando una fase móvil de acetonitrilo-agua grado HPLC (80:20 v/v) y un flujo de 1 ml por min. Para su identificación se utilizaron los estándares externos: rafinosa, estaquiosa y verbascosa, y para la cuantificación el valor del área bajo la curva fue interpolado a una curva de calibración realizada con los estándares externos (Anexo 1).

### **6.2.6 Cuantificación de compuestos fenólicos**

#### **6.2.6.1 Extracción de compuestos fenólicos**

La extracción se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Cardador-Martínez *et al.* (2002). Se pesaron 200 g de muestra previamente liofilizada, se colocó en un matraz y se mezcló con 50 ml de metanol. El matraz fue protegido 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). Se tomó el sobrenadante para realizar los análisis de fenoles totales y taninos condensados.

#### **6.2.6.2 Cuantificación de fenoles totales**

La cuantificación de fenoles totales se determinó siguiendo la metodología de Nurmi *et al.* (1999). Brevemente, se tomaron 10  $\mu\text{l}$  del extracto metanólico y se adicionaron 490  $\mu\text{l}$  de agua destilada y 250  $\mu\text{l}$  del reactivo de Folin 1 N. Se mezclaron los reactivos durante 5 min en un sonicador. Posteriormente se añadieron 1,250  $\mu\text{l}$  de carbonato de sodio al 20% y se dejó reposar durante 2 horas en oscuridad. Se cuantificó en

un espectrofotómetro Multiskan (Thermo Electron Corporation, Multiskan Ascent, Model 51118307, Lab. Tech, USA) a una longitud de onda de 760 nm. Los resultados se compararon con una curva de calibración (Anexo 2) y los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra.

### **6.2.6.3 Cuantificación de taninos condensados**

La cuantificación de taninos condensados se realizó por medio de la técnica propuesta por Deshpande y Cheryan (1985) con algunas modificaciones. Brevemente, se tomaron 50 µl del extracto metanólico y se colocaron en una microplaca. Se adicionaron 200 µl de la solución 1:1 de vainillina 1% - ácido clorhídrico 8%. La cuantificación se realizó en un Multiskan (Thermo Electron Corporation, Multiskan Ascent, Model 51118307, Lab. Tech, USA), con filtros de 492 y 540 nm; se comparó con una curva de calibración (Anexo 3) y los resultados se expresaron como mg equivalentes de (+)-catequina/g de muestra.

### **6.2.7 Cuantificación de almidón resistente**

El almidón resistente se cuantificó a partir de la fracción no digerible del frijol cocido de acuerdo al método descrito por Saura-Calixto *et al.* (1993). Brevemente, a 100 mg de la fracción no digerible se adicionaron 6 ml de hidróxido de potasio (KOH) 2 M, se agitó continuamente por 30 min a temperatura ambiente; se adicionaron 3 ml de solución amortiguadora de acetato; se ajustó el pH a 4.75; se mezcló con 60 ml de amiloglucosidasa e incubó por 30 min a 60°C con agitación continua. Posteriormente, se centrifugó durante 15 min a 3000 g. La pastilla se resuspendió en 10 ml de agua destilada, se centrifugó durante 15 min a 3000 g y se filtró. La pastilla resultante se definió como almidón resistente.

### 6.2.8 Digestibilidad *in vitro* de proteínas

Para la determinación de la digestibilidad *in vitro* de proteínas en la muestra de FND de frijol cocido Bayo madero, se utilizó la técnica propuesta por Hsu *et al.* (1977). Se preparó una mezcla enzimática que contenía 1.58 mg de tripsina, 3.65 mg de quimiotripsina y 0.45 mg de peptidasa en 1 ml de agua destilada; y una mezcla de proteasa que contenía 1.48 mg de proteasa bacteriana en 1 ml de agua destilada. Se disolvió una cantidad de muestra que contenía exactamente 63.8 mg de proteína en 10 ml de agua destilada. Se ajustó pH a 8 y se incubaron las muestras hasta que alcanzaron una temperatura de 37°C. A continuación se añadió 1 ml de mezcla enzimática, se incubaron las muestras durante 10 minutos a una temperatura de 37°C, después se agregó 1 ml de proteasa y se agitaron durante 10 minutos a 55°C. Cuando las muestras alcanzaron la temperatura ambiente se determinó el pH.

Cálculo:

$$y = 234.84 - 22.5x$$

Donde

y = valor de la digestibilidad de proteína *in vitro* expresada en porcentaje

x = la lectura del pH final

### 6.2.9 Fase experimental *in vivo*

Una vez obtenida y caracterizada parcialmente la fracción no digerible (FND) presente en el frijol cocido, se realizó el ensayo biológico, el cual se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se utilizaron ratas macho Sprague-dawley con un peso inicial de  $69.6 \pm 5$  g de 4 semanas de edad. Las ratas se mantuvieron en un cuarto con una temperatura ambiente de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , ciclos de luz-oscuridad 12/12 horas, con agua y alimento *ad libitum*. Una semana después de la aclimatación, las ratas se asignaron al azar a 6 grupos de tratamiento (n=12) (Cuadro 3): (1) Control negativo, dieta basal, inyección subcutánea e intubación intragástrica de solución salina; (2) Azoximetano (AOM), dieta basal más una inyección

subcutánea de AOM (15 mg/kg de peso corporal, disuelto en 1 ml de solución fisiológica) una vez a la semana por 2 semanas empezando en la tercera semana de suplementación; (3) Frijol cocido (FC), FC cultivar Bayo Madero (5.7 g por kg de peso corporal) diariamente y dieta basal; (4) Fracción no digerible (FND) de frijol común cocido cultivar Bayo Madero (2.5 g por kg de peso corporal) diariamente y dieta basal, (5) FC+AOM, FC más AOM y dieta basal; (6) FND+AOM, FND más AOM y dieta basal. El FC y la FND, disueltos en agua, se administraron intragástricamente (Figura 21) una vez por día durante el periodo experimental (9 semanas) y las dosis se seleccionaron de acuerdo al consumo *per cápita* rural de frijol en la Región Lagunera de México, el cual es de 146 kg de frijol al año consumidos por una persona de 70 kg (Del Razo *et al.*, 2002) (Figura 22).

Cuadro 3. Grupos de tratamiento.

Grupo	Tratamiento
1	Vehículo del carcinógeno vía subcutánea
2	Carcinógeno vía subcutánea (AOM), 1 vez por semana (dosis 15 mg/kg peso), 2 dosis en total.
3	Frijol cocido Bayo Madero (FC) vía sonda esofágica diariamente durante el período experimental (9 semanas) (dosis 5.7 g/kg de peso).
4	Fracción no digerible (FND) de frijol cocido Bayo Madero vía sonda esofágica diariamente durante el período experimental (9 semanas) (dosis 2.5 g/kg de peso).
5	FC + AOM
6	FND + AOM



Figura 21. Administración intragástrica de los diferentes tratamientos de FC y la FND.

Diariamente, a partir de la primera semana de tratamiento se registró el consumo de agua y alimento, y semanalmente la ganancia de peso de las ratas. Al final del periodo experimental se sacrificaron a los animales, se recolectaron las heces de cada uno de los grupos, se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para determinar la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) así como la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. También se realizaron análisis histológicos y la determinación del desarrollo de fosas crípticas aberrantes (FCA).

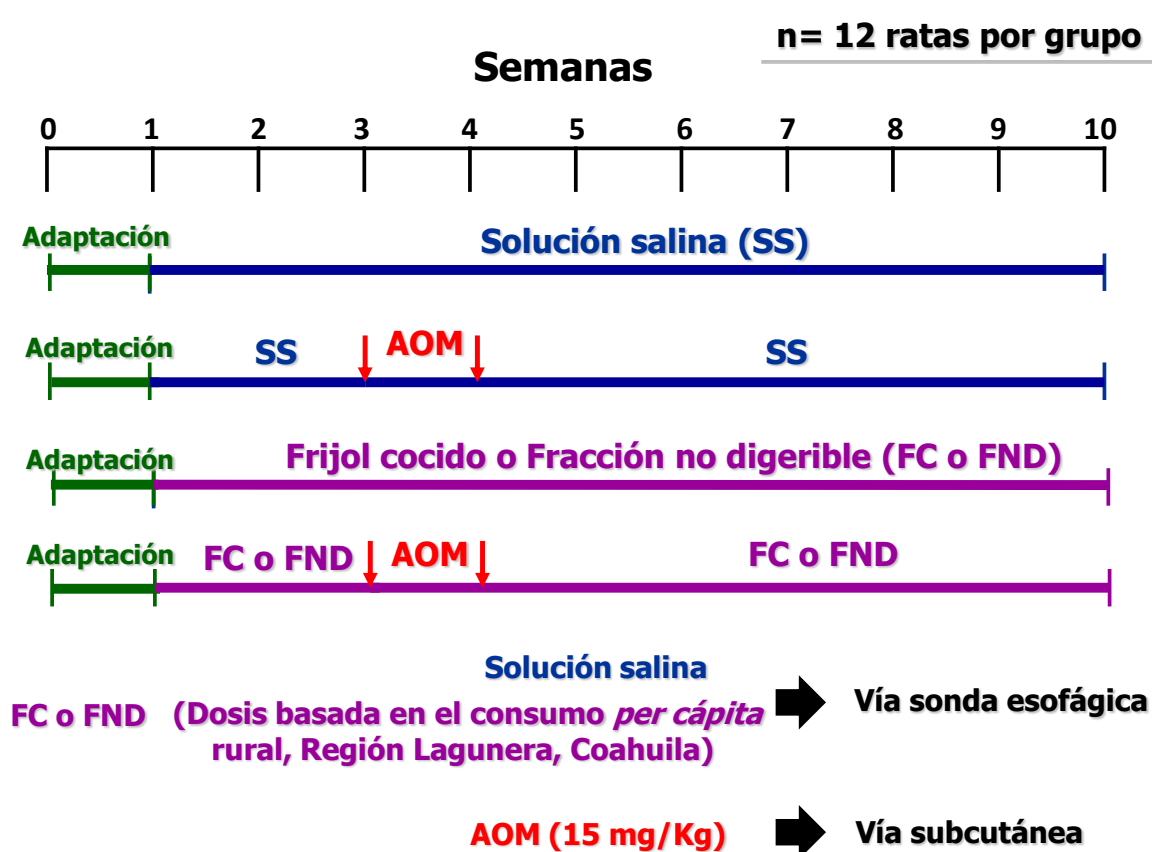


Figura 22. Diseño experimental.

### 6.2.9.1 Medición del pH cecal, colónico y fecal

El contenido cecal, colónico y fecal se suspendió en agua (5 veces su volumen), se homogenizó y midió el pH (Nakanishi *et al.*, 2003).

### 6.2.9.2 Concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Los AGCC se determinaron siguiendo la metodología de Campos-Vega *et al.* (2009). 1 g de contenido cecal, colónico y fecal se suspendió en agua (5 veces su volumen) y se homogenizó. La suspensión se centrifugó a 8,000 g por 10 min a 4°C y se ajustó el pH (2-3) con HCl 0.1 M. El sobrenadante se filtró con una membrana (0.45 µm) y se llevó a cabo la determinación en cromatografía de gases (CG). Se inyectó 1.5 µl de la muestra en un equipo Hp 6890 Plus acoplado a un detector de flama (Hp 30M, CARBOWAX 30M, capillary 25.0m x 320µm x 0.30µm nominal). Se empleó como gas carreador helio a un flujo de 0.5 ml/min. La temperatura inicial del horno fue de 95°C, mantenida por 2 min y elevada a 140°C a 20°C/min. Ácidos acético, propiónico y butírico puros se emplearon como estándares externos (0-100 mM/ml) para cuantificar los AGCC en heces y los datos se interpolaron a una curva de calibración con dichos estándares (Anexo 4).

### 6.2.9.3 Actividad de β-glucoronidasa

Se determinó la actividad de la enzima β-glucoronidasa de acuerdo al método descrito por Fishman *et al.* (1948). Brevemente, 0.50 g de contenido cecal, colónico y fecal se homogenizaron con un politrón en 10 ml de solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) 0.2 M pH 7.0. Posteriormente, las muestras se sonicaron por 3 min a 4°C y se centrifugaron a 500 g por 15 min. El sobrenadante se colectó y se usó inmediatamente para el ensayo enzimático. Para la mezcla de reacción se tomaron 0.8 ml de PBS 0.02 M, 0.1 ml de β-D-glucurónido-fenolftaleína 1 mM y 0.1 ml del extracto cecal, colónico y fecal. Se incubó por 1 h a 37°C y la reacción se detuvo con la adición de 2.5 ml de glicina alcalina, 1 ml de ácido tricloroacético al 5% y 1.5 ml de agua HPLC. La mezcla anterior produjo el color que se leyó a los 10 min y a 540 nm. La cantidad de fenolftaleína liberada se cuantificó mediante una curva estándar de fenolftaleína (Anexo 5).

#### **6.2.9.4 Determinación de fosas crípticas aberrantes (FCA) en la zona distal del colon**

El 50% de los animales se sacrificaron al finalizar el tratamiento y el colon se removió seccionado en la zona distal para realizar las siguientes tinciones:

Hematoxilina y eosina: El colon del 25% de los animales se extirpó cortando longitudinalmente desde el ciego hasta el ano, lavando con agua salina. Los tejidos recolectados se conservaron en solución amortiguadora de fosfatos, se fijaron con formaldehído al 4%, y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los tejidos se analizaron microscópicamente y la incidencia de FCA se reportó por segmento distal del colon (Wijnands *et al.*, 2001).

Tinción con azul de metileno: El 25% de los animales sometidos a tratamiento (9 semanas) se sacrificaron y el colon fue removido y cortado longitudinalmente desde el ciego hasta el ano, se colocó entre dos piezas de papel filtro y se fijó en solución amortiguadora de formalina al 10% por 24 h. Luego las muestras se tiñeron con azul de metileno al 0.5% en solución salina de 1-3 min, el exceso de colorante se lavó. Se observaron las FCA con un microscopio de luz invertida, y la incidencia de FCA se reportó por segmento distal del colon (Bird, 1987).

#### **6.2.10 Análisis de la expresión de genes relacionados con la cascada de señalización de p53 mediante arreglos de PCR cuantitativo**

El método RT-PCR (llamado así por el paso de transcripción inversa previo a la PCR), o ARN-PCR, consiste primero en una extracción de ARNm a partir del tejido en el que se quiere estudiar la expresión de un mensajero. El siguiente paso es la síntesis de una cadena de ADNc a partir del ARNm mediante una transcriptasa reversa (RT). Para ello se aprovecha la presencia de la cola poli(A) de los mensajeros y se utiliza como cebador un oligonucleótido sintético de polideoxitimidina (oligo[dT]) que se une a las colas de poli(A). Luego se toma de esa solución una alícuota y se somete a una reacción de PCR utilizando una pareja de cebadores o «primers» específica del ARNm de interés a una temperatura



adecuada, para obtener una cantidad de moléculas de ADN idénticas correspondientes a un fragmento del ARNm específico que queremos detectar. La detección de este producto amplificado se realiza mediante electroforesis en gel (Hernández *et al.*, 1994). Los pasos que se llevaron a cabo para determinar la expresión de genes son los siguientes:

#### **6.2.10.1 Extracción de ARN**

El protocolo que se utilizó para la extracción de ARN es el propuesto en el manual RNeasy Qiagen, 2001. Esta técnica combina la tecnología micro-spin, que permite la unión selectiva de la membrana de sílica gel de la columna provista en el protocolo y la velocidad de centrifugación. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se pesaron 100 mg de tejido congelado de la zona distal del colon.
2. Se colocó la muestra en un mortero estéril previamente congelado y se adicionó nitrógeno líquido para pulverizar completamente el tejido evitando que éste se descongele.
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 µl de regulador RLT (solución amortiguadora de lisis) (por cada ml se adicionaron 10 µl de mercaptoetanol), se agitó en aparato vortex vigorosamente durante 1 min.
5. 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 14,000 rpm por 3 min. Cuidadosamente se transfirió el filtrado a un nuevo tubo de 1.5 ml sin tocar la pastilla formada en el fondo del tubo colector.
6. Se adicionó 1 volumen (correspondiente al sobrenadante) de etanol frío al 70% al lisado (sobrenadante) para limpiarlo y se mezcló lentamente por pipeteo.
7. La muestra, incluyendo el precipitado que se formó, se pasó a una columna rosa (RNeasy Mini Column) la cual se encontraba sobre un tubo colector de 2 ml. La

columna se cerró suavemente para centrifugar a 8,000 rpm por 15 s y posteriormente se descartó el filtrado.

8. Se adicionaron 700  $\mu$ l del regulador RW1 (solución amortiguadora de lavado 1) a la columna rosa (Rneasy Mini Column), se centrifugó a 8,000 rpm por 15 s y descartó el filtrado.
9. Se preparó en un tubo por separado la siguiente mezcla de: 4  $\mu$ l de ADNasa I solución stock y 70  $\mu$ l de regulador RDD (solución amortiguadora de resuspensión), teniendo precaución al mezclar porque la ADNasa I es sensible a desnaturalización, por lo que el mezclado se realizó por inversión del tubo únicamente.
10. Se agregó la mezcla de ADNasa I (74  $\mu$ l) directamente sobre la membrana de sílica-gel de la columna rosa y se incubó de 20-30 °C por 30 min, teniendo especial cuidado en que la mezcla cayera sobre la membrana y no en las paredes.
11. Se adicionaron 350  $\mu$ l de regulador RW1 (solución amortiguadora de lavado 1) en la columna rosa, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 s y se descartó el filtrado.
12. La columna rosa se transfirió a un nuevo tubo colector limpio de 2 ml y se adicionaron 500  $\mu$ l de regulador RPE (solución amortiguadora de lavado PE) directamente a la columna; se cerró suavemente y se centrifugó a 10,000 rpm 15 s para lavar la columna. Se descartó el fluido.
13. Se adicionaron otros 500  $\mu$ l de regulador RPE a la columna, para un segundo lavado, y se centrifugó a 10,000 rpm 2 min para secar la membrana de sílica gel.
14. Se transfirió la columna rosa a un tubo nuevo colector de 2 ml y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min para eliminar posibles trazas de regulador RPE.
15. Para la elución de ARN, se transfirió la columna a un nuevo tubo colector de 1.5 ml y se adicionaron 50  $\mu$ l de agua libre de ARNasas directamente a la membrana de sílica gel, se cerró el tubo y se centrifugó a 10,000 rpm 1 min para fluir.
16. Como el rendimiento esperado de ARN era de >20  $\mu$ g, se repitió el paso de elución (paso 15); adicionando un segundo volumen de agua libre de ARNasa. Se eluyó en el mismo tubo colector.

### **6.2.10.1.1 Detección y evaluación de la calidad del ARN**

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:

Para 30 ml se emplean los siguientes reactivos:

- 0.36 g agarosa
- 3.5 ml de MOPS 10X
- 21.2 ml formaldehído 37 %
- 25.3 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 0.5 µl de bromuro de etidio.

Se corrió con MOPS 1X a 80 volts.

En el Anexo 6 se muestra el corrimiento de los ARN extraídos de las muestras de los 6 grupos de tratamiento.

### **6.2.10.2 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. La enzima SUPER SCRIPT II (Life Technologies) tiene la capacidad de aumentar la probabilidad de que los mensajes sean transcritos completamente. Esto es debido a que posee actividad de transferasa terminal, la cual añade algunos nucleótidos de deoxicidina al extremo 3' del ADNc, lo que permite que el oligonucléotido SMART II A se acople creando un templado extendido

asegurando la transcripción del mensaje completo. 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, lo que permitió mejorar la calidad y rendimiento de la síntesis de ADNc de cadena sencilla.

El ARN total (1µg), se utilizó como templado para sintetizar 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 µl de ARN total
- + 1 µl 3' oligonucleótido II A SMART CDS (10 µM)
- 1 µl oligonucleótido SMART II A (10 µM)
- 5 µl 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 65°C en un termociclador por 2 minutos.

4. Se centrifugó brevemente para coleccionar el contenido.

5. Se añadieron los siguientes reactivos a cada tubo de reacción:

- 7 µl agua estéril desionizada
- 20 µl 5X first-strand buffer
- 2 µl DTT (100 mM)
- 10 µl 50X dNTP's (10 mM)
- 5 µl transcriptasa reversa SuperScript II
- 42 µl volumen total

6. Se mezcló en vortex y se centrifugaron los tubos brevemente.

7. Se incubaron los tubos a 42°C por 1.5 horas 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 se almacenaron a -20°C.

En el Anexo 7 se muestra el corrimiento del ADNc de los grupos experimentales durante la optimización del ciclo óptimo.

### **6.2.10.3 Arreglos de PCR cuantitativo**

La determinación cuantitativa de los transcritos de la cascada de señalización de p53 se llevó a cabo según lo reportado por Campos-Vega *et al.* (2010) con algunas modificaciones. Cuarenta y seis µl de primer cadena de ADNc (100 ng/µl) fueron mezclados con RT2 Real-Time™ SYBR Green/Rox PCR Master Mix (PA-021, SABiosciences). Previamente, se confirmó que 0.5 µl de la primer cadena de cADN (dilución 1:1 con agua libre de nucleasas), con la concentración anteriormente mencionada, produjo la misma amplificación ( $C_t$ ) de los genes utilizados como controles incluidos en el arreglo de PCR que cuando fue usada una cantidad de 1 µl. La expresión de 77 genes se analizó usando el arreglo de PCR diseñado para rata PARN-027A (SABiosciences, Canada) como especifica el manual del proveedor, bajo las siguientes condiciones: 95°C, 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C-15 segundos/60°C-1 minutos. El arreglo incluyó genes relacionados con p53 involucrados en apoptosis, ciclo celular, crecimiento celular, proliferación y diferenciación celular, y reparación de ADN además de 3 genes control (Erccl, Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1; Hif1a, Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit [basic helix-loop-helix transcription factor]; Ldha, Lactate dehydrogenase A). Los se evaluaron con el software MxPro (Stratogene) y analizados a través del portal en internet para el análisis de datos para arreglos de PCR cuantitativo proporcionado por SABiosciences. Se consideraron secuencias como potencialmente moduladas si el cambio entre las muestras provenientes del colon distal sometido a tratamiento (FND+AOM) y las no tratadas (AOM) fue mayor de 1.1 veces (inducción o inhibición) de acuerdo con las instrucciones del portal (<http://sabioscience.com/pcr/arrayanalysis.php>). Los genes se presentan en mayúsculas y minúsculas de acuerdo a la descripción proporcionada por el proveedor. La Figura 23

ilustra el acomodo de primers en la placa de arreglos de PCRq. La Figura 24 explica las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo el PCRq. El Anexo 8 muestra el diseño del arreglo de PCR cuantitativo con los genes analizados de la cascada de p53.

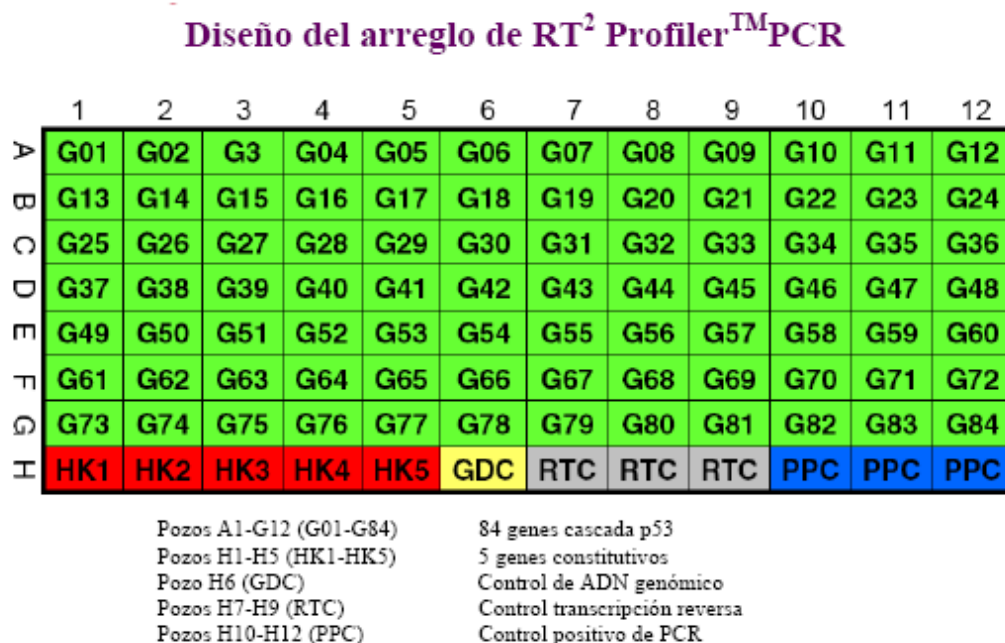


Figura 23. Diseño de la placa de arreglos para PCR en tiempo real de acuerdo con la casa comercial de manufactura.

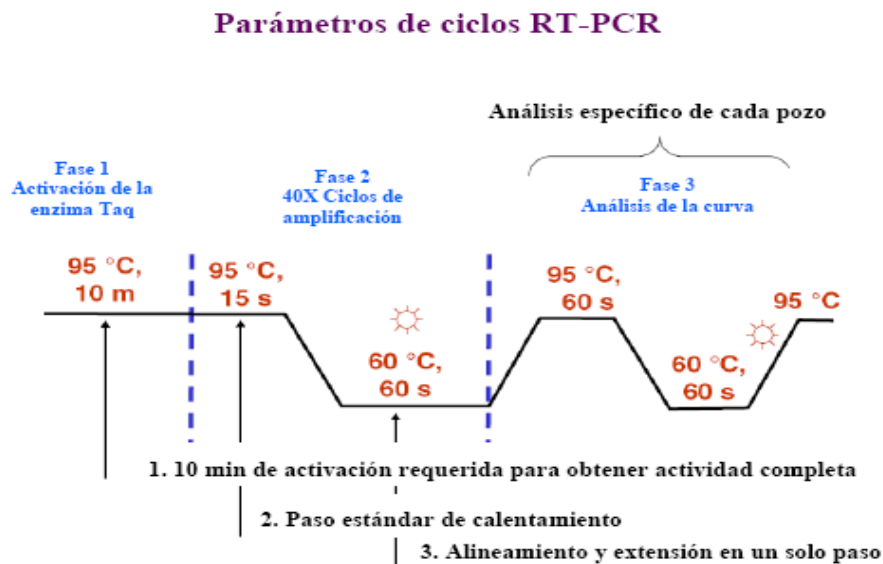


Figura 24. Descripción de los ciclos aplicados para el desarrollo del PCR en tiempo real en la placa de arreglos de ADNc

## **6.2.11 Análisis de la expresión de proteínas mediante electroforesis en geles de poli-acrilamida desnaturalizante**

### **6.2.11.1 Extracción de las proteínas totales**

Se tomaron 500 mg de tejido congelado (colon distal) 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 (Anexo 9). Posteriormente, las muestras se homogenizaron con un politrón (Cinémática, 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.

### **6.2.11.2 Cuantificación de proteínas totales**

La cuantificación de proteínas de los tejidos de colon distal se realizó por el método de Bradford (1976) (Anexo 10), utilizando albúmina sérica bovina como estándar. El método se basa en la unión de un colorante (Comassie Blue G-250) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre.

Se colocaron 10 µl de cada una de las muestras en una microplaca y se adicionaron 240 µl de reactivo de Bradford. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se analizó en el Multiskan (Thermo Electron Corporation, Multiskan Ascentr, Model 51118307, Lab. Tech, USA) a una longitud de onda de 540 nm. La absorbancia de la

muestra se comparó con una curva estándar de albúmina en un intervalo de 0 a 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Anexo 10).

### **6.2.11.3 Electroforesis SDS-PAGE y análisis de Western Blot**

Los extractos de proteínas obtenidos a partir de tejidos de colon distal de ratas tratadas con FC o FND e inducidos químicamente con AOM se desnaturalizaron con solución tampón Laemmli (Anexo 11) que contiene  $\beta$ -mercaptoetanol en baño maría a 95°C por 5 minutos. Las muestras se cargaron (150  $\mu\text{g}$  de proteína) en un gel de poli-acrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) con un espesor de 1 mm y se separaron a través de un sistema Mighty Small II SE 250 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA) durante aproximadamente 90 minutos a 120 volts con una temperatura de 4°C.

#### **6.2.11.3.1 Procedimiento para la electroforesis.**

Se colocó primero el gel separador y se dejó solidificar por aproximadamente 5 minutos. Ya solidificado se agregó el gel de condensación, se colocó el peine para marcar los pozos. Ya solidificado, se lavaron los pozos con la solución de electroforesis superior y se llenaron con éste. Se cargaron las muestras en el gel (150  $\mu\text{g}$ ). Se colocaron 10  $\mu\text{l}$  del marcador o estándar para verificar el peso molecular de la proteína de interés. Se corrió el gel a 120 volts por 90 minutos a 4°C (Ver metodología completa y preparación de soluciones en Anexo 12).

#### **6.2.11.3.2 Transferencia semiseca de proteínas a membranas de PVDF**

Separadas las proteínas, éstas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando una cámara semiseca (Trans-Blot SD de Bio-Rad Laboratories). Una vez terminada la electroforesis se despegó el gel y se lavó dos veces con solución de transferencia por 10 minutos. Se activó la membrana de PVDF en metanol y se colocó en solución de transferencia. Terminados los lavados se colocó 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 programó a 17 volts por 20 minutos. Al término se marcó la membrana y se tiñó con rojo de Ponceau (ver Anexo 12 para preparación de soluciones).

### **6.2.11.3.3 Western blot**

El western blot se realizó siguiendo la metodología descrita por el sistema para detección de proteínas SNAP i.d. (Millipore, Corporation, Billerica, MA) (Anexo 12).

Los casetes fueron preparados de acuerdo al protocolo de manufactura colocándose en su interior la membrana de PVDF conteniendo las proteínas, previamente activada con metanol y agua. Los sitios no específicos de la membrana se bloquearon con una solución de proteínas al 0.5% (blocking reagent Roche Molecular Biochemicals) aplicando vacío. La membrana se incubó durante 10 minutos con el anticuerpo monoclonal de interés (15:1500) a temperatura ambiente. Los anticuerpos se disolvieron en solución bloqueadora al 0.5%. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó con un esquema de 3 lavados con TTBS aplicando vacío continuo. Posteriormente, la membrana se incubó con un segundo anticuerpo de interés (2.5:1500) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó 3 veces con TTBS aplicando vacío continuo (ver Anexo 12 para preparación de soluciones).

Finalmente, la membrana se incubó con la solución de quimioluminiscencia (Roche Molecular Biochemicals) siguiendo el protocolo de manufactura 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 y los valores se expresaron como porcentaje de intensidad de pixeles.

### 6.2.12 Determinación de núcleos apoptóticos (TUNEL)

Se trabajó con muestras embebidas en parafina de la zona distal del colon cortadas en microtomo a 5  $\mu\text{m}$ .

- 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-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- 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 dejaron actuar por 1 hora a 37°C en cámara húmeda.

La reacción contenía:

1060 $\mu\text{l}$ de agua bidestilada	125 $\mu\text{l}$ de solución stock de TdT
12.5 $\mu\text{l}$ de Bio-dUTP	3.75 $\mu\text{l}$ de terminal transferasa (TdT)

- 4.- La reacción se detuvo sumergiendo las muestras en solución stop durante 15 minutos. La solución stop contenía: (300 mM de NaCl 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 visualizaron en un microscopio óptico.

### **6.2.13 Diseño experimental y análisis estadístico**

Se realizó un diseño experimental de un factor (tratamiento), completamente aleatorizado en réplicas. Se realizó un análisis de varianza ( $\alpha = 0.05$ ), haciendo una comparación entre tratamientos por la prueba de Tukey para los resultados referentes a la caracterización parcial del frijol crudo, cocido y la fracción no digerible, y una prueba de Dunnett para el ensayo *in vivo*, empleando el programa estadístico JMP 5.0.1.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Caracterización parcial de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) crudo, cocido y de la fracción no digerible de la variedad Bayo Madero.

#### 7.1.1 Composición proximal de muestras de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedades Bayo Madero (BM) y Pinto Durango (PD).

Se realizó el análisis bromatológico en el frijol crudo y cocido de las variedades Bayo Madero y Pinto Durango; los resultados se muestran en el Cuadro 4.

El análisis estadístico muestra que el tratamiento térmico influye significativamente sobre el contenido de proteína, aumentando en ambas variedades. Este efecto se atribuye a que con la cocción incrementa la biodisponibilidad de los aminoácidos que forman la proteína, lo que los hace más disponibles para su cuantificación. Los resultados de las dos variedades se encuentran dentro del intervalo de 20.3-29% reportado por Reyes-Moreno y Paredes-López (1993) en diferentes variedades cultivadas en México. En nuestro país, después del maíz, el frijol es considerado como la principal fuente de proteína para un porcentaje alto de la población, sobre todo en las áreas rurales. Por esta razón, el resultado del porcentaje de proteína en las muestras de frijol BM y PD evaluadas en este estudio, nos permite sugerir que ambas variedades de frijol son de alto valor nutricional y pudieran contribuir a una mejora nutricional en la población.

El contenido de grasa fue bajo, como es característico para la mayoría de las leguminosas, mostrando diferencia significativa entre ambas variedades. Los resultados son similares a los reportados por da Silva- Fialho *et al.* (2006), quienes informan un contenido de grasa de 1.13-1.81% para variedades de frijol Mesoamericano y Andino. También coinciden con lo reportado por Bednar *et al.* (2001) en el intervalo de 1.6-4.0% para 4 variedades de frijol.

Cuadro 4. Concentración de proteína, grasa, cenizas, fibra total, fibra soluble e insoluble de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) variedades Bayo Madero y Pinto Durango.

<b>Variedad</b>	<b>Proteína</b>	<b>Grasa</b>	<b>Cenizas</b>	<b>Fibra total</b>	<b>Fibra insoluble</b>	<b>Fibra soluble</b>
<b>BM crudo</b>	19.96 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.35 <sup>a,b</sup>	4.42 ± 0.02 <sup>a</sup>	38.84 ± 0.53 <sup>a</sup>	38.29 ± 0.52 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.01 <sup>a</sup>
<b>BM cocido</b>	21.09 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.13 ± 0.09 <sup>b</sup>	4.15 ± 0.04 <sup>b</sup>	39.60 ± 0.03 <sup>a</sup>	38.94 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.00 <sup>b</sup>
<b>PD crudo</b>	21.63 ± 0.24 <sup>b</sup>	3.09 ± 0.84 <sup>a</sup>	4.33 ± 0.03 <sup>a</sup>	37.47 ± 1.68 <sup>a</sup>	37.52 ± 1.04 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.00 <sup>c</sup>
<b>PD cocido</b>	22.97 ± 0.10 <sup>c</sup>	1.60 ± 0.08 <sup>a,b</sup>	3.72 ± 0.06 <sup>c</sup>	47.13 ± 0.61 <sup>b</sup>	44.43 ± 1.21 <sup>b</sup>	0.55 ± 0.02 <sup>a</sup>

BM = Bayo Madero; PD = Pinto Durango.

Los resultados son expresados en porcentaje por gramo de muestra en base seca.

Los resultados representan la media de 2 experimentos por duplicado ± error estándar.

Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa con  $\alpha = 0.05$ , prueba de Tukey.

En cuanto al contenido de cenizas, las muestras crudas presentaron mayor contenido que las cocidas. El contenido de cenizas es un indicador de la cantidad de hierro, potasio y otros minerales que aporta esta leguminosa. Los resultados que se presentan concuerdan con lo reportado por Vargas-Torres *et al.* (2004) en cuatro variedades de frijol, en un intervalo de 4.1-5.2%.

Por otro lado, en cuanto al contenido de fibra total, soluble e insoluble de frijol crudo y cocido, la tendencia de ambas variedades es a incrementar cuando la muestra recibe un tratamiento térmico. En cuanto al aumento de fibra soluble de muestras crudas a cocidas, los resultados concuerdan con lo reportado por Herrera *et al.* (1998), en diferentes variedades de frijol, negro, blanco y rojo. El contenido de fibra soluble sí presenta una diferencia significativa entre muestras crudas y cocidas, por lo que se sugiere que el tratamiento con calor rompe algunos complejos que mantienen menos disponible a este tipo de fibra; por lo que, al hidrolizarse estos enlaces con otras macromoléculas se libera la fibra soluble dejándola más disponible para su cuantificación. El mayor contenido de fibra soluble en frijol cocido lo presentó la variedad BM, es un dato importante ya que esta fracción es mayoritariamente fermentada en colon por la flora bacteriana.

Los resultados para fibra dietética total, soluble e insoluble se encuentran dentro de lo reportado por Bednar *et al.* (2001) para 4 variedades de frijol, reportando un contenido de fibra dietética total de 36.2-42.6%, fibra insoluble con un intervalo de 36.2-39.4% y para fibra soluble valores de 0-3.2%.

### **7.1.2 Rendimiento de fracción no digerible de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido, variedades Bayo Madero (BM) y Pinto Durango (PD).**

Una vez efectuado el análisis químico de las muestras crudas y cocidas, se realizó la extracción de la fracción no digerible a partir de frijol cocido y se determinó el rendimiento, el cual es presentado en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Rendimiento de fracción no digerible de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido, variedades Bayo Madero y Pinto Durango.

<b>Variedades</b>	<b>Rendimiento de fracción no digerible</b>
<b>BM cocido</b>	43.79 ± 0.61 <sup>a</sup>
<b>PD cocido</b>	37.19 ± 0.88 <sup>b</sup>

BM = Bayo Madero; PD = Pinto Durango.

Los valores representan la media de 3 experimentos independientes con 2 repeticiones ± error estándar.

Los resultados son expresados en porcentaje por gramo de muestra en base seca.

Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa con  $\alpha = 0.05$ , prueba de Tukey

El rendimiento de la FND a partir frijol cocido de la variedad Bayo Madero fue de 43.79%, mientras que para Pinto Durango fue de 37.19%, existiendo diferencia significativa entre ambas variedades. Este rendimiento de la FND en las dos variedades se encuentra por debajo de lo reportado por Feregrino-Pérez *et al.* (2008), quienes informan 57.5% de polisacáridos en frijol Negro 8025. Tales diferencias pueden ser atribuidas a que son diferentes variedades de frijol, diferentes cosechas, condiciones de crecimiento y origen del frijol (Florez *et al.*, 2009). De acuerdo a los datos presentados se puede sugerir que la variedad Bayo Madero presenta un porcentaje considerable de sustrato susceptible de fermentación por la flora bacteriana en colon, por lo que se esperaría una quimoprotección contra el desarrollo de las primeras lesiones en el colon.

### **7.1.3 Contenido de oligosacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) crudo, cocido y en la FND de las variedades Bayo Madero (BM) y Pinto Durango (PD).**

Los oligosacáridos tienen la capacidad de inhibir la carcinogénesis de colon a través de diferentes mecanismos (Swennen *et al.*, 2006), por lo que su cuantificación fue crítica en este estudio. El contenido de oligosacáridos en muestras de frijol común crudo, cocido y en la FND se muestra en el Cuadro 6 y en la Figura 25 se muestran los cromatogramas obtenidos a partir de frijol común cocido BM y de su FND.

Cuadro 6. Contenido de oligosacáridos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) crudo, cocido y en la fracción no digerible de las variedades Bayo Madero y Pinto Durango.

Variedad	Rafinosa	Estaquirosa	Verbascosa	Oligosacáridos
				Totales
<b>BM crudo</b>	12.30 ± 0.04 <sup>a</sup>	42.88 ± 0.09 <sup>a</sup>	4.63 ± 0.02 <sup>a</sup>	59.56 ± 0.24 <sup>a</sup>
<b>BM cocido</b>	10.44 ± 0.16 <sup>b</sup>	43.28 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.10 ± 0.00 <sup>b</sup>	55.76 ± 0.23 <sup>b</sup>
<b>BM FND</b>	1.51 ± 0.01 <sup>c</sup>	13.78 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.00 <sup>c</sup>	15.75 ± 0.03 <sup>c</sup>
<b>PD crudo</b>	5.48 ± 0.07 <sup>d</sup>	41.85 ± 0.27 <sup>c</sup>	0.83 ± 0.00 <sup>d</sup>	48.17 ± 0.27 <sup>c</sup>
<b>PD cocido</b>	7.08 ± 0.06 <sup>e</sup>	46.74 ± 0.16 <sup>d</sup>	1.20 ± 0.01 <sup>e</sup>	55.02 ± 0.16 <sup>b</sup>
<b>PD FND</b>	1.15 ± 0.01 <sup>f</sup>	13.13 ± 0.07 <sup>e</sup>	0.46 ± 0.01 <sup>c</sup>	14.73 ± 0.06 <sup>f</sup>

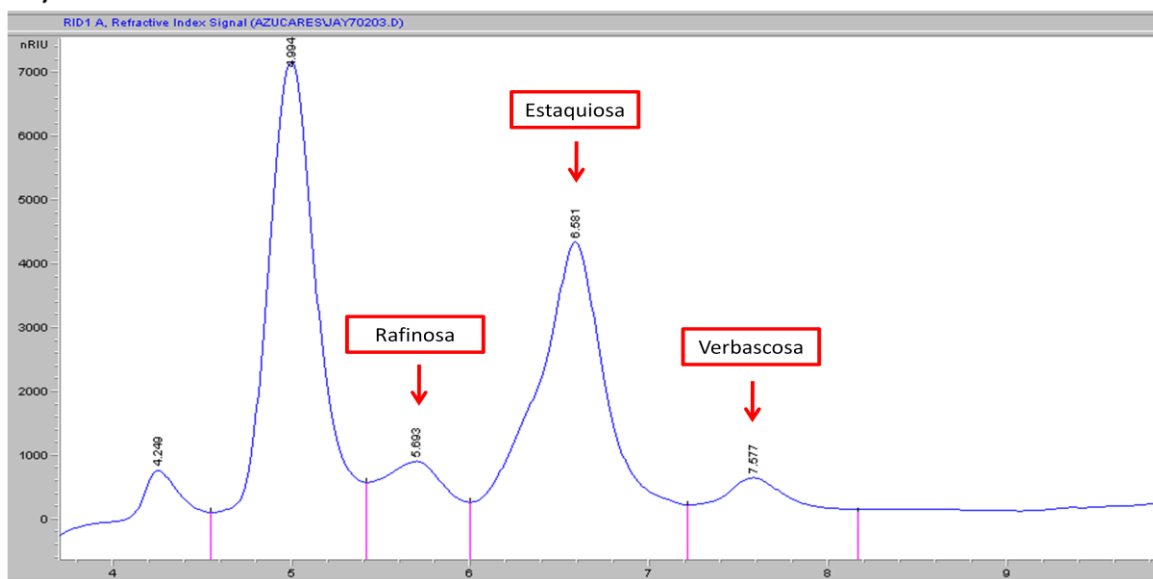
BM = Bayo Madero; PD = Pinto Durango; FND = Fracción no digerible.

Los resultados son expresados en miligramos por gramo de muestra en base seca.

Cada valor representa la media de 2 experimentos independientes por duplicado ± error estándar.

Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa con  $\alpha = 0.05$ , prueba de Tukey.

A)





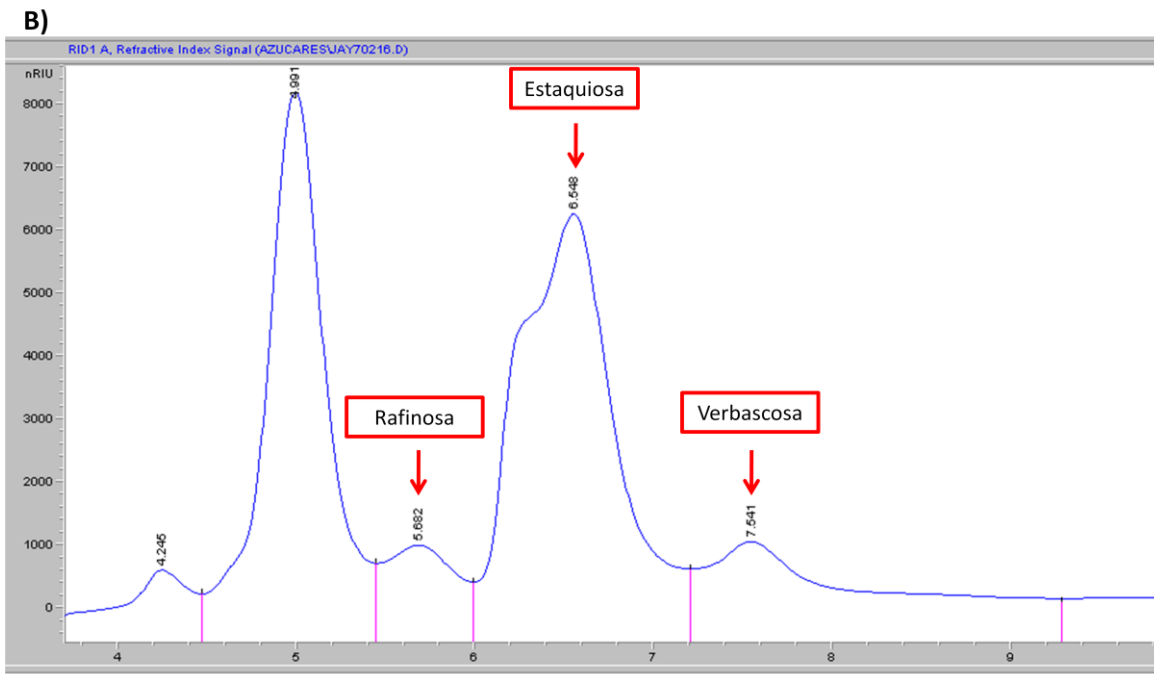


Figura 25. Identificación de oligosacáridos por cromatografía líquida de alta resolución, para la muestra de A) FC y B) FND de la variedad BM.

Los resultados muestran que las muestras crudas y cocidas de ambas variedades presentan diferencias significativas y se encuentran dentro de los intervalos reportados por Díaz-Batalla *et al.* (2006) en 10 variedades diferentes de frijol común de México crudas y cocidas, quienes refieren un contenido de rafinosa de 4.4-14.1 mg/g de muestra cruda y 3.2-11.0 mg en muestra cocida. En cuanto al contenido de estaquirosa, estos autores reportan valores de 23.7-63.8 mg en muestra cruda y para muestra cocida de 16.8-56.7 mg. Por último, en cuanto a verbascosa los mismos autores refieren valores de 2.2-35.8 mg en muestra cruda y de muestra cocida 1.6-24.3 mg. También nuestros datos concuerdan con lo reportado por Iniestra-González *et al.* (2005) quienes obtuvieron un contenido de oligosacáridos totales de 39.0-57.6 mg/g en 16 variedades de frijol común de diferentes colores de grano (negro, pinto, crema o bayo, azufrado, flor de mayo y blanco).

En la FND, el contenido de oligosacáridos totales fue significativamente menor comparado con las muestras crudas y cocidas de ambas variedades. El porcentaje de retención de oligosacáridos totales en la FND de BM fue de 28.25%, mientras que en PD fue de 26.77%. La pérdida de oligosacáridos se atribuye al método de extracción de la FND

empleado en este estudio, en el que se eliminan los sobrenadantes obtenidos después de la homogenización de la muestra con agua (5 volúmenes), con ácido tánico y de los lavados con acetona. La pérdida de oligosacáridos fue corroborada en estas fracciones por medio de HPLC.

En base a que el rendimiento de fracción no digerible, el contenido de oligosacáridos y de fibra soluble fueron significativamente mayores en la variedad BM que en PD, se decidió continuar con el estudio *in vivo* evaluando sólo el frijol cocido y la FND de esta variedad, por lo que los siguientes resultados se presentarán exclusivamente para frijol variedad BM.

#### **7.1.4 Contenido de fibra total, insoluble y soluble, almidón resistente, proteína, lípidos y digestibilidad *in vitro* de proteína en FND de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero.**

Los resultados de fibra total, soluble, insoluble, almidón resistente, grasa, proteína y digestibilidad *in vitro* de proteína de la FND se muestran en el Cuadro 7.

Los contenidos de fibra soluble, insoluble y total en la FND de BM fueron menores a los reportados por Feregrino-Pérez *et al.* (2008) en frijol común cultivar Negro 8025. Estas diferencias pueden atribuirse a la variabilidad en los cultivares de frijol, pero mayormente al fuerte efecto ambiental sobre la composición del frijol como ha sido reportado por otros autores (Florez *et al.*, 2009).

Tanto el almidón resistente como los diferentes tipos de fibra son sustratos susceptibles de fermentación por las bacterias colónicas. Nuestros resultados para almidón resistente fueron más bajos que los reportados por Campos-Vega *et al.* (2009) para la misma variedad de frijol, Bayo Madero (cosecha 2005), cultivado en el mismo lugar pero diferente año de cosecha (de 2007 para este estudio), lo que sugiere un fuerte efecto del ambiente sobre la variabilidad de estos componente.

Cuadro 7. Contenido de fibra total, insoluble y soluble, almidón resistente, proteína, lípidos y digestibilidad de proteína en la FND de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocido, variedad Bayo Madero.

<b>Bayo Madero</b>	<b>Fibra Total</b>	<b>Fibra Insoluble</b>	<b>Fibra Soluble</b>	<b>Almidón Resistente</b>	<b>Grasa</b>	<b>Proteína</b>	<b>Digestibilidad de Proteína</b>
<b>FND</b>	51.70 ± 1.27	51.08 ± 1.27	0.62 ± 0.00	25.54 ± 0.18	2.18 ± 0.04	18.24 ± 0.01	81.35 ± 1.26

FND = Fracción no digerible.

Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes con 2 repeticiones ± error estándar.

Los resultados son expresados en porcentaje por gramo de muestra en base seca.

El contenido de proteína de la FND de BM (18.24%) fue muy similar a lo obtenido en la muestra cocida de la misma variedad de frijol (21.09 %). Esto nos sugiere que por medio del acomplejamiento y precipitación con ácido tánico, sólo se elimina una pequeña cantidad de la proteína total, la cual se ha demostrado que también puede ser producto de fermentación en el colon por la flora bacteriana (Le-Leu *et al.*, 2007). Por lo que se realizó la digestibilidad *in vitro* del FND simulando las condiciones que se presentan *in vivo*, obteniendo el  $81.24 \pm 0.01$  % de digestibilidad, lo que sugiere que la mayoría de la proteína es digerida en la parte alta del tracto gastrointestinal y poca cantidad alcanza el colon, indicando que su contribución a la fermentación colónica podría ser baja.

### 7.1.5 Contenido de fenoles totales y taninos condensados de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) crudo, cocido y en la FND variedad Bayo Madero.

El contenido de fenoles totales y taninos condensados en las muestras de frijol común crudo, cocido y en la FND se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Contenido de fenoles totales y taninos condensados de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) crudo, cocido y en la FND de la variedad Bayo Madero.

Bayo Madero	Fenoles totales*	Taninos condensados**
Crudo	$0.67 \pm 0.03^a$	$7.39 \pm 0.12^a$
Cocido	$0.95 \pm 0.05^a$	$8.94 \pm 0.13^b$
FND	$13.83 \pm 0.65^b$	$13.98 \pm 0.13^c$

FND = Fracción no digerible.

\*Expresados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base seca.

\*\* Expresados como mg equivalentes de (+)-catequina por gramo de muestra en base seca.

Cada valor representa la media de 3 experimentos independientes con 2 repeticiones  $\pm$  error estándar.

Letras diferentes por columna expresan diferencia significativa con  $\alpha = 0.05$ , prueba de Tukey.

Los principales compuestos fenólicos de las leguminosas son los taninos condensados, ácidos fenólicos y flavonoides (Smulikowska *et al.*, 2001). Las muestras crudas en este estudio presentaron menor cantidad de fenoles totales que las muestras cocidas, sin diferencia estadística. El aumento en muestras cocidas puede atribuirse a que la

cocción hidroliza complejos formando por compuestos fenólicos con otros componentes del frijol en muestras crudas, como proteína y almidón resistente, por lo que al recibir el tratamiento térmico las estructuras se separan, dando lugar a la liberación de compuestos fenólicos con la posibilidad de cuantificarlos. Ambos resultados son similares a lo reportado por Espinosa-Alonso *et al.* (2006) en variedades de frijol negro y pinto.

El contenido de taninos condensados de las muestras de frijol cocido fue mayor que en crudo, mostrando diferencia significativa entre ambos. La diferencia puede atribuirse a que la semilla cruda tiende a presentar acomplejamiento de taninos con proteínas y almidones que no permitan su total cuantificación. Al recibir un tratamiento térmico, estos complejos podrían sufrir una hidrólisis, dejando algunos taninos condensados libres y disponibles para su cuantificación. Los resultados para muestras crudas y cocidas se encuentran dentro de lo reportado por Aparicio-Fernández *et al.* (2005) en variedad negro Jamapa tanto crudo como cocido, al igual que concuerdan con los resultados de González de Mejía *et al.* (2003) en diferentes variedades de frijol cultivadas en México.

La FND mostró significativamente mayor cantidad de fenoles totales y taninos condensados que las muestras crudas y cocidas, resultado que se esperaba debido a que en el extracto se concentran este tipo de compuestos unidos a la fibra presente.

## **7.2 Evaluación *in vivo* del efecto del FC y de la FND, variedad Bayo Madero, sobre el desarrollo de fosas crípticas aberrantes inducidas con azoximetano.**

### **7.2.1 Efecto del FC y la FND administrados intragástricamente sobre el consumo de agua, alimento y ganancia de peso.**

Diariamente se registró el consumo de agua y alimento, resultados que son presentados en las Figuras 26 y 27. Los resultados muestran que, como era de esperarse por el crecimiento normal de las ratas, se presentó diferencia significativa entre la semana 1 y semana 10 para ambos parámetros evaluados en la mayoría de los grupos. Sin embargo,

tanto la ingesta de agua como el consumo de alimento fueron similares en los 6 grupos después de 9 semanas de tratamiento, no obteniendo diferencias significativas entre ellos en la medición final (semana 10), sugiriendo que los tratamientos fueron bien tolerados por los animales.

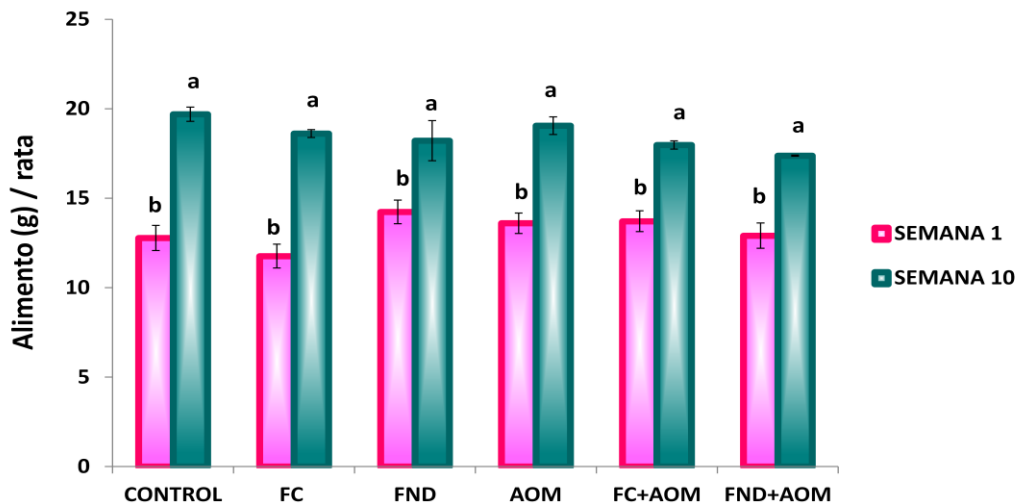


Figura 26. Consumo de alimento en grupos alimentados con frijol cocido y su fracción no digerible y administrados con azoximetano.

FC = Frijol cocido, FND = Fracción no digerible, AOM = Azoximetano.

Letras diferentes indican diferencia significativa entre semana 1 y semana 10, prueba de T de student  $\alpha=0.05$ .

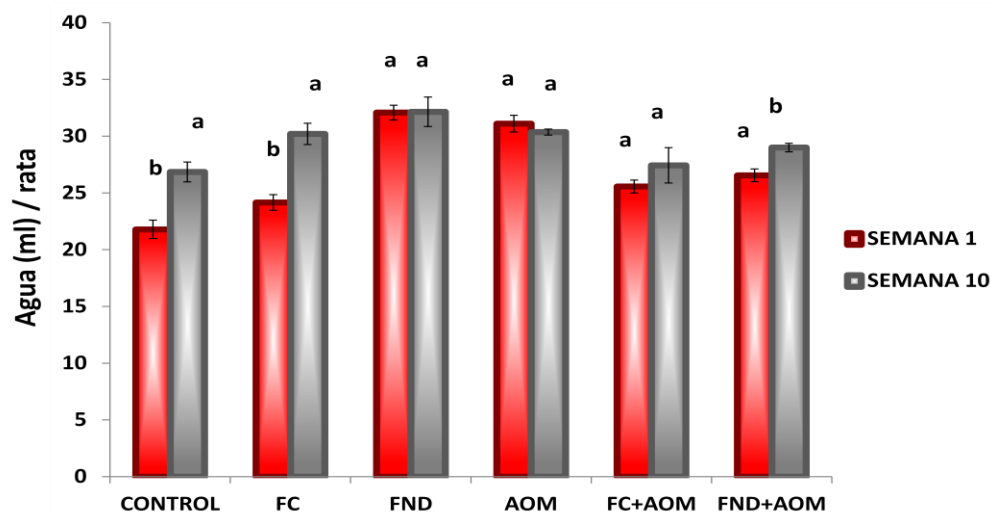


Figura 27. Consumo de agua en grupos alimentados con frijol cocido y su fracción no digerible y administrados con azoximetano..

FC = Frijol cocido, FND = Fracción no digerible, AOM = Azoximetano.

Letras diferentes indican diferencia significativa entre semana 1 y semana 10, prueba de T de student  $\alpha=0.05$ .

Estos resultados se reflejan en la ganancia de peso, determinada semanalmente, la cual se presenta en la Figura 28.

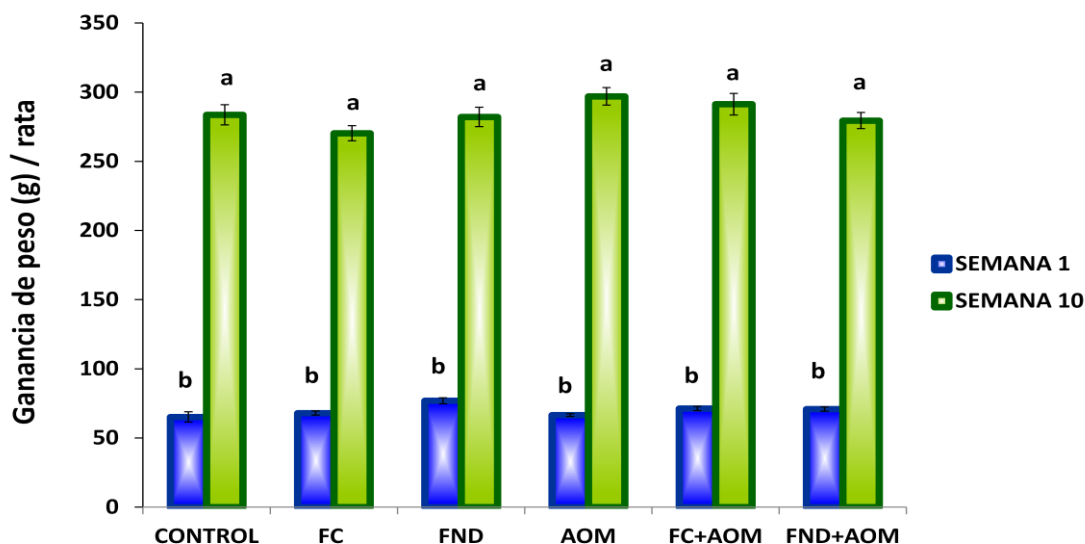


Figura 28. Ganancia de peso en grupos experimentales.

FC = Frijol cocido, FND = Fracción no digerible, AOM = Azoximetano.

Letras diferentes indican diferencia significativa entre semana 1 y semana 10, prueba de T de student  $\alpha=0.05$ .

El consumo de agua y alimento no presentaron diferencias significativas entre grupos y al mismo tiempo no se observaron cambios en la ganancia de peso, ya que tampoco hubo diferencia significativa entre los diferentes grupos, proponiendo que los tratamientos apoyaron el crecimiento normal de las ratas y la inducción con AOM no influyó sobre la ganancia de peso de los animales. Lo que sugiere que, al estudiar un estadio temprano del cáncer no se presentaron aún síntomas de daño por el AOM como pérdida de peso o ganancia de peso ni disminución de la ingesta de las ratas (American Cancer Society, 2010).

### 7.2.2 Evaluación del FC y de la FND sobre el desarrollo de FCA inducidas con AOM en ratas Sprague-dawley.

El periodo experimental *in vivo* comprendió una semana de adaptación y 9 semanas de tratamiento en 75 ratas Sprague-dawley. Al término del experimento, se

sacrificaron las ratas por dislocación y se extrajo la zona distal del colon. Cada grupo se dividió en dos, uno para el análisis histológico (n=12) y el otro para el análisis molecular (n=12). Para la parte histológica, el colon del 25% de los animales se colocó en formaldehído al 4% durante 24 horas y se determinó el número de fosas crípticas aberrantes (FCA) por medio de tinción con azul de metileno observándolas en un microscopio (40x). El otro 25% de las muestras de colon de los animales se fijaron en formaldehído al 4%, se embebieron en parafina, se cortaron paralelamente con la superficie de la mucosa y se tiñeron con Hematoxilina & Eosina (H&E) para su examinación histológica. Los resultados de ambas tinciones se muestran en la Figura 29.

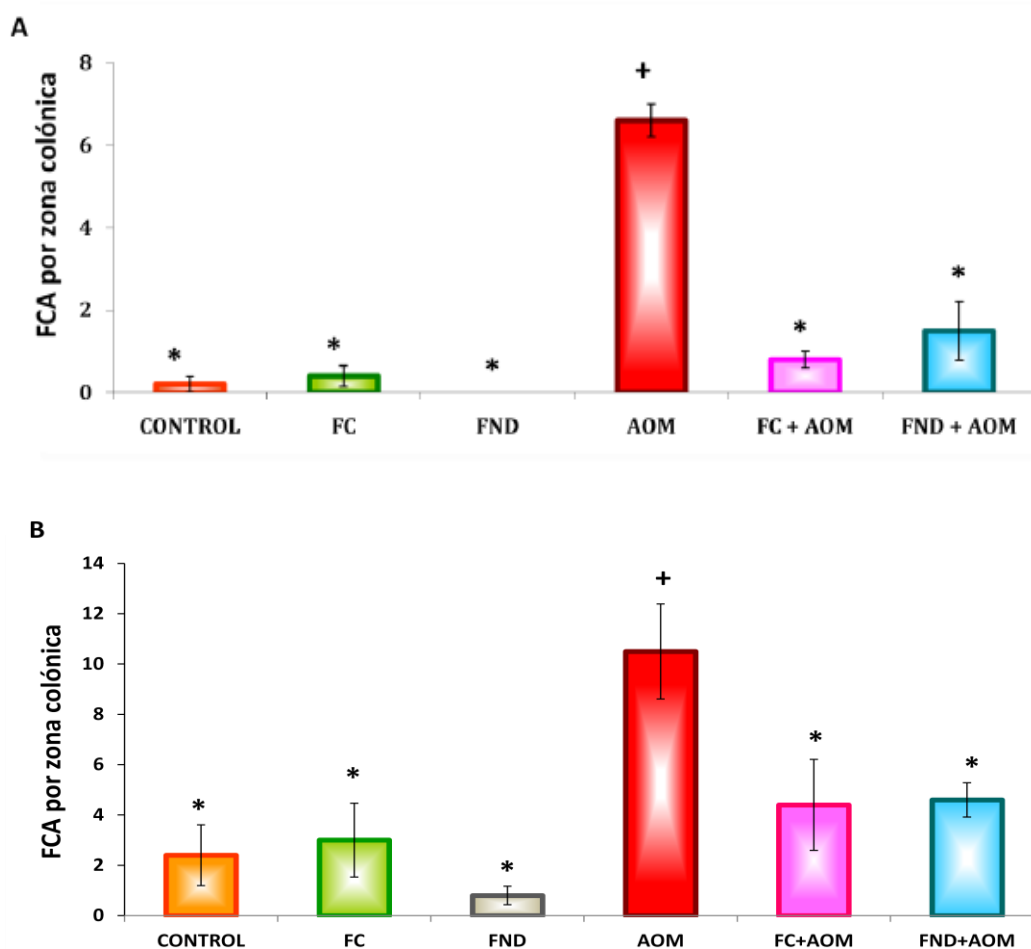


Figura 29. Fosas crípticas aberrantes (región distal) por grupo de tratamiento. Tinción con (A) Azul de metileno y (B) Hematoxilina & Eosina.

FC = Frijol cocido, FND = Fracción no digerible, AOM = Azoximetano.

Cada valor representa la media de FCA por zona colónica (distal)  $\pm$  error estándar.

\* Diferencia significativa con respecto al grupo AOM, prueba de Dunnett ( $\alpha = 0.05$ ).

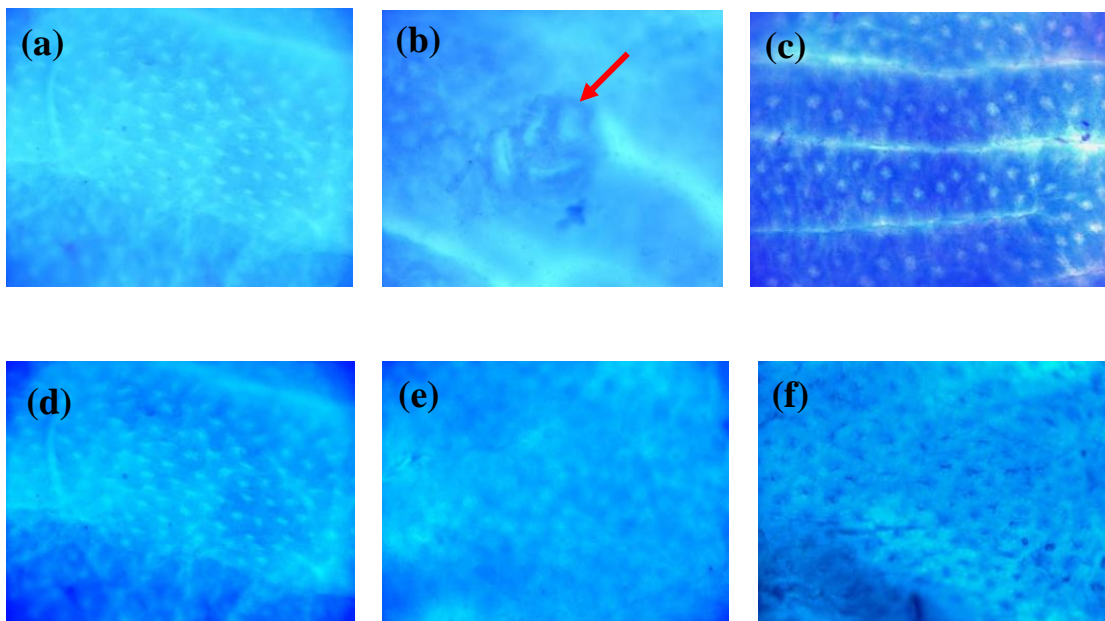
+ Diferencia significativa con respecto al grupo Control, prueba de Dunnett ( $\alpha = 0.05$ ).



Los resultados nos muestran que la dosis utilizada de frijol cocido o la fracción no digerible de frijol cocido basada en el consumo *per cápita* rural en un individuo de 70 kg de peso corporal en la Región Lagunera de México (Del Razo *et al.*, 2006) no induce el desarrollo de FCA, ya que estos grupos no presentan diferencia significativa con respecto al control negativo en ninguna de las dos tinciones. Resultados que sugieren que el consumo de FC y FND no contribuye a la generación de lesiones tempranas en colon, siendo un punto a favor para promover el aumento en su consumo.

Por otro lado, se demostró que el tratamiento con AOM administrado una vez a la semana durante dos semanas a una concentración de 15 mg/Kg de peso, induce la formación de FCA en rata ( $6.6 \pm 0.40$  y  $10.5 \pm 1.89$  FCA/zona colónica, de acuerdo a la tinción con azul de metileno y H&E, respectivamente), por lo que se considera un buen modelo para el estudio del estadio temprano del cáncer de colon, tanto con tinción con azul de metileno como con H&E. Este dato concuerda con lo reportado por Vanamala *et al.* (2006) quienes informaron que dos inyecciones en semanas consecutivas de AOM, con una dosis de 15 mg/kg de peso, inducen el desarrollo de FCA en ratas macho Sprague-dawley de manera significativa después de 10 semanas después de la última inyección. También Feregrino-Pérez *et al.* (2008) reportaron que dos inyecciones de AOM en ratas macho Sprague-Dawley con una dosis de 15 mg/kg de peso indujeron el desarrollo de FCA a las 5 semanas después de la última inyección, lo que representa una etapa temprana del cáncer. En la Figura 30 se presentan algunas FCA encontradas en el grupo AOM teñidas con azul de metileno y Hematoxilina & Eosina respectivamente, las cuales presentan la morfología característica de las FCA, que incluye incremento de tamaño de la cripta comparadas con criptas adyacentes, forma ovalada, aumento visible del área pericriptal, exhiben epitelio engrosado y presentan más de un foco por cripta (Mori *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2006). En la misma figura se presentan imágenes del epitelio colónico correspondiente a los 6 grupos de tratamiento después de 9 semanas de tratamiento.

(A)



(B)

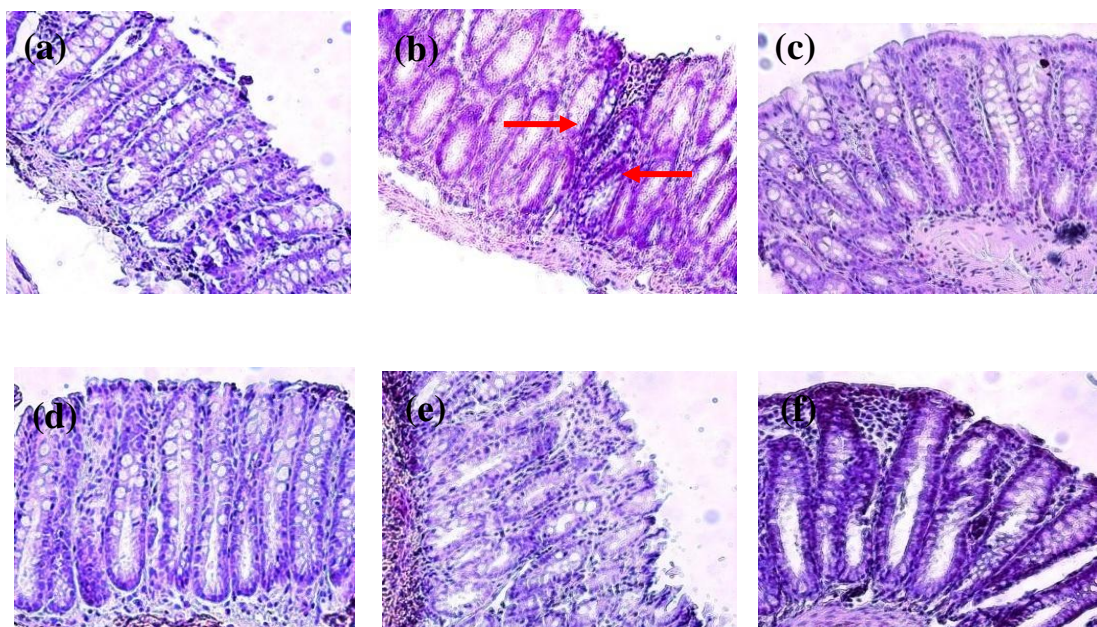


Figura 30. Fosas crípticas normales y aberrantes de colon distal del colon. Tinción con (A) azul de metileno y (B) H&E. (a) Control; (b) AOM; (c) FC; (d) FND; (e) FC+AOM; (f) FND+AOM.

FC = Frijol cocido; FND = Fracción no digerible; AOM = Azoximetano.  
Las FCA están indicadas con flechas rojas.

De acuerdo a la tinción con azul de metileno, el tratamiento con FND+AOM disminuyó significativamente el desarrollo de FCA en el colon distal comparado con el grupo AOM ( $1.5 \pm 0.72$  FCA/zona distal vs.  $6.6 \pm 0.40$  FCA/zona distal). La tinción con H&E mostró la misma tendencia con la disminución significativa de FCA en el grupo FND+AOM comparado con el grupo AOM. ( $4.6 \pm 0.68$  FCA/zona distal vs.  $10.5 \pm 1.89$  FCA/zona distal). A su vez, FC+AOM también disminuyó el desarrollo de FCA en el colon distal de ratas inducidas comparados con el grupo AOM por ambas tinciones ( $0.8 \pm 0.20$  y  $4.4 \pm 1.81$  FCA/zona distal por tinción con azul de metileno y H&E, respectivamente). Estos datos nos sugieren que tanto el FC como la FND actúan como un tratamiento protector del cáncer de colon en un estadio temprano o iniciación, y a su vez sugieren que la mayor parte del efecto quimoprotector del FC es proporcionado por la FND al no presentar diferencias significativas entre los resultados de ambos grupos de tratamiento. Los resultados son similares a lo reportado por Feregrino-Pérez *et al.* (2008), quienes observaron un efecto quimoprotector por parte de extractos de polisacáridos de frijol Negro 8025 en ratas inducidas con azoximetano, en donde el grupo FND+AOM presentó  $24.5 \pm 8.2$  FCA/zona colónica comparado con el grupo AOM de  $35.0 \pm 18.9$  FCA/zona colónica, teñidas con azul de metileno.

En el presente estudio se obtuvo un porcentaje de reducción del 77.27% y 56.19% en el número de FCA con el tratamiento con FND con tinción de azul de metileno y H&E respectivamente, lo cual es similar a lo informado por los autores antes mencionados quienes obtuvieron un porcentaje de reducción de FCA de 70% por el extracto de polisacáridos de frijol Negro 8025 en ratas inducidas químicamente.

### **7.2.3 Efecto del FC y el FND sobre el nivel de pH en contenido cecal, colónico y fecal.**

Los datos referentes al efecto del FC y la FND sobre el nivel de pH de los contenidos cecal, colónico y fecal se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Efecto del FC y la FND sobre el nivel de pH en contenido cecal, colónico y fecal.

Grupo	pH cecal	pH colónico	pH fecal
<b>CONTROL</b>	7.54 ± 0.09 <sup>ab</sup>	7.25 ± 0.11 <sup>a</sup>	6.41 ± 0.03 <sup>ab</sup>
<b>FC</b>	7.54 ± 0.02 <sup>ab</sup>	7.52 ± 0.10 <sup>a</sup>	6.53 ± 0.04 <sup>a</sup>
<b>FND</b>	7.42 ± 0.01 <sup>ab</sup>	7.42 ± 0.13 <sup>a</sup>	6.32 ± 0.05 <sup>b</sup>
<b>AOM</b>	7.56 ± 0.09 <sup>a</sup>	7.19 ± 0.13 <sup>a</sup>	6.41 ± 0.02 <sup>ab</sup>
<b>FC + AOM</b>	7.21 ± 0.10 <sup>b</sup>	7.42 ± 0.02 <sup>a</sup>	6.44 ± 0.03 <sup>ab</sup>
<b>FND + AOM</b>	7.32 ± 0.03 <sup>ab</sup>	7.47 ± 0.02 <sup>a</sup>	6.35 ± 0.03 <sup>b</sup>

FC = Frijol cocido, FND = Fracción no digerible, AOM = Azoximetano.

Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes con 3 repeticiones ± error estándar.

Letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos, prueba de Tukey  $\alpha=0.05$ .

El nivel de pH de las heces ha sido utilizado por algunos autores como una medida indirecta de la producción de ácidos grasos de cadena corta en colon (Hu *et al.*, 2002). Los tratamientos evaluados no mostraron diferencias significativas en el nivel de pH en ninguno de los contenidos analizados (cecal, colónico y fecal), excepto el FC+AOM en contenido cecal, que presentaron el menor nivel de pH comparado con los demás grupos. Estos datos concuerdan con lo reportado por Nakanishi *et al.* (2003), quienes reportan que el tratamiento con esporas de *C. butyricum* y una dieta alta en almidón resistente no influye de manera significativa en el pH colónico de ratas inducidas con AOM. Aún y cuando no se presentaron diferencias significativas en el presente estudio, el grupo tratado con FND+AOM presentó ligeramente menor nivel de pH que el control AOM y que el control negativo en contenido cecal y fecal.

El valor de pH en contenido cecal difiere de lo informado por Le-Leu *et al.* (2005) quienes reportan un intervalo de pH de 6.5 a 6.7 en ratas tratadas con diferentes porcentajes de almidón resistente e inducidas con AOM, mientras que en el presente estudio el tratamiento con FC o FND en ratas inducidas mostró un pH más básico (7.21 y 7.32, respectivamente) en esta zona colónica. De manera similar, el pH del contenido colónico difiere con lo reportado por Nakanishi *et al.* (2003) en ratas tratadas con almidón resistente e inducidas con AOM, ya que informan un pH de 6.4 y en este trabajo resultó un pH de

7.42 y 7.47 en FC+AOM y FND+AOM, respectivamente. Las variaciones pueden atribuirse a los diferentes tratamientos administrados entre los estudios mencionados y el presente; a su vez, en ambos estudios, además de la complementación de la dieta con almidón resistente como sustrato de fermentación se les administró a las ratas cepas de bacterias productoras de AGCC, *L. acidophilus* y/o *B. lactis* (Le-Leu *et al.*, 2005) y *C. butyricum* (Nakanishi *et al.*, 2003).

#### **7.2.4 Efecto del FC y el FND sobre la producción de AGCC en contenido cecal, colónico y fecal.**

En el Cuadro 10 se muestra la concentración de AGCC en contenido cecal, colónico y fecal.

Cuadro 10. Efecto del FC y el FND sobre la producción de AGCC en contenido cecal, colónico y fecal.

Grupo	AGCC								
	Contenido cecal			Contenido colónico			Contenido fecal		
	Ác. acético	Ác. propiónico	Ác. butírico	Ác. acético	Ác. propiónico	Ác. butírico	Ác. acético	Ác. propiónico	Ác. butírico
<b>CONTROL</b>	13.40 ± 1.4	3.78 ± 0.28	3.37 ± 0.22	9.84 ± 0.15	3.19 ± 0.04	2.45 ± 0.08*	11.48 ± 0.67*	3.38 ± 0.19	2.81 ± 0.11*
<b>FC</b>	10.36 ± 0.37	3.14 ± 0.08	2.81 ± 0.11	10.28 ± 0.28	3.21 ± 0.06	2.37 ± 0.05*	11.37 ± 0.24*	3.14 ± 0.02	2.90 ± 0.02*
<b>FND</b>	10.71 ± 0.48	3.27 ± 0.11	2.76 ± 0.07	10.28 ± 0.16	3.27 ± 0.11	2.53 ± 0.03*	11.04 ± 0.29*	3.32 ± 0.04	3.37 ± 0.04
<b>AOM</b>	10.96 ± 0.26	3.24 ± 0.06	3.20 ± 0.08	10.83 ± 0.31	3.46 ± 0.12	2.82 ± 0.07	13.45 ± 0.12	3.48 ± 0.01	3.21 ± 0.01
<b>FC + AOM</b>	10.86 ± 0.41	3.43 ± 0.16	3.05 ± 0.12	9.86 ± 0.13	3.32 ± 0.06	2.43 ± 0.03*	12.03 ± 0.31	3.59 ± 0.03	2.58 ± 0.02*
<b>FND + AOM</b>	10.74 ± 0.23	3.27 ± 0.08	2.86 ± 0.08	10.20 ± 0.85	3.35 ± 0.15	2.63 ± 0.08	12.78 ± 0.21	3.71 ± 0.03	3.34 ± 0.02

FC = Frijol cocido, FND = Fracción no digerible, AOM = Azoximetano.

Los resultados son expresados como mmol por gramo de muestra congelada.

Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes con 3 repeticiones ± error estándar.

\* Diferencia significativa en comparación con el grupo AOM prueba de Dunnet  $\alpha= 0.05$ .

Diversos autores han demostrado que los AGCC ejercen un efecto protector contra el desarrollo de neoplasias de colon en modelos animales, así como la modulación de genes importantes para detener la proliferación celular en diferentes líneas celulares transformadas de colon humano (Avivi-Green *et al.*, 2002; Hangen y Bennink, 2002; Rouet-Benzineb *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006).

Los valores de pH similares concuerdan con la producción de AGCC presentados en el Cuadro 10. El contenido cecal no presentó diferencia significativa entre los grupos FC+AOM y FND+AOM con respecto al control negativo o al grupo AOM. En el contenido colónico y fecal, el grupo FC+AOM presentó la menor cantidad de ácido butírico comparado con los grupos restantes. El grupo FND+AOM presentó mayor producción de AGCC en contenido colónico y fecal comparado con el grupo FC+AOM, con diferencia estadísticamente significativa sólo de ácido butírico en contenido fecal. Por otro lado, el grupo FND+AOM aunque no obtuvo diferencia significativa, presentó ligeramente mayor cantidad de ácido propiónico y butírico en contenido fecal comparado con el grupo AOM.

Los resultados presentados difieren de lo reportado por Feregrino-Pérez *et al.*, (2008) quienes encontraron la mayor producción de ACGG en contenido cecal, comparado con contenido colónico y fecal, mientras que en este trabajo la mayor concentración de ácidos grasos se presenta en contenido fecal. Sin embargo, concuerdan con los mismos autores en cuanto a que el grupo de ratas tratadas con un extracto de polisacáridos de frijol Negro 8025 e inducido con AOM presentó la mayor producción en contenido fecal. Las diferencias en las concentraciones de AGCC entre ambos estudios se debe al tipo/variedad de frijol empleado; además la composición en el contenido de la FND susceptible de fermentación es diferente entre variedades dando como resultado también diferente producción de los AGCC. Resultados que sugieren que el frijol negro y su extracto de polisacáridos producen mayor concentración de AGCC. Sin embargo, el efecto quimioprotector que ejerce el extracto de polisacáridos de dicha variedad, concuerda con el observado en el presente estudio, en donde el tratamiento efectivamente está ejerciendo un efecto protector al reducir el desarrollo de FCA en colon distal.

La similitud en la concentración de AGCC entre grupos de tratamiento y su relación con el efecto protector contra el desarrollo de FCA, pueden ser explicados de diferentes maneras. Los AGCC, especialmente el ácido butírico, presentan un efecto paradójico, en el cual los efectos sobre la proliferación y apoptosis dependen del tipo y estado de la población celular al que están dirigidos. Se ha demostrado que el ácido butírico suprime la proliferación en líneas celulares transformadas de colon. Por otro lado, en situaciones en donde la energía de las células colónicas es escasa, el ácido butírico estimula la proliferación, y por último, en tejido normal no presentan ningún efecto sobre proliferación (Sengupta *et al.*, 2006). En el presente estudio se observó una concentración similar de AGCC entre los tratamientos, incluso en el grupo AOM. Sin embargo, los grupos tratados con FC+AOM y FND+AOM mostraron una protección reflejada en la baja incidencia de FCA, misma que pudiera ser producto de ese efecto paradójico en el que los ácidos grasos, aún en bajas concentraciones, pudieran estar ejerciendo protección para reparar el daño causado por el agente carcinogénico.

Cabe señalar que en el presente estudio la concentración de ácido butírico en contenido cecal fue de 3.05 y 2.86 mmol/g, en contenido colónico fue de 2.43 y 2.63 mmol/g y en contenido fecal resultó de 2.58 y 3.34 mmol/g para los grupos FCA+AOM y FND+AOM, respectivamente. Davido *et al.* (2001) comprobaron que el ácido butírico a una concentración de 2 mmol/l disminuye la proliferación de células de adenocarcinoma de colon humano HT-29, lo que sugiere que se tiene la concentración mínima de ácido butírico para quimioproteger al colon.

Sin embargo, la hipótesis más fuerte que se deriva de estos resultados es que la quimioprotección ejercida por la FND en ratas inducidas con AOM se lleva a cabo a través de otros mecanismos moleculares alternos por lo que la producción de AGCC a partir de la fermentación de la FND no es la vía única por la que el frijol común puede proteger contra el desarrollo de cáncer de colon. Se sugiere que la FND obtenida a partir de la variedad Bayo Madero presenta un efecto protector similar a lo observado para la variedad Negro 8025 (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008) pero con diferentes efectos de sus componentes y/o los metabolitos propios de cada variedad.



Se sugiere que el desencadenamiento de otros mecanismos de protección diferentes al frijol Negro 8025 podría deberse a la presencia y actividad de algunos otros compuestos, como es el caso de los compuestos fenólicos y galactooligosacáridos cuantificados en este estudio, y otros como los péptidos bioactivos, que pueden influir en la prevención del desarrollo de FCA. Se ha demostrado que estos compuestos participan en la modulación de genes y proteínas involucradas en el arresto al ciclo celular, apoptosis y otros procesos celulares (Gonzalez de Mejia *et al.*, 2003; Veeriah *et al.*, 2007; Kuntz *et al.*, 2009; Torruco-Uco *et al.*, 2009).

Los galactooligosacáridos no digeribles incrementan las especies bacterianas benéficas en colon y se ha informado una sinergia entre las células bacterianas y las del epitelio, por lo que estos compuestos tienen la capacidad de inhibir la unión de patógenos a las superficies celulares actuando competitivamente por los receptores de membrana, resultando en una reducida actividad de enzimas capaces de reactivar carcinógenos en colon (Tzortzis *et al.*, 2005). Ambos tratamientos FC y FND, contienen considerable cantidad de galactooligosacáridos por lo que se sugiere que estos compuestos están participando en el mecanismo de protección contra el desarrollo de FCA. Además, tanto el FC como la FND también contienen compuestos fenólicos que pueden efectivamente inducir la muerte celular programada, diferenciación e inhibición del crecimiento de colonocitos transformados por medio de la regulación en los niveles de RNA mensajero de genes involucrados en estos procesos a través de los compuestos fenólicos como tal o los generados a partir de éstos por la fermentación colónica como el ácido 3-OH-fenilacético, 3,4 diOH-fenilacético, 3-fenilpropiónico, entre otros (Veeriah *et al.*, 2007; Wenzel *et al.*, 2000). Finalmente, se sugiere que los péptidos bioactivos con potencial anticarcinogénico pudieran estar presentes en la FND y pasar intactos a través del tracto gastrointestinal y ser liberados en el colon. Los péptidos bioactivos de diferentes leguminosas tienen propiedades anticarcinogénicas por la inducción de apoptosis a través de la activación de caspasa 3, inhibición de topoisomerasa 2 o reducción de la activación de NFκB e interleucina-6 (González de Mejia y Prisecaru, 2005; Torruco-Uco *et al.*, 2009).

### 7.2.5 Efecto del FC y el FND sobre la actividad enzimática de $\beta$ -glucuronidasa en contenido cecal, colónico y fecal.

Los resultados de la actividad enzimática de  $\beta$ -glucuronidasa se presentan en la Figura 31.

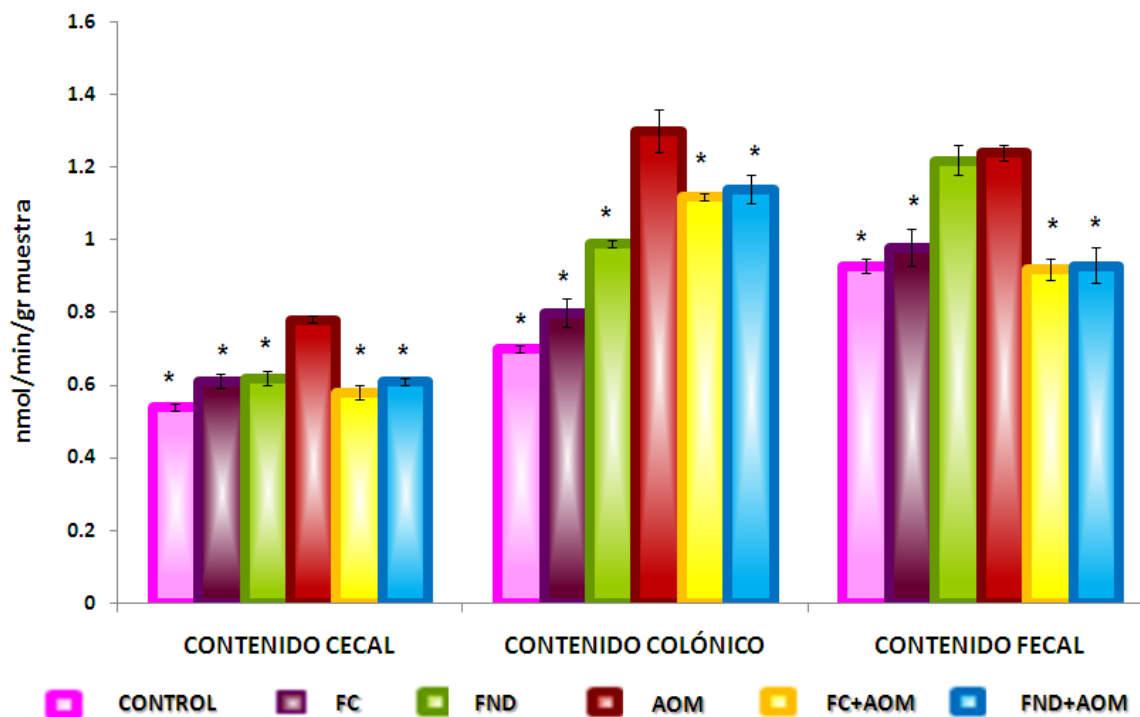


Figura 31. Actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa en contenido cecal, colónico y fecal.

FC = Frijol cocido; FND = Fracción no digerible; AOM = Azoximetano.

Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes con 3 repeticiones  $\pm$  error estándar.

Los resultados son expresados como nmol/min/gr de muestra.

\* Diferencia significativa con respecto al grupo AOM, prueba de Dunnett  $\alpha = 0.05$ .

La actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa es relevante en el proceso de carcinogénesis de colon debido a su habilidad para hidrolizar una gran variedad de conjugados glucurónidos y así liberar metabolitos carcinógenos activos en el lumen intestinal (Rafter, 2002). Se ha sugerido por algunos autores que las dietas complementadas con diversos tipos de fibras pueden contribuir a la inhibición de cáncer de colon por medio de varios mecanismos, siendo uno de ellos el aumento de bacterias no patógenas y la fermentación por las mismas de las fibras, así como también la disminución en la población

bacteriana patógena como *E. coli*, que presenta una mayor actividad enzimática de  $\beta$ -glucuronidasa (Rao *et al.*, 1998).

Los resultados de la Figura 31 nos muestran que, en los tres contenidos analizados, el consumo de FC o FND disminuye significativamente la actividad de esta enzima con respecto al grupo AOM. Esta disminución fue acompañada por la protección contra lesiones pre-cancerosas inducidas por el químico carcinógeno (AOM), sugiriendo que la reducción en el desarrollo de FCA puede ser consecuencia de la disminución de la actividad de esta enzima en contenido cecal, colónico y fecal, ya que la insuficiente cantidad de esta enzima previene la liberación de carcinógenos en colon y así no puede inducirse el daño producido en el grupo AOM.

La disminución de la actividad enzimática concuerda con Nakanishi *et al.* (2003) en contenido cecal y colónico en ratas inducidas con AOM y tratadas con una dieta alta en almidón resistente y un probiótico, el *C. butyricum*. También nuestros resultados son similares a lo reportado por Manoj *et al.* (2001), quienes demostraron una disminución de la actividad enzimática en contenido colónico con dietas complementadas con fibra de coco y de frijol mungo en ratas inducidas con DMH.

Los resultados sugieren que la reducción en la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa y la presencia de otros compuestos bioactivos como galactooligosacáridos, compuestos fenólicos y péptidos bioactivos en el FC y la FND mitigan el desarrollo de FCA.

### **7.3 Análisis de la expresión génica de la cascada de señalización de p53 en el tejido de colon distal de ratas tratadas con la FND de la variedad Bayo Madero e inducidas químicamente con AOM en comparación con el grupo AOM.**

En base a que los resultados anteriores demuestran la misma tendencia de quimoprotección de ambos tratamientos, FCA+AOM y FND+AOM, en la inhibición del desarrollo de FCA y en la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa, se prosiguió a evaluar la expresión de genes únicamente en el grupo FND+AOM y el grupo AOM para su comparación.

El análisis de la expresión génica de la cascada de señalización de p53 muestra que 42 genes de los 77 analizados fueron modulados al menos 2 veces (inducción o inhibición) en el grupo tratado con FND e inducido químicamente (FND+AOM) con respecto al grupo AOM (Cuadro 11 y Cuadro 12). Sin embargo, no pueden ser descartados aquellos genes que presentan al menos  $>1.1$  veces cambio en su expresión. Los genes analizados pertenecen a diferentes vías de señalización como apoptosis, ciclo celular, proliferación, diferenciación reparación de ADN y respuesta inflamatoria.

Cuadro 11. Genes inducidos en tejido de colon distal de ratas tratadas con FND+AOM comparados con el grupo AOM agrupados por función biológica.

Número de acceso Gene bank	Símbolo	Función biológica	Nombre del gen	Grado de cambio (>2/ inducción)	Grado de cambio (>1.1/ inducción)
<b>Apoptosis</b>					
XM_216377	Bag1	Anti-apoptosis	BCL2-associated athanogene	+13.7	
NM_022274	Birc5	Anti-apoptosis	Baculoviral IAP repeat-containing 5	+3.7	
NM_021846	Mcl1	Anti-apoptosis	Myeloid cell leukemia sequence 1	+7.3	
NM_030989	Tp53	Inducción de apoptosis, regulación negativa del ciclo celular y reparación de ADN	Tumor protein p53	+9.3	
NM_019221	Tp73l	Inducción de apoptosis y arresto al ciclo celular	Tumor protein p73-like		+1.3
AI406530	Traf1	Inducción de apoptosis	Transcribed locus, strongly similar to NP_033447.2 Tnf receptor-associated factor 1 [Mus musculus]	+2.3	
NM_017059	Bax	Inducción de apoptosis	Bcl2-associated X protein	+3.5	
NM_022684	Bid	Inducción de apoptosis	BH3 interacting domain death agonist		+1.1
NM_053420	Bnip3	Inducción de apoptosis	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3	+3.3	
NM_024127	Gadd45a	Inducción de apoptosis	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	+18.3	
XM_215421	Foxo3	Inducción de apoptosis y reparación de daño oxidativo	Forkhead box O3	+2.4	
XM_342346	Nfkb1	Regulación positiva o negativa de la apoptosis, proceso inflamatorio y proliferación celular	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	+3.4	
NM_012675	Tnf	Apoptosis, anti-apoptosis, respuesta inflamatoria, diferenciación, proliferación y sobrevivencia celular	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	+2.5	
XM_235061	Cradd	Inducción de apoptosis	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	+2.7	
<b>Ciclo celular</b>					
NM_012923	Ccng1	Regulación positiva del ciclo celular	Cyclin G1	+31.1	
XM_223270	Ccng2	Regulación positiva del ciclo celular	Cyclin G2	+2.9	
NM_052981	Ccnh	Regulación positiva del ciclo celular	Cyclin H	+2.5	
NM_019296	Cdc2	Regulación positiva del ciclo celular	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M		+1.9
NM_053593	Cdk4	Regulación positiva del ciclo celular	Cyclin-dependent kinase 4	+3.0	
XM_225138	Dapk1	Regulación positiva del ciclo celular	Death associated protein kinase 1	+2.0	
NM_031606	Pten	Regulación negativa del ciclo celular	Phosphatase and tensin homolog	+6.8	
NM_080782	Cdkn1a	Regulación negativa del ciclo celular	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	+5.5	
XM_232745	Sfn	Regulación negativa del ciclo celular	Stratifin	+6.7	
NM_032612	Stat1	Regulación negativa del ciclo celular	Signal transducer and activator of transcription 1	+4.2	
NM_022548	Zmat3	Regulación negativa del ciclo celular	Zinc finger, matrin type 3		+1.5

<b>Proliferación y crecimiento celular</b>				
NM_031515	Kras	Regulación positiva o negativa de la proliferación celular	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	+5.5
XM_213418	Ppm1d	Regulación negativa de la proliferación celular	Protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform	+1.3
NM_017259	Btg2	Regulación negativa de la proliferación celular	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	+1.2
NM_012551	Egr1	Regulación del crecimiento celular, proliferación y diferenciación	Early growth response 1	+1.9
XM_236927	Parc	Regulación de la proliferación celular, ciclo celular y apoptosis	P53-associated parkin-like cytoplasmic protein	+1.5
<b>Reparación de ADN</b>				
NM_024148	Apex1	Reparación de ADN	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	+1.7
NM_053354	Dnmt1	Reparación de ADN, silenciamiento genético	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	+9.3
NM_031058	Msh2	Reparación de ADN	MutS homolog 2 (E. coli)	+1.8
NM_022381	Pcna	Reparación de ADN y regulación de la proliferación celular	Proliferating cell nuclear antigen	+4.6
NM_001006999	Xrcc4	Reparación de ADN	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4	+1.2
NM_177419	Xrcc5	Reparación de ADN	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5	+3.2

Los resultados fueron normalizados con genes control y los valores presentan el grado de cambio en el ARN mensajero de ratas tratadas con FND e inducidas con AOM relativo a las ratas AOM-inducidas.

FND: Fracción no digerible; AOM: Azoximetano.

Cuadro 12. Genes inhibidos en tejido de colon distal de ratas tratadas con FND+AOM comparados con el grupo AOM agrupados por función biológica.

	Número de acceso Gene bank	Símbolo	Función biológica	Nombre del gen	Grado de cambio (>2/ inhibición)	Grado de cambio (>1.1/ inhibición)
	<b>Apoptosis</b>					<b>Apoptosis</b>
	NM_016993	Bcl2	Anti-apoptosis	B-cell CLL/lymphoma 2	-3.5	
	NM_023979	Apaf1	Inducción de apoptosis	Apoptotic peptidase activating factor 1		-1.2
	NM_022522	Casp2	Inducción de apoptosis	Caspase 2	-2.9	
	NM_031632	Casp9	Inducción de apoptosis	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase		-1.6
	NM_152937	Fadd	Inducción de apoptosis	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain		-1.3
	NM_012908	Faslg	Inducción de apoptosis	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	-2.0	
	XM_344431	Tnfrsf10b	Inducción de apoptosis	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	-2.0	
	XM_223012	Tp53bp2	Gen relacionado con apoptosis y crecimiento celular	Tumor protein p53 binding protein, 2	-2.3	
	XM_342992	Tp73	Inducción de apoptosis y arresto al ciclo celular	Tumor protein p73	-12.0	
	<b>Ciclo celular</b>					
	NM_001009470	Ccnb2	Regulación positiva del ciclo celular	Cyclin B2		-1.4
	XM_342804	Ccne2	Regulación positiva del ciclo celular	Cyclin E2	-2.6	
	NM_133571	Cdc25a	Regulación positiva del ciclo celular	Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)		-1.2
	XM_226071	Cdc25c	Regulación positiva del ciclo celular	Cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)	-9.2	
	NM_031550	Cdkn2a	Regulación negativa del ciclo celular	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	-2.4	
	NM_080400	Chek1	Regulación negativa del ciclo celular	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)		-1.1
	NM_053677	Chek2	Regulación negativa del ciclo celular	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)		-1.3
	XM_001055762	Rprm	Regulación negativa del ciclo celular	Reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate	-3.3	
	NM_031534	Wt1	Regulación negativa del ciclo celular	Wilms tumor 1	-2.6	
	XM_230765	E2f1	Regulación positiva del ciclo celular y proliferación celular	E2F transcription factor 1	-18.4	
	XM_344434	Rb1	Control del ciclo celular	Retinoblastoma 1		-1.5
	XM_218820	Prc1	Gen relacionado con el ciclo celular	Protein regulator of cytokinesis 1		-1.9
	XM_236275	Atm	Regulación del ciclo celular, detección de daño al ADN y estabilización de p53	Ataxia telangiectasia mutated homolog (human)		-1.4
	NM_031542	Brca2	Regulación del ciclo celular y reparación cromosómica	Breast cancer 2		-1.6
	XM_576312	Ep300	Regulación del ciclo celular y co-activador transcripcional	E1A binding protein p300		-1.5
	<b>Respuesta inflamatoria</b>					
	NM_012589	Il6	Regulación positiva de la proliferación celular y respuesta inflamatoria	Interleukin 6		-1.5
	NM_021835	Jun	Gen relacionado con inflamación, crecimiento celular, proliferación y diferenciación	Jun oncogene	-13.7	

<b>Reparación de ADN</b>					
XM_225045	Lig4	Reparación de ADN	Ligase IV, DNA, ATP-dependent		-1.7
XM_346005	LOC367198	Regulación del ciclo celular y detección de daño al ADN	Similar to Serine/threonine-protein kinase ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein)	-6.8	
XM_578496	RGD1566319	Respuesta al daño al ADN y estrés oxidativo	Similar to Sestrin 2 (Hi95)		-1.7
XM_228273	Rev3l	Reparación de AND	REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta (yeast)		-1.7
<b>Proliferación, crecimiento celular y otros mecanismos</b>					
NM_012514	Brca1	Regulación negativa de la proliferación celular y del ciclo celular	Breast cancer 1		-1.6
XM_215451	Vcan	Regulación positiva de la proliferación celular y anti-apoptosis	Versican	-2.0	
NM_012689	Esr1	Crecimiento celular y diferenciación	Estrogen receptor 1	-2.0	
NM_176079	Myod1	Crecimiento celular y diferenciación	Myogenic differentiation 1	-11.8	
NM_022391	Pttg1	Gen relacionado con el crecimiento celular, proliferación y diferenciación	Pituitary tumor-transforming 1		-1.3
XM_228146	Sirt1	Regulación epigenética de la transcripción	Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 D47(S. cerevisiae)		-1.2

Los resultados fueron normalizados con genes control y los valores presentan el grado de cambio en el ARN mensajero de ratas tratadas con FND e inducidas con AOM relativo a las ratas AOM-inducidas.

FND: Fracción no digerible; AOM: Azoximetano.



En la Figura 32 se muestra las veces que fueron modulados en su expresión los genes analizados en el grupo FND+AOM con respecto al grupo AOM, haciendo hincapié en los genes que fueron regulados por lo menos 2 veces positiva o negativamente. En la Figura 33 se muestran los genes que fueron inducidos en su expresión  $\geq 2$  veces por la FND en el grupo inducido químicamente comparado contra el grupo AOM; mientras que, en la Figura 34 se muestran los genes que fueron inhibidos en su expresión  $\leq 2$  veces por la FND en el grupo inducido con AOM comparado contra el grupo AOM.

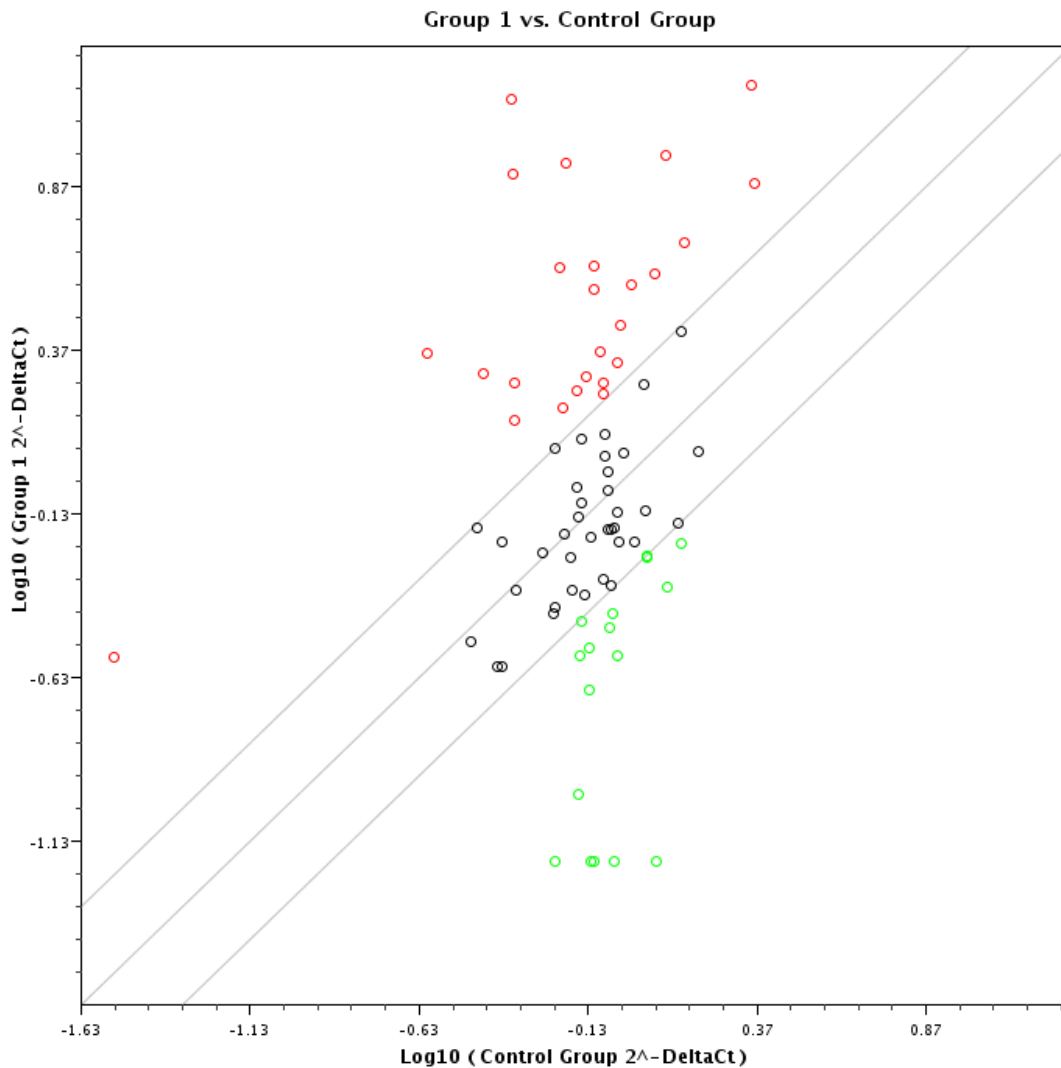


Figura 32. Comparación de las secuencias moduladas positivamente (aros rojos) y negativamente (aros verdes), al menos 2 veces en su expresión, en tejido de colon distal de ratas tratadas con la FND e inducidas con AOM (Grupo 1) con respecto a las ratas inducidas con AOM (Grupo control).

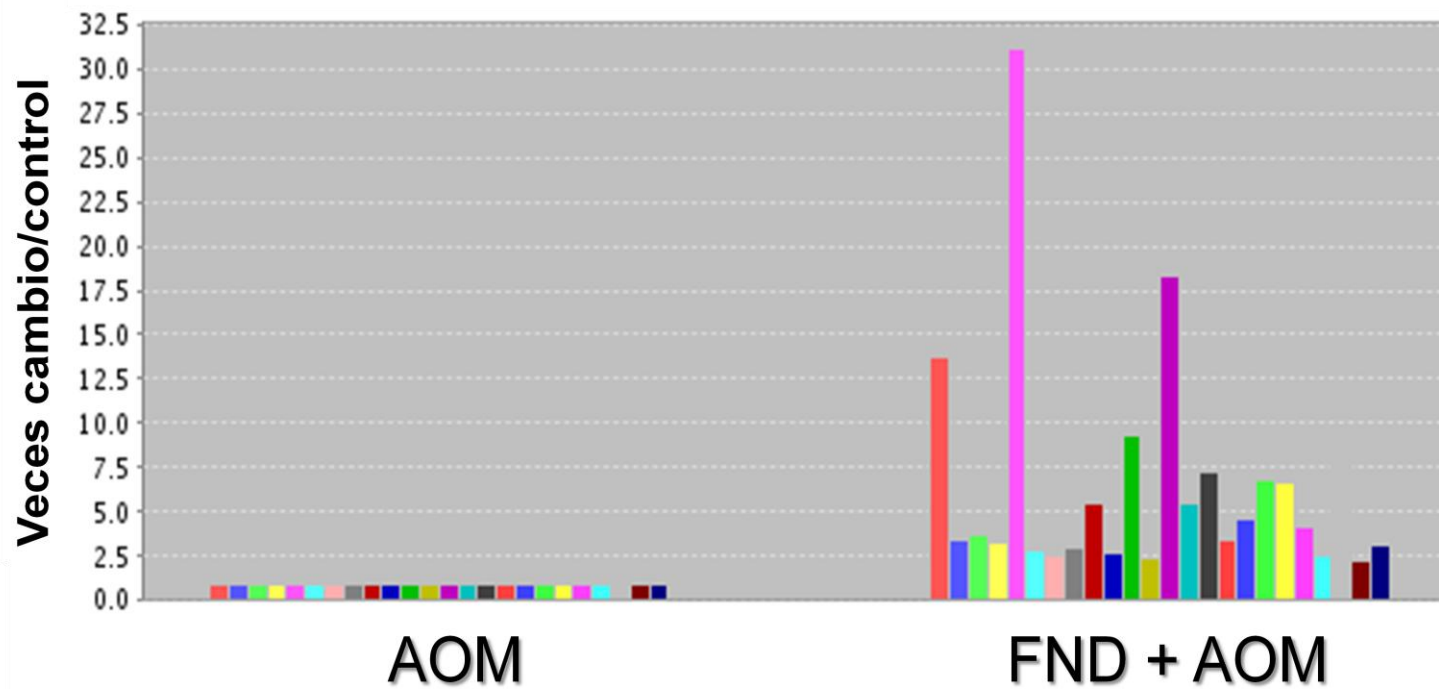


Figura 33. Genes inducidos en su expresión en ratas tratadas con FND e inducidas con AOM respecto al grupo AOM.  
 Nota: se grafican sólo aquellos genes que presentaron una modulación >2.

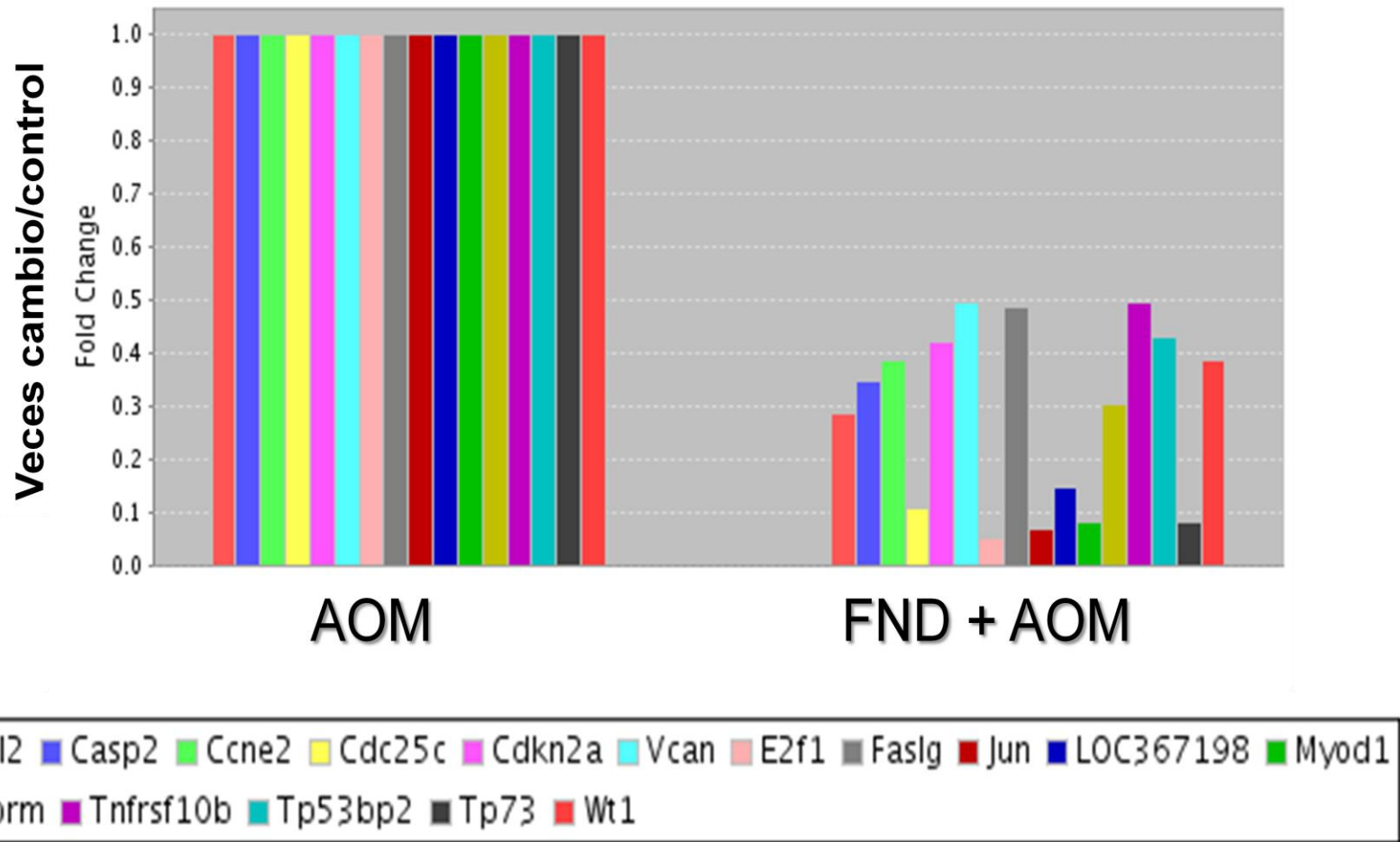


Figura 34. Genes inhibidos en su expresión en ratas tratadas con FND e inducidas con AOM respecto al grupo AOM.  
 Nota: se grafican solo aquellos genes que presentaron una modulación >2.

p53 es un gen supresor de tumor que actúa como un factor de transcripción que se une al ADN de una manera secuencia-específica para activar o suprimir la transcripción de genes blanco involucrados en procesos como apoptosis, ciclo celular, proliferación y crecimiento celular, así como reparación de ADN en condiciones normales o en respuesta al estrés celular o genotóxicos (Ho y Benchimol, 2003; Rahman-Roblick *et al.* 2007). El gen p53 resultó sobreexpresado 9.3 veces en el grupo FND+AOM comparado con el grupo AOM (Cuadro 11). A su vez, algunos genes que participan en el ciclo celular fueron modulados, tal es el caso de Cdkn1a (p21) que fue inducido 5.5 veces en su expresión, mientras Ccne2 (Ciclina E2) y Cdkn2a fueron inhibidos -2.6 y -2.4 veces, respectivamente (Cuadro 11). El incremento observado del RNA mensajero de p21, un inhibidor de Cdk, ha sido mostrado como uno de los principales blancos transcripcionales de p53, lo que en conjunto conduce al primer punto de control en el ciclo celular en la fase G1 (Mahyar-Roemer y Roemer, 2001). Una vez que p53 induce la transcripción de p21, este último actúa inhibiendo a los complejos ciclinas-cdk necesarios para la transición de la fase G1 a S (Damia y Brogini, 2004). La Ciclina E2 es uno de los reguladores más importantes del ciclo celular y su expresión fue inhibida en -2.6 veces por la FND en el presente trabajo. De igual forma, Rb1 (retinoblastoma) y E2f1 fueron inhibidos -1.5 y -18.4 veces, respectivamente (Cuadro 12). El gen retinoblastoma (Rb) codifica a una fosfoproteína nuclear de 105 kD que en estado no fosforilado se liga y suprime al factor de transcripción E2f1, cuya actividad es esencial para la transición G1/S (Fojer y te Riele, 2006). Los resultados sobre la regulación de los genes p21, Ciclina E2, Rb y E2f1 nos sugieren un posible arresto al ciclo celular en la fase G1/S inducido por el tratamiento con FND. El aumento en la expresión de p21 y la inhibición en la expresión de Rb1 concuerdan con los datos mostrados por Feregrino-Pérez *et al.* (2008), quienes sugirieron un arresto al ciclo celular en fase G1 en el colon distal de ratas inducidas con AOM como resultado del tratamiento con extracto de polisacáridos obtenidos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025. Por otro lado, se ha demostrado en diferentes líneas celulares de cáncer de colon humano que los oligosacáridos inducen el arresto al ciclo celular, acompañado de la regulación en la expresión de p21, ciclinas y algunas cinasas (Kuntz *et al.*, 2009). La FND que se utilizó como tratamiento protector en este estudio contiene una considerable cantidad de oligosacáridos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa) cuantificados

por HPLC, por lo que es probable que dichos compuestos participen en un arresto al ciclo celular por la modulación de los genes anteriormente mencionados.

Por otro lado, existe otro gen (metiltransferasa) capaz de reprimir la transcripción de promotores que contienen sitios de unión a E2f1, impidiendo así la transcripción de genes involucrados en proliferación y progresión del ciclo celular (Robertson *et al.*, 2000). Este gen, Dnmt1, resultó 9.3 veces sobre-expresado en el grupo FND+AOM con respecto al grupo AOM (Cuadro 11) y se ha demostrado que tiene la capacidad de formar complejos estables con Rb, E2f1 e Hdac1, participando de esta manera en el arresto al ciclo celular. Sin embargo, Dnmt1 también tiene una función en el silenciamiento de genes por medio de metilación de ADN y uno de los genes que se han visto implicados en la inhibición por este gen es Cdkn2a, lo que concuerda con los datos obtenidos en el arreglo de PCR presentando represión en la expresión (-2.4 veces, Cuadro 12) probablemente por la acción metiladora de Dnmt1 en la región promotora de Cdkn2a. Lo anterior se ha observado en células HC116 donde se determinó que la depleción de Dnmt1 conduce a una pérdida progresiva tiempo-dependiente de la metilación de la región promotora de Cdkn2a (Robert *et al.*, 2003). Además, también resultó inhibida la expresión de Myod1 (-11.8 veces), cuya proteína participa en la apoptosis y diferenciación mediados por PUMA, p21 y miogenina (Harford *et al.*, 2010) y se ha demostrado que puede ser altamente metilado y, por lo tanto, silenciado (Hiranuma *et al.*, 2004; Kawakami *et al.*, 2006).

También se ha informado que p53 disminuye transcripcionalmente la expresión de Cdc25c y Ccnb2 (Ciclina B), ciclina que forma un complejo con Cdc2 para inducir la mitosis, y que dicho bloqueo promueve la inhibición del ciclo celular antes de que la célula entre en proceso de mitosis (Imbriano *et al.*, 2005). En el presente estudio se observó una disminución en la expresión de Ccnb2 de -1.4 veces y de Cdc25c de -9.2 veces (Cuadro 12), resultado que sugiere un arresto al ciclo celular en la fase G2/M. Además, la transcripción de Gadd45a también es activada por p53. Se ha informado que Gadd45a funciona como punto de control en el ciclo celular en la transición de la fase G2 a M contribuyendo a la inhibición de Ccnb2 (Hildesheim y Fornace, 2002) y su expresión fue inducida 18.3 veces en el grupo FND+AOM (Cuadro 11). Igualmente, Gadd45a ha sido

implicado en la reparación de escisión de ADN mediante su interacción con el antígeno nuclear de células en proliferación (Pcna) (Jung *et al.*, 2007), cuya expresión génica incrementó 4.6 veces en el grupo FND+AOM con respecto al grupo AOM (Cuadro 11). Lo anterior sugiere que la sobreexpresión e interacción de ambos confieren un mecanismo importante de protección contra el desarrollo de FCA implicando la reparación del ADN. Por otro lado, Pcna interactúa con enzimas involucradas en la reparación de ADN como Mlh1 y Msh2, quienes inician el proceso de reparación de ADN por reconocimiento de pérdida de bases (Li *et al.*, 2008) y fueron inducidas 1 y 1.8 veces en su expresión por el tratamiento con la FND en comparación con el grupo AOM (Cuadro 11). Además, Xrcc5, gen que participa en la reparación de la ruptura de la doble cadena del ADN uniéndose directamente a la molécula de ADN y reclutando otras proteínas de reparación (Sengupta y Roychoudhury, 2005), fue inducido 3.2 veces por la FND (Cuadro 11). Estos resultados proponen que el tratamiento potencialmente induce la reparación del ADN por medio del sinergismo entre los diferentes genes como un mecanismo alternativo de protección. Campos-Vega *et al.* (2010) determinaron el efecto de la fracción no digerible de frijol Bayo Madero en la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano HT-29 y, a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, obtuvieron una disminución en la expresión de Pcna, Xrcc5, Gadd45a y Mlh1. La diferencia observada presuntamente se debe a los diferentes estadios de cáncer con que se trabajaron en ambos estudios. Dichos autores trabajaron sobre un estadio tardío del cáncer e *in vitro*, mientras que en el presente estudio se evaluó el estadio temprano e *in vivo* en el que la sobreexpresión de estos genes sería muy importante para prevenir o reparar los daños generados por el carcinógeno, evitando así el desarrollo de las siguientes etapas del cáncer en las ratas inducidas con AOM. Sin embargo, dichos autores observaron un aumento en el gen Msh2, que como ya se mencionó es importante para la reparación de ADN, lo que concuerda con lo observado en el presente estudio, sugiriendo que la FND de Bayo Madero induce la reparación de ADN tanto en células de cáncer humano HT-29 como en estadio temprano del cáncer en rata.

El producto del gen Sfn (14-3-3 $\sigma$ ), inducido por p53 en respuesta al daño al ADN, ha sido implicado en el arresto al ciclo celular entre la fase G2 y M y actúa como un gen supresor de tumor en cáncer colorrectal (Hermeking *et al.*, 1997). 14-3-3 $\sigma$  puede unirse e

inhibir a varias cinasas dependientes de ciclinas (Cdk2, Cdc2 y Cdk4) y las Ciclinas B1 y 2 (Laronga *et al.*, 2000), además de inactivar a Cdc25c, el cual fue inhibido por la FND, previniendo la iniciación de la mitosis. Según los resultados obtenidos, 14-3-3 $\sigma$  fue inducido 6.7 veces por el tratamiento FND+AOM comparado con el grupo AOM (Cuadro 11), con lo cual se sugiere que la modulación de este gen podría contribuir junto con Ccnb2, Cdc25c y Gadd45a a un arresto al ciclo celular en la fase G2/M (Luk *et al.*, 2005).

Foxo3 es un gen que transcribe para un factor de transcripción perteneciente a la familia Foxo, quienes median proliferación, sobrevivencia, diferenciación, reparación de ADN y defensa contra el estrés oxidativo (Lam *et al.*, 2006). La expresión del gen Foxo3 aumentó 2.4 veces en el grupo FND+AOM comparada contra el grupo AOM (Cuadro 11). Se ha demostrado que Foxo3 induce la transcripción de los genes Gadd45a, Cdkn1a (p21) y Bnip3 (Greer y Brunet, 2005; Lam *et al.*, 2006). Por lo que la sobreexpresión de estos genes en este estudio pudiera inducirse también por medio de la acción directa de Foxo3, actuando como factor de transcripción o promoviendo la actividad y estabilidad de p53, como se ha mencionado en otros estudios (You *et al.*, 2006).

Ras puede regular los procesos que están normalmente asociados con la adquisición de un fenotipo transformado o que promueven la detención del crecimiento por arresto al ciclo celular y la muerte por apoptosis. El tratamiento con FND aumentó la expresión de Ras 5.5 veces comparado con el grupo AOM (Cuadro 11), probablemente suficiente para inducir la expresión de Cdkn1a (p21) y disminuir la de Cdc25 mediada por Raf (Frame y Balmain, 2000).

p53 también se ha identificado como el más importante factor de transcripción que induce apoptosis mediante la modulación de diferentes genes implicados directa o indirectamente en la inducción de las vía de señalización que finalizan con la muerte celular programada (O'Brate y Giannakakou, 2003). La FND extraída de frijol común variedad Bayo Madero indujo una variedad de genes implicados en apoptosis. Dentro de la vía intrínseca, se indujeron los genes Bax (3.5 veces) y Bnip3 (3.3 veces) (Cuadro 11), genes pro-apoptóticos, quienes a su vez disminuyen actividad del gen anti-apoptótico Bcl2, que

fue inhibido -3.5 veces en su expresión (Cuadro 12), lo que conlleva a una posible despolarización de la membrana mitocondrial induciendo la liberación de citocromo C al citosol con la consecuente inducción de muerte celular por apoptosis (Pawlowski y Kraft, 2000). La relación Bax/Bcl-2 determina la susceptibilidad de una célula a la apoptosis (Bai y Meng, 2005) y Bnip3 inhibe directamente a Bcl-2 después de ser activado por señales intracelulares de muerte (Ray *et al.*, 2000). Una vez que citocromo C se libera al citosol desde la mitocondria, se une con Apaf-1 y Caspasa 9 para formar un complejo llamado apoptosoma, el cual activa a Caspasa 3, enzima que induce otras proteínas y enzimas para que se lleve a cabo la fragmentación de ADN y la muerte celular por apoptosis.

En este estudio, los genes Apaf-1, Casp 2 y Casp 9 fueron inhibidos -1.2, -2.9 y -1.6 veces, respectivamente (Cuadro 12), sugiriendo que la cantidad expresada de estos genes es suficiente para inducir apoptosis o que este proceso de muerte pudiera de igual forma ser llevado a cabo por la acción del citocromo C liberado, pero independiente de la activación de Casp2 y Casp9. Comportamiento que demuestran Marsden *et al.* (2004) quienes concluyen que Casp2 y Casp9 son importantes pero no indispensables para que se concrete la muerte celular por apoptosis en timocitos  $2^{-/-}9^{-/-}$ , ya que las células en proceso de muerte presentan las mismas características de apoptosis como exposición de fosfatidilserina y fragmentación de ADN una vez que son expuestas a irradiación, y que probablemente la muerte implica la acción de otras caspasas.

En la investigación se sugiere que la FND podría desencadenar el proceso de apoptosis por la activación de caspasa 3 directamente a través de citocromo C o por una vía independiente de caspasas, como fue sugerido por Shrivastava *et al.* (2006), quienes reportan que la apoptosis inducida por yodo en células MCF las cuales no expresan una caspasa 3 funcional, es independiente de la activación de caspasas e involucra la pérdida de la polaridad de la membrana mitocondrial, el incremento en la expresión de Bax, disminución de Bcl-2 y la liberación de AIF desde la membrana mitocondrial. La liberación de AIF, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi y Endo G desde la membrana induce muerte celular independientemente de caspasas (Ravagnan *et al.*, 2002).



La inducción de Bax y la inhibición de Bcl-2 por la FND de frijol cocido Bayo Madero concuerda con los resultados observados por Feregrino-Pérez *et al.* (2008) por efecto de los polisacáridos de frijol Negro 8025 en ratas inducidas con AOM. Además, la FND de Bayo Madero indujo 1.1 veces la expresión de Bid con respecto al grupo AOM (Cuadro 11), lo que apunta a que este gen pudiera activar a otras caspasas. La modulación de los genes Bax, Bnip3, Bid y Bcl-2 sugirieron un efecto potencial de la FND de Bayo Madero sobre la activación de muerte celular por apoptosis. Yu *et al.* (2004) demostraron que el ARN mensajero de Bax es sobreexpresado y el de Bcl-2 es inhibido en células HT-29 por genisteína, una isoflavona, en una manera dosis-dependiente. La FND de Bayo Madero contiene compuestos fenólicos y taninos condensados, se ha informado en la literatura que una parte de ellos pueden llegar intactos al colon y presentar efectos protectores sobre las células de dicho órgano (Saura-Calixto *et al.*, 2007).

Por otro lado, la expresión de Fadd y Faslg fue disminuida -1.3 y -2.0 respectivamente (Cuadro 12), con lo que se sugiere que el probable desencadenamiento de apoptosis en el grupo FND+AOM se lleve a cabo en mayor proporción por la vía intrínseca. Además, otra vía de promoción de apoptosis la pudiera estar induciendo Stat1, ya que resultó sobre-expresado 4.2 veces en el grupo FND+AOM (Cuadro 11) y se ha demostrado por otros autores que es un gen importante para desencadenar de manera óptima el proceso de apoptosis a través de múltiples estímulos, como la inducción en la expresión de p21, el cual resultó sobreexpresado en este trabajo, promoviendo así la liberación de citocromo C y activación de caspasa 3 (Agrawal *et al.*, 2002).

La inducción de genes de los diferentes mecanismos moleculares evaluados también puede ser modulada por otros 2 miembros de la superfamilia p53 de factores de transcripción, cuya función es muy similar, aunque no idéntica, a la de p53 (Lin *et al.*, 2009). Estos miembros son Tp73l (p63) y Tp73, los cuales aumentaron 1.3 veces (Cuadro 11) y disminuyeron -12 veces (Cuadro 12) en su expresión, respectivamente, lo que nos sugiere que al menos p63, que resultó sobreexpresado, pudiera contribuir a la inducción de genes de reparación de ADN, realizando los efectos apoptóticos de p53 (Flores *et al.*, 2002) y por lo tanto a la quimioprotección por parte de la FND del frijol.

Pten (gen supresor de tumor) está involucrado en la modulación de la adhesión, migración e invasión celular a través de la inhibición de la proteína adaptadora Shc y de la proteína quinasa de adhesión focal Fak (Tamura *et al.*, 1999; Haier y Nicolson, 2002). Uno de los hallazgos encontrados en este estudio fue precisamente la inducción de Pten 6.8 veces en el grupo FND+AOM comparado contra el grupo AOM (Cuadro 11), lo cual sugiere que el efecto quimioprotector del FND pudiera promoverse evitando la adquisición de un fenotipo invasivo y/o metastático de las células tumorales a través de la inhibición de la migración celular.

Nfkb es un gen clave en la respuesta inmune innata, inflamación y sobrevivencia celular. Sin embargo, se ha documentado que este gen presenta una función paradójica en el sentido de que también ejerce una función pro-apoptótica, bajo ciertas circunstancias, a través de la inducción de algunos genes como receptores de muerte de Tnf (Campbell, 2004) y la inducción en la expresión del gen p53, así como su estabilización, iniciando la cascada de señalización de apoptosis (Fujioka *et al.*, 2004). La FND aumentó la expresión de Nfkb 3.4 veces en ratas inducidas con respecto al grupo AOM (Cuadro 11). A su vez, Tnf resultó inducido 2.5 veces (Cuadro 11) lo que nos sugiere una contribución por parte de Nfkb al desencadenamiento de apoptosis a través de receptores de muerte Tnf y la activación de Bid e indirectamente mediante la activación de la señalización de apoptosis y ciclo celular por medio de la inducción de p53, cuya expresión resultó también inducida en su expresión. Estos datos sugieren que ambos mecanismos podrían ser activados por Nfkb debido a que se está trabajando una etapa temprana de cáncer y, que por este motivo, el gen aún no sufre alguna afectación por mutaciones o aberraciones que bloqueen su actividad pro-apoptótica, adquiriendo una potencial función anti-apoptótica, como sugieren Wu y Miyamoto (2008).

Diversos autores han demostrado que Jun antagoniza la actividad pro-apoptótica y anti-proliferativa de p53 en la etapa de iniciación del desarrollo del cáncer (Maeda y Karin, 2003). La fosforilación de Jun por la cinasa JNK conduce a la activación del factor de transcripción AP-1 y éste a su vez activa a un rango amplio de genes diseñados para

proteger a las células de condiciones ambientales adversas, incluyendo al gen Il6 (Cahill y Rogers, 2008), el cual es normalmente inducido en respuesta inflamatoria (Ahn y Aggarwal, 2005). En este estudio, ambos genes Jun e Il6 fueron inhibidos por la FND -13.7 y -1.5 veces, respectivamente (Cuadro 12), indicando que el tratamiento con FND presumiblemente protege contra una respuesta inflamatoria por inhibición de la vía pro-inflamatoria mediada por Il6 y de esta manera contribuye a la prevención del desarrollo de cáncer de colon.

La respuesta de los tejidos analizados ante la agresión causada por el AOM y la protección promovida por la FND del frijol Bayo Madero, también mostró algunas contradicciones. Tal es el caso de Bag1, el cual es un gen importante para el crecimiento y progresión del tumor (Clemo *et al.*, 2008), y que fue sobre-expresado 13.7 veces en el grupo FND+AOM (Cuadro 11); Birc5 (survivin), importante inhibidor de apoptosis y promotor de la proliferación en cáncer colorectal (Chen *et al.*, 2004), fue inducido 3.7 veces (Cuadro 11); y Rprm, gen que conduce a arresto al ciclo celular entre fase G2 y M, regulando actividad de Cdc2 y Ciclina B1 (Ohki *et al.*, 2000), resultó disminuido en su expresión -3.3 veces (Cuadro 12); entre otros genes. La activación de eventos contradictorios de vías de señalización y el dinámico balance entre estas vías puede ser importante para elegir si una célula sobrevive o se somete a apoptosis. La decisión entre morir o no morir es una cuestión de cada célula individual, pues cada célula responde al daño y logra un equilibrio fisiológico ya sea dirigiéndose a apoptosis o a la sobrevivencia (Iacomino *et al.*, 2001; Nair *et al.*, 2004).

La diferencia en el grado de daño celular es otro parámetro determinante sobre la capacidad de la célula para lograr su reparación. Las células que fueron menos dañadas por el AOM lograron ser mayormente reparadas por la FND a través del arresto en ciclo celular, mientras que, en las mayormente dañadas, la FND las dirigió hacia su muerte por la vía apoptótica. Más aún, la sobreexpresión no esperada de oncogenes y la disminución en la expresión de algunos genes supresores de tumores también puede reflejar el análisis de diferentes tipos celulares a lo largo de la cripta. En la morfogénesis normal del colon los genes involucrados en el ciclo celular y proliferación son mayormente expresados en la

base de la cripta, mientras que los genes que inducen apoptosis son expresados en la superficie de la cripta. Los resultados obtenidos a partir de los arreglos de PCR cuantitativo representan la suma de la expresión de genes a lo largo de la cripta (Kosinski *et al.*, 2007).

Finalmente, es importante señalar que Campos-Vega *et al.* (2010) demostraron que el extracto de la fermentación de la FND del frijol común variedad Bayo Madero induce la muerte celular genéticamente programada, así como también arresto al ciclo celular en las fases G1/S y G2/M en células de adenocarcinoma de colon humano HT-29. Además, demostraron que afecta negativamente el desencadenamiento de procesos inflamatorios, inhibiendo de esta manera la sobrevivencia de las dichas células. Sin embargo, estos autores reportan un perfil de expresión diferente en comparación con los genes del presente estudio, ya que ellos encuentran principalmente una inhibición de p53, el cual se ha reportado mutado y altamente expresado en las células HT-29, y a su vez encontraron disminuidos a Nfkb, Pcna, Bid, Tnf y aumentados Jun, Mdm4, entre otros. Estos datos sugieren, que la diferente modulación de genes encontrada por estos autores en comparación con la observada en este estudio puede ser: a) resultado de la función de cada gen en los diferentes estadios de cáncer analizado, b) inherente al modelo utilizado (*in vitro* vs *in vivo*) y/o c) el origen de las muestras (humano vs rata). Sin embargo, ambos estudios concluyen que el tratamiento con la FND de la misma variedad de frijol induce el desencadenamiento de los mismos mecanismos moleculares pero a través de la modulación de diferentes genes en ambos modelos utilizados (*in vivo* e *in vitro*) y en diferentes etapas del cáncer, reforzando la relevancia de este trabajo.

### **7.3.1 Propuesta del mecanismo de protección de la FND sobre ratas inducidas químicamente.**

Las Figuras 35 y 36 muestran los posibles mecanismos que la FND induce para finalizar con un arresto al ciclo celular en fase G1/S y en G2/M y contribuye a la reparación de ADN en ratas inducidas con AOM, sugiriendo que estos son algunos de los procesos por los cuales la FND proporciona quimioprotección ante el desarrollo de cáncer de colon en

etapas tempranas, es decir, una mezcla de eventos que conllevan a la célula al arresto del ciclo celular.

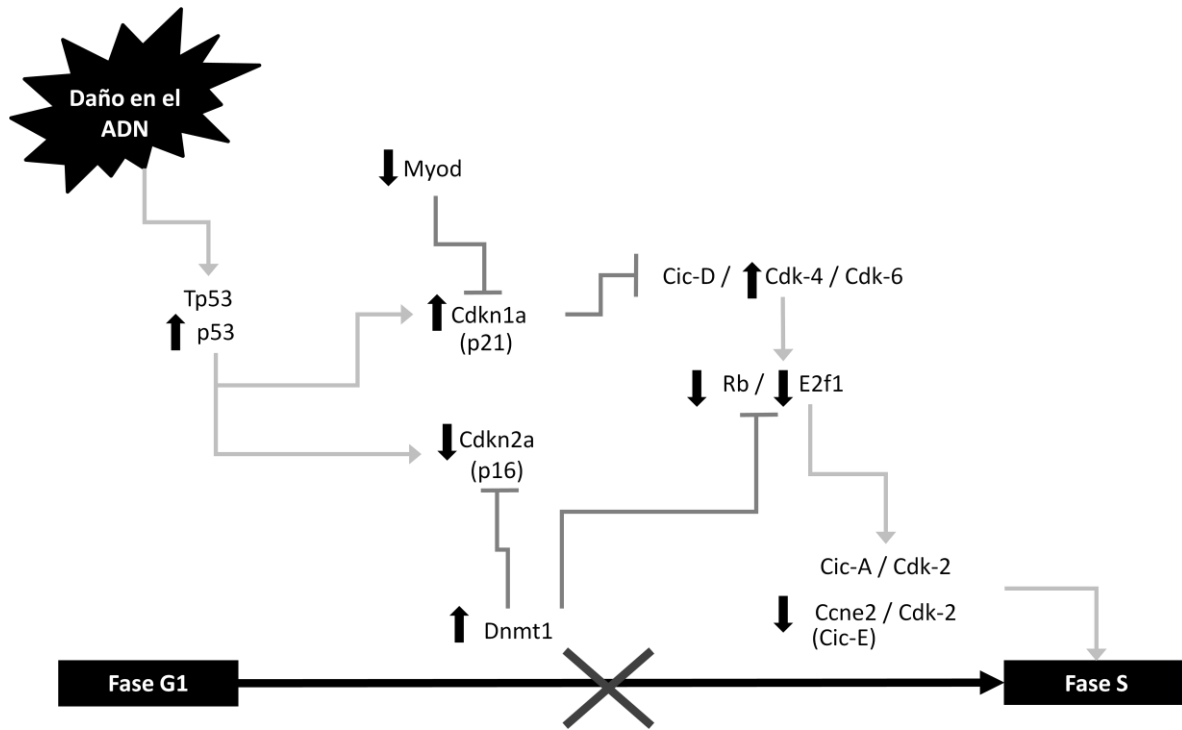


Figura 35. Cambios en la expresión de genes en la fase G1/S del ciclo celular en colon distal de ratas tratadas con FND e inducidas con AOM. Los símbolos indican la inducción (↑), inhibición (↓) en la expresión de ARN mensajero derivado de los análisis, e interrupción de la vía de señalización (X).

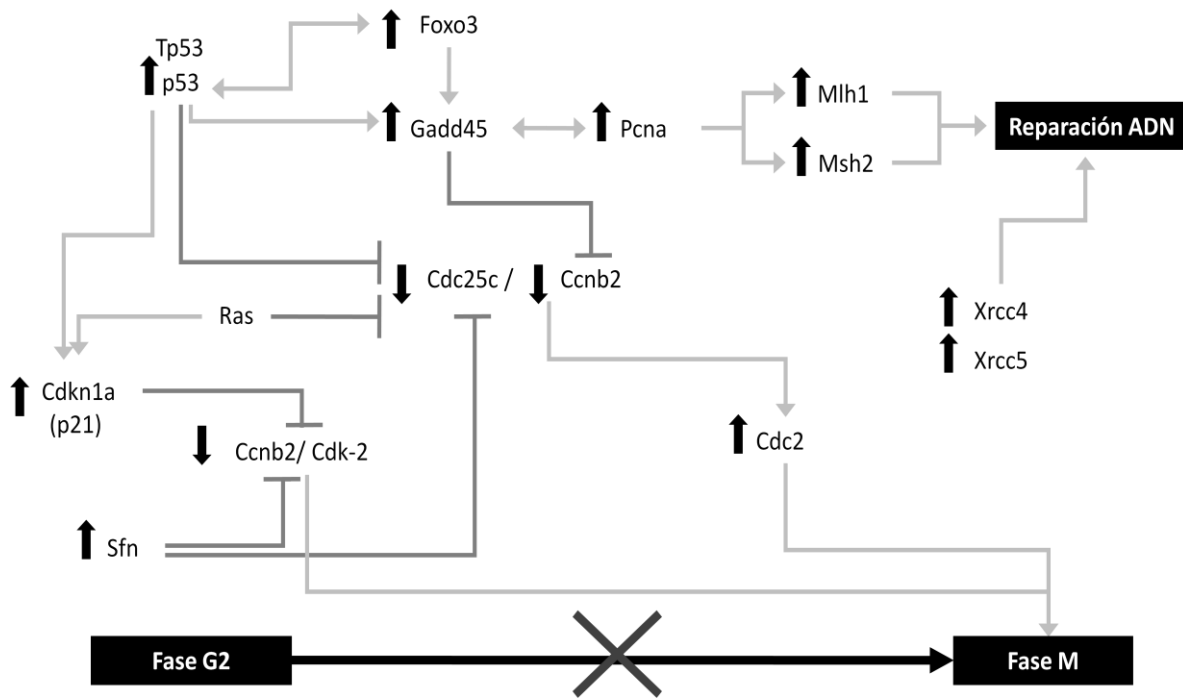


Figura 36. Cambios en la expresión de genes en la fase G2/M del ciclo celular y reparación de ADN en colon distal de ratas tratadas con FND e inducidas con AOM. Los símbolos indican la inducción (↑), inhibición (↓) en la expresión de ARN mensajero derivado de los análisis e interrupción de la vía de señalización (X).

La Figura 37 presenta los genes que resultaron modulados positiva o negativamente en la muerte celular programada e inflamación celular, y por los cuales se sugiere la FND de Bayo Madero quimiprotege al colon distal contra el desarrollo de fosas crípticas aberrantes en ratas inducidas con AOM.

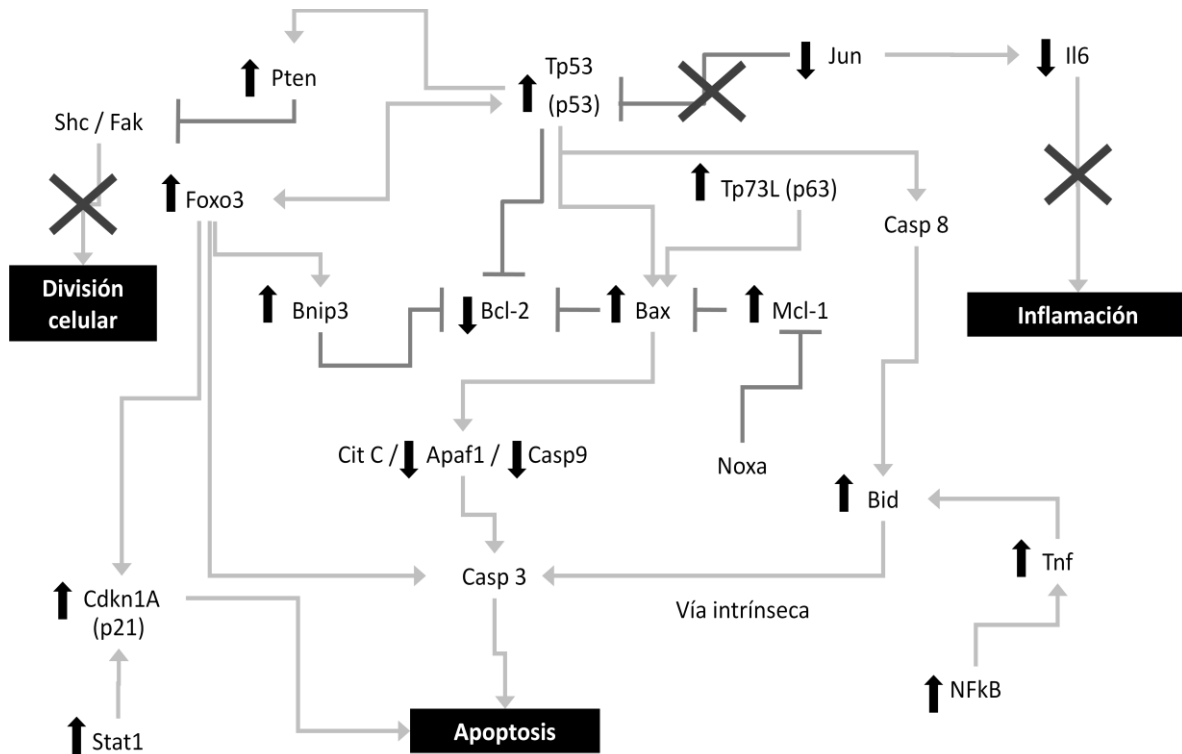


Figura 37. Cambios en la expresión de genes en la cascada de apoptosis e inflamación celular en colon distal de ratas tratadas con FND e inducidas con AOM. Los símbolos indican la inducción (↑), inhibición (↓) en la expresión de ARN mensajero derivado de los análisis e interrupción de la vía de señalización (X).

#### 7.4 Análisis de la expresión proteica en el tejido de colon distal de ratas tratadas con la FND de la variedad Bayo madero e inducidas químicamente con AOM y el grupo AOM.

En base a los resultados obtenidos en la expresión génica, se eligieron algunas proteínas para determinar su expresión con la finalidad de determinar si el mecanismo de acción propuesto a nivel transcripcional era reflejado también a nivel post-transcripcional

##### 7.4.1 Perfil electroforético de proteínas

Las proteínas fueron extraídas a partir del tejido de colon distal de cada grupo de tratamiento y se separaron en un gel de poliácridamida a un voltaje constante. Posteriormente, se visualizaron en un fotodocumentador (Bio Rad, Laboratories)

empleando el software Quantity One (1-D Análisis). El perfil electroforético se muestra en la Figura 38.

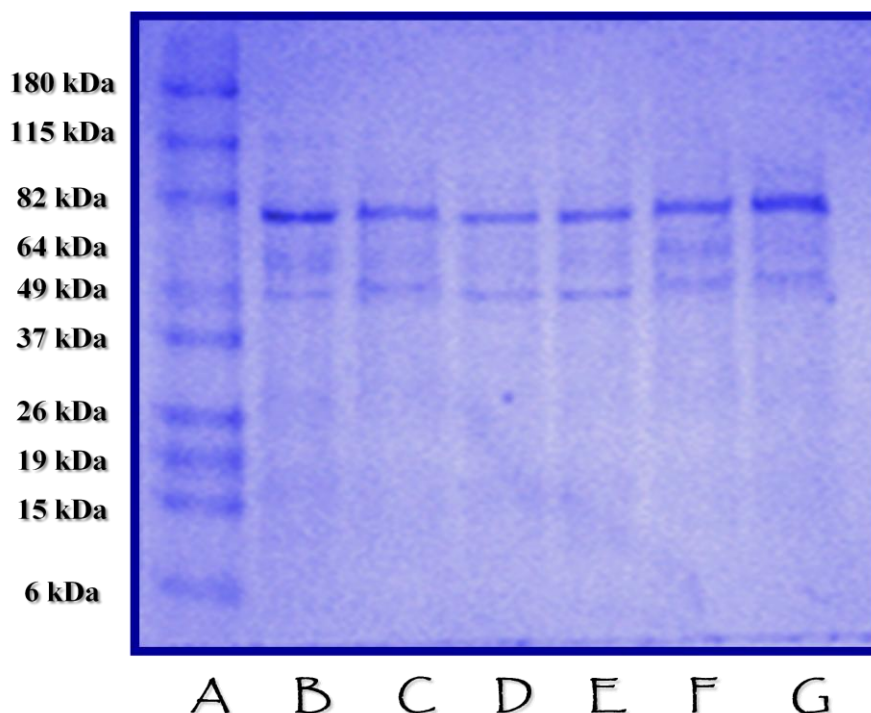


Figura 38. Perfil electroforético de proteínas de los grupos de tratamiento.  
A) Marcador de tamaño molecular; B) Control; C) AOM; D) FC; E) FND; F) FC+AOM; G) FND+AOM.  
FC = Frijol cocido; FND = Fracción no digerible; AOM = Azoximetano.

#### 7.4.2 Influencia de los diferentes tratamientos sobre la expresión de proteínas

En la Figura 39 se muestra la influencia de los diferentes tratamientos sobre la expresión de la proteína Bax.

Bax es una proteína pro-apoptótica que contiene un dominio BH1, BH2 y BH3, reside en el citoplasma celular y responde a un estímulo apoptótico traslocándose a la membrana mitocondrial, formando canales permeables en la misma o interaccionando con las proteínas formadoras de canales provocando la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (Pawlowski y Kraft, 2000). La proteína Bax induce apoptosis por sí



sola mediante la caída en el potencial de membrana mitocondrial y la producción de especies reactivas del oxígeno, que son observados como uno de los primeros eventos en varios sistemas de apoptosis (Xiang *et al.*, 1996).

Los resultados indican que la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax es significativamente mayor en los grupos tratados con FC y la FND e inducidos con AOM comparados con el grupo AOM, lo cual nos sugiere que pudiera estarse activando la muerte celular por apoptosis por medio de la acción de Bax, lo que a su vez se reflejaría en la disminución significativa en el número de FCA de estos grupos de tratamiento.

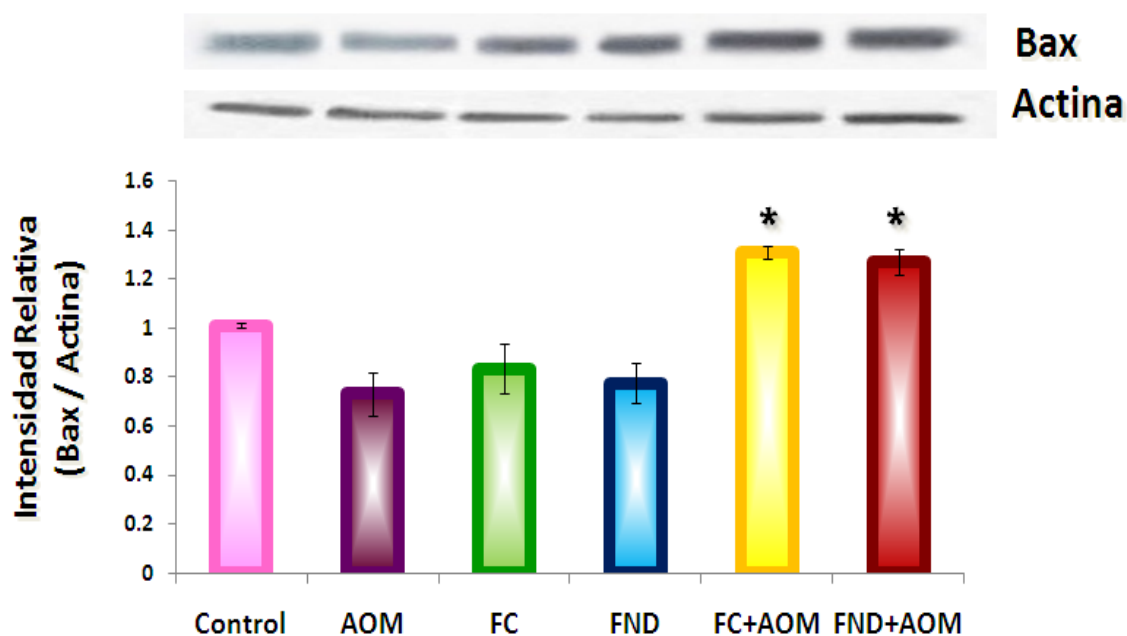


Figura 39. Efecto de FC y la FND sobre la expresión de Bax en estadio temprano de cáncer de colon en ratas inducidas con AOM.

AOM = Azoximetano; FC = Frijol cocido; FND = Fracción no digerible.

Los resultados representan la media por grupo  $\pm$  error estándar.

\* Diferencia significativa contra AOM por la prueba de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ).

A su vez, se encontró que la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 no fue modulada por FC ni por la FND en los grupos inducidos con AOM (Figura 40).

Se ha reportado por diversos autores que la relación entre la expresión de proteínas pro y anti-apoptóticas es importante para que pueda desencadenarse la cascada de caspasas conduciendo a una muerte celular por apoptosis. Song *et al.* (2005) reportaron que la modulación de la proporción entre Bcl-2/Bax y Bcl-X/Bax se correlaciona con la activación de la apoptosis en células HT-29 tratadas con curcumina.

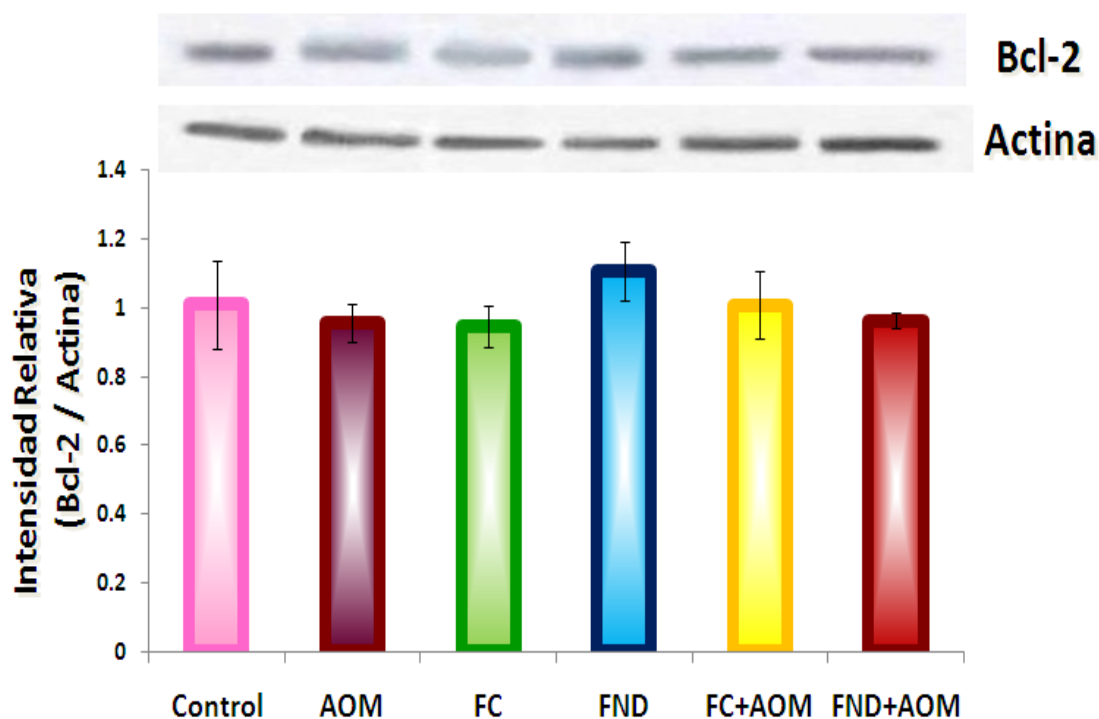


Figura 40. Efecto de FC y la FND sobre la expresión de Bcl-2 en estadio temprano de cáncer de colon en ratas inducidas con AOM.

AOM = Azoximetano; FC = Frijol cocido; FND = Fracción no digerible.

Los resultados representan la media por grupo  $\pm$  error estándar.

\* Diferencia significativa contra AOM por la prueba de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ).

Los resultados en el presente estudio sugieren que el cambio en la expresión de por lo menos Bax, modifica la proporción entre ambas proteínas lo que podría conducir a la activación de apoptosis por vía intrínseca o por sí sola a través de la modificación en el potencial de membrana mitocondrial, como se mencionó anteriormente (Xiang *et al.*, 1996). A su vez se sugiere que pudiera estarse inhibiendo otra proteína anti-apoptótica que no es Bcl-2, por lo cual la expresión de Bax aumenta de manera significativa. Tal y como reportaron Gonzalez de Aguilar *et al.* (2002) y Chen *et al.* (2008), quienes proponen que la

alteración de otra proteína antiapoptótica, Bcl-X altera la proporción con Bax y éste es uno de los factores más importantes para decidir el destino de una célula. También se ha observado en otros estudios que la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-X aumenta de manera significativa en estadios tempranos de cáncer de colon y contribuye a la progresión del mismo. Por el contrario, Bcl-2 disminuye conforme progresa el estadio del cáncer (Krajewska *et al.*, 1996). La FND no moduló la expresión de Bcl-2 en el presente estudio, sin embargo, de acuerdo a los antecedentes, se sugiere que otra proteína, como Bcl-X, puede estar siendo afectada por el tratamiento, resultando en la modificación de la proporción Bax/Bcl-X y así tendría un impacto positivo evitando el desarrollo del cáncer. Desafortunadamente, la expresión de la proteína Bcl-X no fue evaluada por Western blot para corroborar la hipótesis alterna propuesta.

Cabe señalar que el resultado de la expresión post-transcripcional concuerda parcialmente con el resultado obtenido en cuanto a la expresión transcripcional, ya que el gen Bax resultó 3.5 veces inducido en su expresión (Cuadro 11) mientras que Bcl-2 resultó -3.5 veces disminuido en su expresión (Cuadro 12).

En la Figura 43 se muestra la influencia de los diferentes tratamientos sobre la expresión de PcnA.

PcnA (antígeno nuclear de proliferación celular) es una proteína auxiliar de la ADN polimerasa delta que es esencial para la replicación y reparación de ADN, por lo que juega un papel importante en la regulación del ciclo celular y proliferación. PcnA forma un anillo alrededor del ADN para facilitar y controlar la replicación del mismo. Esta proteína también está involucrada en la reparación de daños en el ADN, el mantenimiento de la estructura de la cromatina y en la segregación de cromosomas. La progresión de las horquillas de replicación del ADN puede ser bloqueada por lesiones al ADN o por daños inducidos por agentes endógenos o exógenos, por ejemplo, medicamentos contra el cáncer, resultado en un cambio en la función activa de PcnA (Stoimenov y Helleday 2009). Diversos autores como Guda *et al.* (2007), han relacionado la sobre-expresión de PcnA en ratas inducidas con AOM con una respuesta proliferativa reflejada en el desarrollo de FCA.

Los resultados muestran que la expresión de Pcná disminuyó significativamente con los tratamientos con FC y FND e inducidos con AOM comparados con el grupo AOM (Figura 41). Estos datos indican que Pcná está incluido en los mecanismos moleculares por los cuales el FC y la FND ejercen un efecto quimioprotector en el colon distal de ratas inducidas con AOM. Sin embargo, el resultado de la expresión postranscripcional difiere de lo encontrado a nivel transcripcional, ya que Pcná resultó inducido en su expresión 4.6 veces con respecto al grupo AOM.

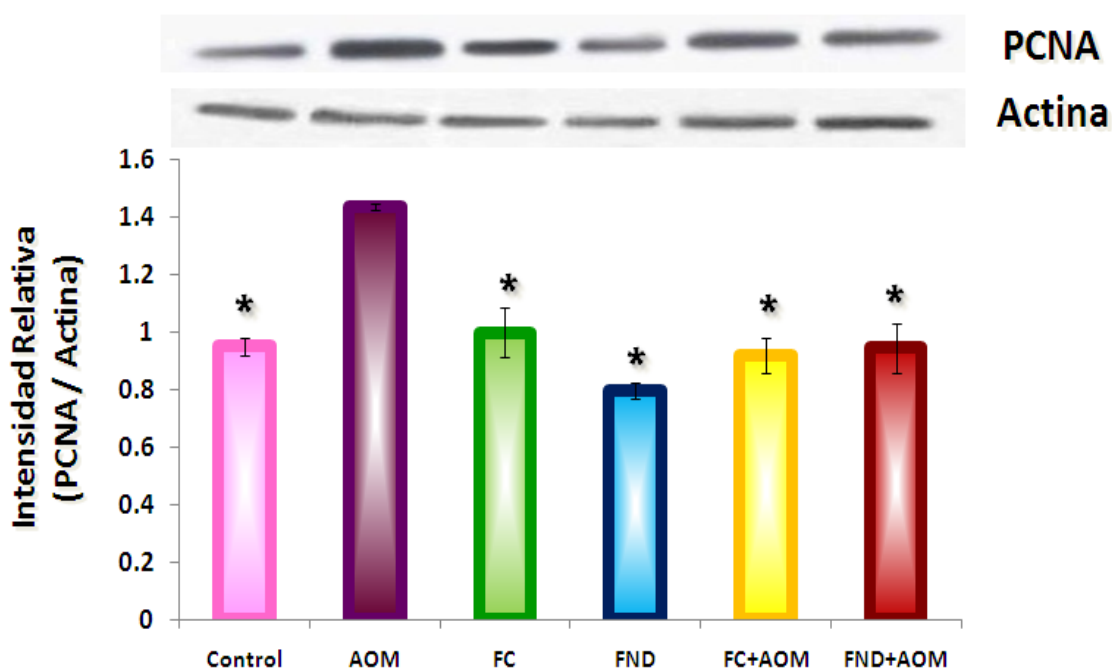


Figura 41. Efecto de FC y la FND sobre la expresión de Pcná en estadio temprano de cáncer de colon en ratas inducidas con AOM.

AOM = Azoximetano; FC = Frijol cocido; FND = Fracción no digerible.

Los resultados representan la media por grupo  $\pm$  error estándar.

\* Diferencia significativa contra AOM por la prueba de Dunnett ( $\alpha= 0.05$ ).

Es bien conocido que existen mecanismos de regulación postranscripcional que controlan la producción adecuada de proteínas que comprenden varios procesos, como procesamiento (poliadenilación, edición, corte y empalme), exportación, eliminación y traducción de ARNm. A nivel traduccional y postraduccional también existen puntos de control para finalmente producir una proteína con una función específica o eliminarla antes

de que sea producida (Hollams *et al.*, 2002; Lackner y Bähler, 2008). Los genes analizados en este estudio presentan esas regulaciones antes de formar la proteína propia de cada gen, por lo que es probable que Pcn, así como otros de los genes examinados, pudieran estar sometidos a una inhibición al momento de expresar finalmente la proteína debido a dichos controles, los cuales son necesarios para que exista un equilibrio y mejor funcionamiento de la célula, lo que explicaría la diferencia encontrada entre ambas expresiones.

Tomando en cuenta que el gen de Pcn resultó inducido, pero a nivel biológico se observó una disminución significativa en el desarrollo de FCA en las ratas inducidas con AOM, así como una disminución en la expresión de la proteína producida por este mismo gen, se puede sugerir que la expresión disminuida de Pcn no está actuando a manera de estimular la proliferación celular, sino que pudiera estar interactuando con otras proteínas, como fue mencionado anteriormente, para reparar errores en el ADN causados por la administración del carcinógeno en las ratas.

### **7.5 Análisis de núcleos apoptóticos por TUNEL**

La apoptosis y los eventos celulares asociados (proliferación y ciclo celular) tienen un efecto en la progresión de un tumor benigno a un fenotipo maligno y pueden utilizarse para el tratamiento de diversos tumores malignos como el cáncer de colon (Schmelz *et al.*, 2007).

La apoptosis es un mecanismo celular programado que juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis del tejido por eliminación de células innecesarias o perjudiciales, y está caracterizado por un conjunto de cambios bioquímicos y morfológicos, que incluye la condensación del citoplasma y compactación de la cromatina, dando lugar a densos agregados que se deslocalizan para situarse dentro de la membrana nuclear y que posteriormente serán degradados por endonucleasas en fragmentos oligonucleosomales de 180 pares de bases o múltiplo de éstos. De forma paralela, tiene lugar la dilatación del retículo endoplásmico dando lugar a la formación de vesículas que confieren a la célula el fenotipo típico de burbujas (zeosis). Por último, la célula se

fragmenta en los denominados cuerpos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos y otras células circundantes gracias a la exposición en superficie de marcadores como la fosfatidilserina, normalmente en la cara interna de la membrana plasmática de la célula íntegra, evitando así la propagación del material intracelular y su exposición al sistema inmune que conllevaría al desarrollo de una respuesta inflamatoria (Hengartner, 2000; Gorodner *et al.*, 2001; Plati *et al.*, 2011). Los cuerpos apoptóticos generados pueden visualizarse por medio del método de TUNEL, a través de una tinción diferencial de los fragmentos de ADN en estado apoptótico.

En base a esta información, se evaluó el efecto de la FND sobre la inducción de la apoptosis mediante la cuantificación de células TUNEL-positivas durante la etapa de iniciación del desarrollo de FCA inducidas con AOM. La Figura 42 muestra el efecto de la FND sobre el número de núcleos apoptóticos de cortes verticales de la zona distal del colon de ratas inducidas con AOM por medio de la técnica de TUNEL. En la Figura 43 se muestra fotografías que ejemplifican los núcleos apoptóticos visualizados bajo microscopio óptico.

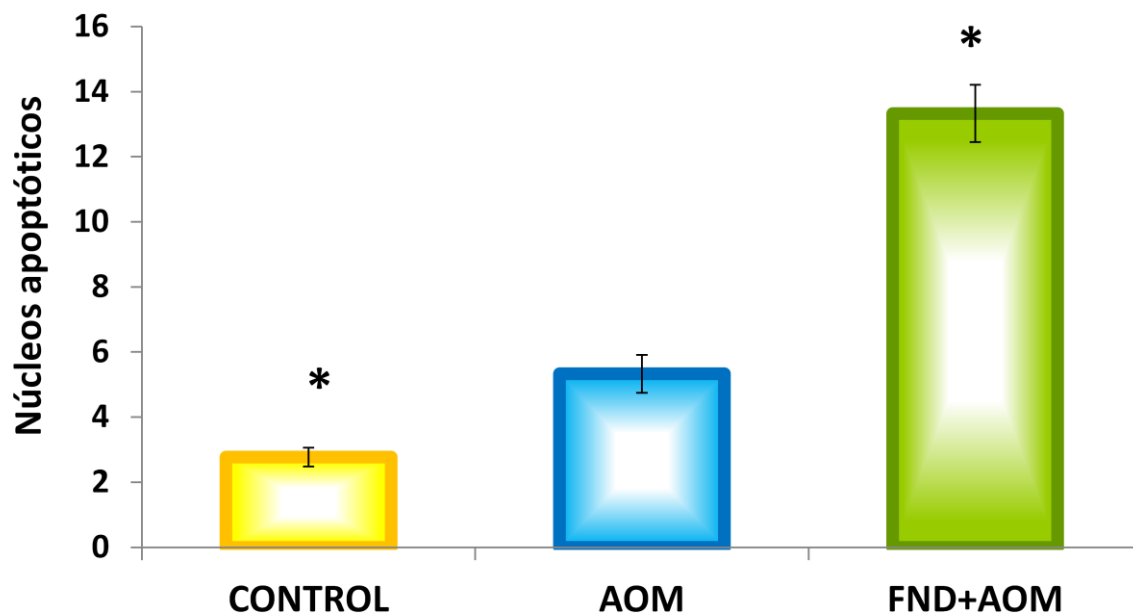


Figura 42. Núcleos apoptóticos evaluados por la técnica de TUNEL en colon distal de rata del grupo Control, AOM y grupo tratado con FND e inducido con AOM.

FND = Fracción no digerible; AOM = Azoximetano.

Los resultados representan la media de 6 campos visuales por rata (3 ratas por grupo) de cortes de tejido de colon distal  $\pm$  error estándar.

\* Diferencia significativa con respecto al grupo AOM por la prueba de Dunnett ( $\alpha = 0.05$ ).

El resultado evidencia que el grupo FND+AOM presenta significativamente mayor número de núcleos apoptóticos en colon distal que las ratas del grupo Control y que las ratas únicamente inducidas químicamente con AOM, dato que corrobora los resultados obtenidos mediante el análisis genético molecular a través de los arreglos de PCR cuantitativo, en el que se demostró que el tratamiento con FND induce la expresión de genes que participan en promoción de muerte celular por apoptosis vía intrínseca y también concuerda con la expresión de Bax y Bcl-2, ambas proteínas implicadas en el desencadenamiento de apoptosis. De esta manera, se refuerza la idea de que la FND utiliza la inducción de apoptosis y posterior fragmentación de ADN como mecanismos moleculares importantes para la inhibición del desarrollo de FCA inducidas con AOM en colon de rata.

Estos resultados concuerdan con lo anteriormente observado dentro del grupo de trabajo (Feregrino, 2009) en un modelo igualmente de estadio temprano de cáncer de colon en ratas inducidas con AOM. El estudio demostró que el extracto de polisacáridos de frijol común cultivar Negro 8025 incrementó significativamente el número de núcleos apoptóticos en zona proximal y distal del colon de ratas inducidas con AOM en comparación con las ratas del grupo AOM, y a su vez estos datos fueron corroborados con la sobreexpresión de caspasa-3 en ambas zonas del colon.

De igual forma, Campos (2010) reportó cambios o alteraciones morfológicas compatibles con células que han sufrido apoptosis en células de adenocarcinoma de colon humano HT-29 como efecto del extracto de la fermentación de frijol común Bayo Madero en comparación con células no tratadas. Estos cambios incluyeron reducción de los volúmenes citoplasmáticos (coloración rosa claro, eosina), núcleos fuertemente teñidos (rosa oscuro, hematoxilina) y picnóticos (núcleos pequeños, puntiformes, generados por la retracción del núcleo y condensación de la cromatina). Además, se observó la presencia de estructuras eosinófilas homogéneas de diferentes tamaños, esféricas, de contornos lisos, que corresponden a fragmentos citoplasmáticos de células apoptóticas. El estudio fue desarrollado en una etapa tardía de cáncer y en un sistema *in vitro*, por lo que los resultados

obtenidos en el presente trabajo, realizado en estadio temprano del cáncer y en un modelo *in vivo*, permite una complementación y corroboración de que el frijol común variedad Bayo Madero contribuye a la inhibición del desarrollo de cáncer utilizando a la apoptosis como un mecanismo de quimioprotección.

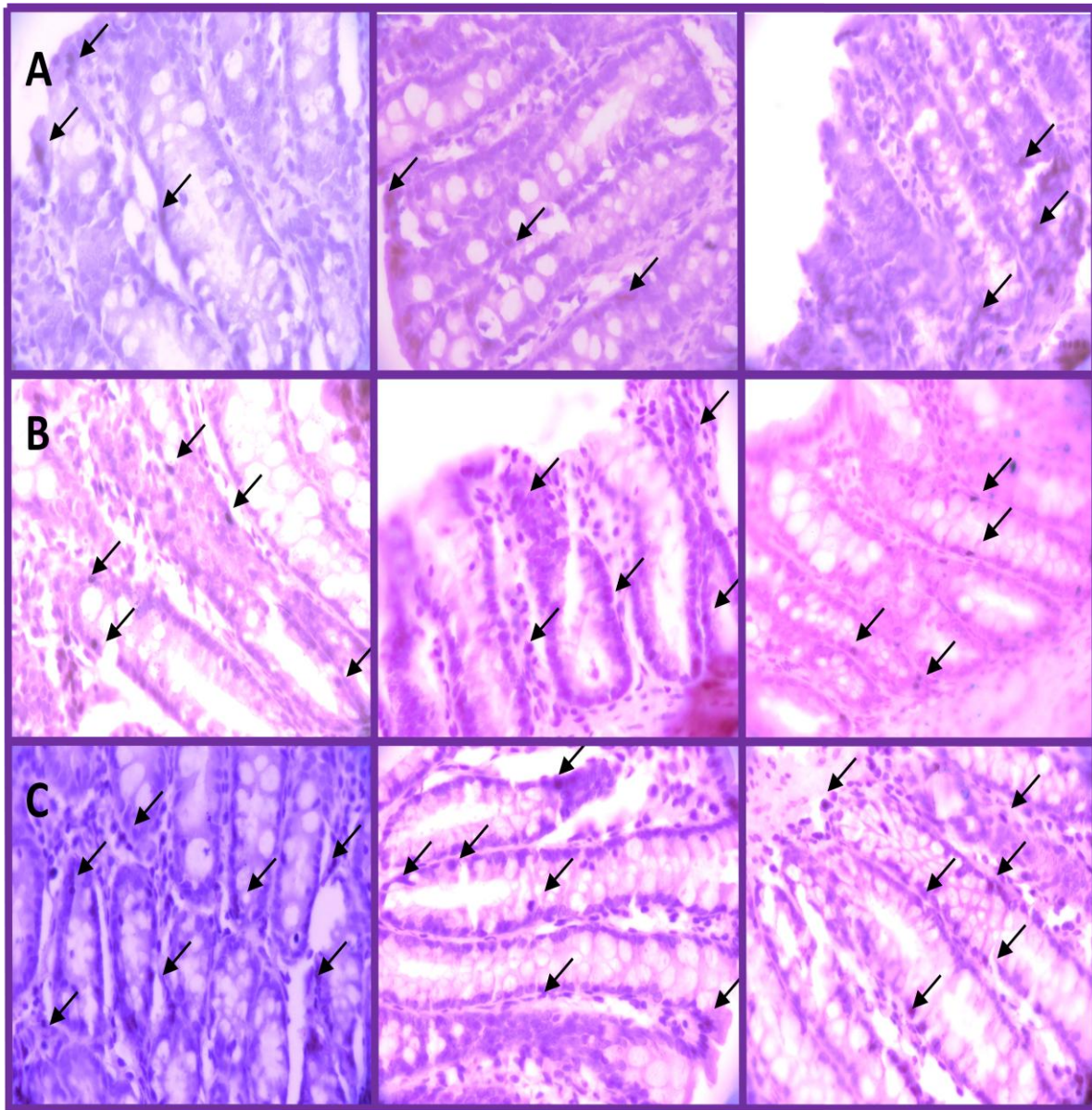


Figura 43. Fotografías representativas de núcleos apoptóticos evaluados por la técnica de TUNEL (40x). A) Control; B) AOM; C) FND+AOM. Algunos de los núcleos apoptóticos identificados son indicados mediante flechas.



Por otra parte, tanto el grupo AOM como el grupo Control muestran núcleos apoptóticos en los cortes de tejido de colon como se muestra en la Figura 43. La renovación de células epiteliales en el colon es rápida y prácticamente todas las células, excepto las células madre, se sustituyen en un periodo menor a una semana, lo que supone un proceso constante de regeneración de las células que constituyen las criptas (Kim y Shibata, 2002). Por lo tanto, la visualización de núcleos apoptóticos en ambos grupos era un resultado esperado como parte de la fisiología normal del tejido. A su vez, el grupo AOM presenta un incremento en el número de núcleos apoptóticos con respecto al grupo Control, lo cual nos podría sugerir que el tejido, al haber recibido una agresión por el carcinógeno, está tratando de eliminar las células que han sido dañadas a través de la activación del proceso apoptótico, pero lo realiza de una manera menos eficiente que el tejido que fue tratado con la FND, quien brinda una protección extra a la defensa natural del tejido.

#### **7.6 Propuesta del mecanismo de acción general de la FND sobre ratas inducidas con AOM.**

La Figura 44 ilustra el posible mecanismo de acción de la fracción no digerible de frijol común cocido de la variedad Bayo Madero sobre ratas inducidas con AOM.

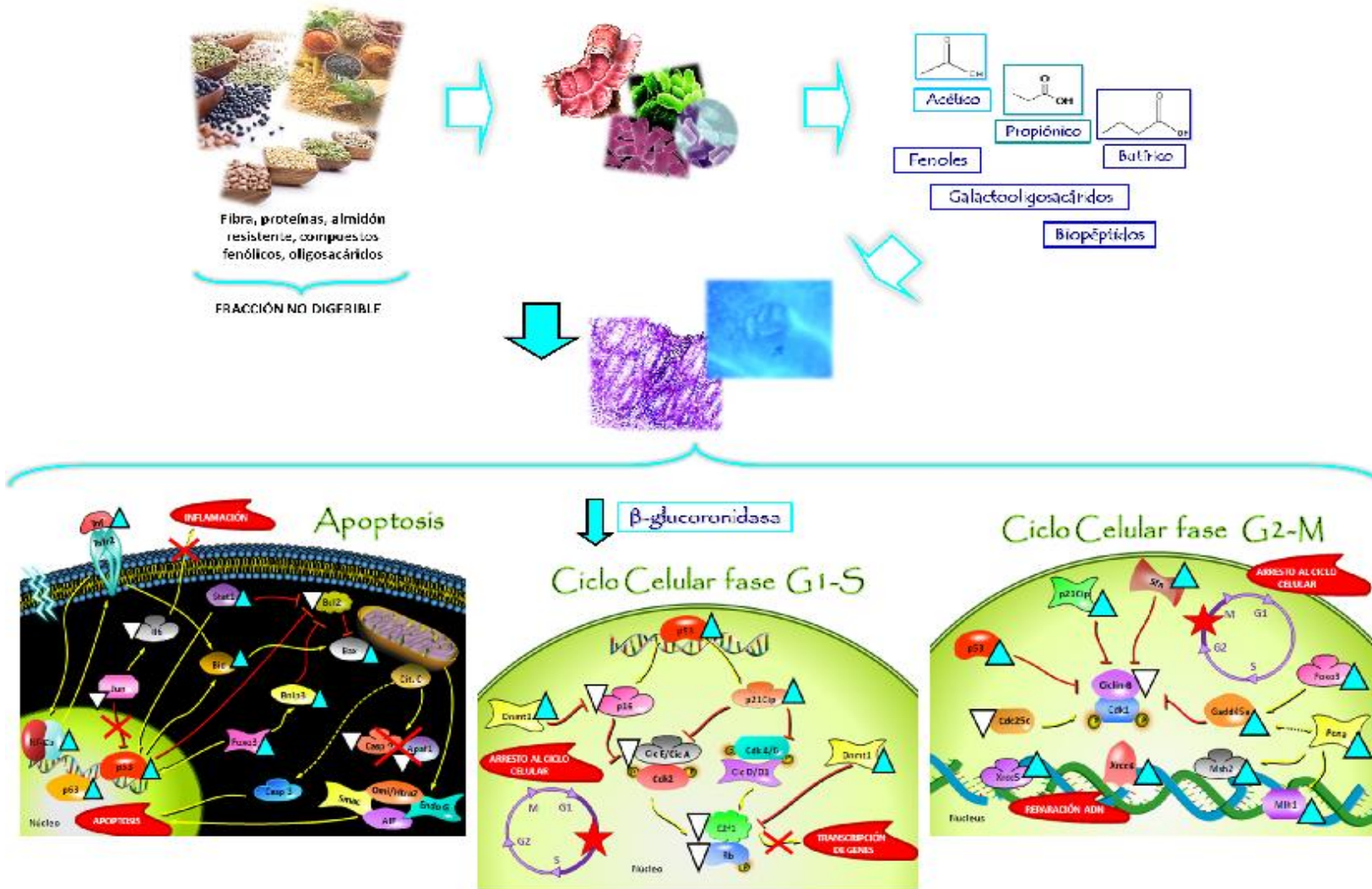


Figura 44. Mecanismo de acción de la FND sobre ratas inducidas con AOM.

La fracción no digerible del frijol común cocido puede ser fermentada en el colon por las bacterias que ahí residen. De esta manera, se generan y/o derivan algunos compuestos bioactivos que disminuyen la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, implicada en la reactivación de carcinógenos en colon, y por lo tanto, en la inducción del desarrollo del cáncer en este órgano. A su vez, dichos compuestos también disminuyen de manera importante el desarrollo de las primeras lesiones encontradas en la carcinogénesis de colon conocidas como fosas crípticas aberrantes. Ambas respuestas protectoras de los compuestos bioactivos se llevan a cabo por la modulación de genes y proteínas involucrados en el arresto al ciclo celular, fases G1-S y G2-M, inducción de apoptosis, inhibición de procesos inflamatorios y promoviendo la reparación de ADN ante el daño ejercido por el carcinógeno.

Dentro de los compuestos bioactivos identificados como posibles participantes del efecto protector de la FND se incluyen los compuestos fenólicos totales, taninos condensados, fibra soluble e insoluble, almidón resistente, proteínas, oligosacáridos y en menor medida AGCC. Los productos de la fermentación de estos compuestos o el compuesto como tal, podrían participar en la inducción de apoptosis a través de la inducción en la expresión de p53, quien a su vez induce transcripcionalmente al gen pro-apoptótico Bax y éste induce la salida de citocromo C al citosol, además de otras proteínas pro-apoptóticas como Smac/DIABLO, Aif, Endo G y Omi/Htra2. Estas proteínas podrían, por un lado, activar a caspasa 3 y por otro, actuar directamente en la fragmentación del ADN en el núcleo produciendo la muerte celular por apoptosis vía intrínseca. Este mecanismo se refuerza con la disminución en la expresión del gen anti-apoptótico Bcl-2, que también es un blanco transcripcional de p53. Otros genes inducidos por la FND y relacionados con la disminución en la expresión de Bcl-2 son Stat1 y Bnip3. Además de esta función, Stat1 activa a p53 estabilizándolo en núcleo y Bnip3 es blanco transcripcional de Foxo3, que también activa a p53 y mostró inducción transcripcional por la FND.

La apoptosis por vía intrínseca probablemente a su vez fue inducida por la FND a través de receptores de muerte de la membrana celular. La FND indujo la expresión de Tnf y Bid, y éste último gen conecta y realza los efectos pro-apoptóticos de Bax, conduciendo

de esta manera al desencadenamiento de la muerte celular por apoptosis. Esta misma vía puede ser activada por el incremento en la expresión de Nfkb, inducida por la FND, quien a su vez promueve la expresión de receptores de muerte en la membrana y potencia la activación del proceso apoptótico, además de inducir indirectamente la expresión transcripcional de p53. El resultado de los procesos apoptóticos activados por la modulación de los genes anteriormente mencionados, puede ser claramente visualizado a través de la aparición de núcleos apoptóticos en el colon distal de las ratas tratadas con la FND e inducidas con AOM.

La FND posiblemente participa en la inhibición de la activación del proceso inflamatorio a través de la inhibición transcripcional de Jun e Il6, genes importantes que participan en esta vía. Además, la FND presumiblemente participa en el arresto al ciclo celular en la fase G1-S a través de la inducción transcripcional de p53 y p21, mismos que regularon negativamente la expresión de Ciclina E, evitando de esta manera la actividad de fosforilación del complejo Ckd/Ciclina y con ello impidiendo la fosforilación de Rb. A su vez, la FND disminuyó la expresión de Rb y de E2f1, evitando así la transcripción de genes que participan en la síntesis de ADN para que el ciclo celular transcurra normalmente y generando un arresto al ciclo celular en esta fase. Dnmt1 también fue inducido por la FND, contribuyendo a la inhibición del complejo E2f1/Rb y por lo tanto generando el arresto al ciclo celular en fase G1-S.

Otro mecanismo de acción de la FND propuesto es el que respecta a la inducción del arresto al ciclo celular en la fase G2-M. Una vez que la FND indujo la expresión de p53, se disminuyó la expresión de Ciclina B y de Cdc25a, que son reguladores positivos importantes de esta fase del ciclo celular, por lo que la disminución en su expresión implicaría un arresto al ciclo en esta fase. Asimismo, la FND indujo la expresión de Sfn y p21 (mencionado anteriormente), quienes actúan inhibiendo al complejo formado por Ciclina-B/Cdk1, contribuyendo así al arresto al ciclo celular. Otro inhibidor de dicho complejo es Gadd45a, quien resultó inducido por la FDN en este estudio. Este mismo gen, participa en la reparación de ADN a través de su interacción con Pcna, quien a su vez interactúa con los genes reparadores de ADN por reconocimiento de pérdida de bases Mlh1

y Msh2. Tanto PcnA, Mlh1 y Msh2 resultaron inducidos en su expresión por la FND. Finalmente, los genes Xrcc4 y Xrcc5, que también actúan en la reparación de ADN por ruptura de doble cadena, resultaron inducidos por la FND, proponiendo a través de los resultados obtenidos la potencial inducción del tratamiento con FND de frijol común sobre la reparación de ADN como un mecanismo alternativo de protección.

## 8. CONCLUSIONES

Las variedades de frijol común Pinto Durango y Bayo Madero son una fuente adecuada de compuestos bioactivos como proteína, grasa, fibra total (soluble e insoluble), fenoles totales, taninos condensados y oligosacáridos en muestras crudas y cocidas. Sin embargo, el frijol Bayo Madero presentó un porcentaje mayor de los componentes indigeribles comparado con Pinto Durango, por lo que representó un mejor candidato para utilizarse en la fase experimental *in vivo*. Bayo Madero presenta un rendimiento importante de fracción no digerible, almidón resistente, fenoles totales, taninos condensados, fibra, oligosacáridos, proteína y digestibilidad de la misma.

Los resultados obtenidos del experimento *in vivo*, proveen evidencia de que la dosis de frijol cocido (FC) y la fracción no digerible (FND) basada en el consumo *per cápita* rural, disminuye el desarrollo de fosas crípticas aberrantes en colon distal en ratas inducidas con AOM en etapas tempranas del cáncer de colon, sugiriendo que uno de los posibles mecanismos de quimioprotección por parte de los tratamientos es por medio de la inhibición de la actividad enzimática de  $\beta$ -glucuronidasa, probablemente por la alteración de las actividades metabólicas de la microflora intestinal que previene la liberación del AOM del metabolito conjugado a nivel del colon. A su vez, se propone que la presencia y actividad de otros componentes de la FND como compuestos fenólicos, galactooligosacáridos y probablemente péptidos con actividad biológica, puede influir en la prevención del desarrollo de FCA. Los resultados indican que ambos grupos de tratamiento (FC+AOM y FND+AOM) presentaron la misma tendencia de quimioprotección en las ratas inducidas químicamente, con lo que se sugiere que la FND contribuye con un porcentaje elevado en el efecto inhibitorio global del desarrollo de FCA del frijol común completo.

Este estudio describe los cambios transcripcionales y, en casos específicos, post-transcripcionales en ratas inducidas con AOM en respuesta al tratamiento con la FND del frijol común de la variedad Bayo Madero y se integran dichas expresiones con diversos procesos fisiológicos.

El efecto quimioprotector de la FND en ratas inducidas con AOM podría ser mediado por el arresto al ciclo celular en la fase G1-S (inducción de p53, p21, Dnmt1 e inhibición de Ciclina-E, E2f1 y Rb), en la fase G2-M (inducción de p53, p21, Sfn, Gadd45a, Foxo3 e inhibición de Ciclina-B y Cdc25c), desencadenamiento de apoptosis (inducción de p53, p63, Bax, Foxo3, Bnip3, Bid, Stat1, Nfkb, Tnf e inhibición de Bcl-2), inhibición de procesos inflamatorios (inhibición de Jun e Il6) y reparación de ADN (inducción de Gadd45a, Pcna, Mlh1, Msh2, Xrcc4 y Xrcc5), entre otros.

La inducción de los diferentes mecanismos moleculares como apoptosis, arresto al ciclo celular en ambas fases, reparación de ADN y regulación de la proliferación e inflamación celular, ha sido observada como efecto de la FND de frijol Bayo Madero en un estadio tardío de cáncer de colon (células HT-29), en un modelo *in vitro*, a través de la modulación de genes diferentes a los modulados en el presente estudio. El resultado de los estudios en conjunto, muestra clara evidencia de que la FND de frijol Bayo Madero quimioprotege el desarrollo del estadio temprano y tardío de cáncer y en ambos modelos biológicos evaluados a través de la inducción de similares vías de señalización.

En conclusión, este trabajo propone las bases científicas por las cuales la fracción no digerible del frijol común variedad Bayo Madero ejerce un efecto quimioprotector contra el desarrollo de cáncer de colon en ratas inducidas con un carcinógeno específico para dicho órgano modulando diferentes mecanismos moleculares.

## 9. LITERATURA CITADA

- Agrawal, S., Agarwal, M.L., Chatterjee-Kishore, M., Stark, G.R., and Chisolm, G.M. 2002. Stat1-dependent, p53-independent expression of p21waf1 modulates oxysterol-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 22, 1981–1992.
- American Cancer Society. 2010. [www.cancer.org](http://www.cancer.org)
- Ahn, K.S., and Aggarwal, B.B. 2005. Transcription factor NF- $\kappa$ B. A sensor for smoke and stress signals. *Ann NY Acad Sci.* 1056, 218–233.
- Akkiprik, M., Ataizi-Celikel, C., Düsünceli, F., Sönmez, O., Güllüodlu, BM., Sav, A., and Özer, A. 2007. Clinical significance of *p53*, *K-ras* and *DCC* gene alterations in the stage I-II colorectal cancers. *J Gastrointestin Liver Dis.* 16(1): 11-17.
- Alabaster, O., Tang, Z., and Shivapurkar, N. 1996. Dietary fiber and the chemopreventive modulation of colon carcinogenesis. *Mutat Res.* 350: 185- 197
- Alberts, B., Jonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. 2004a. Cap 17: El ciclo celular y la muerte celular programada. En *Biología molecular de la célula*. 4<sup>a</sup> Ed. Ediciones Omega. Barcelona. Pp: 983-1026.
- Alberts, B., Jonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. 2004b. Cap 23: Cáncer. En *Biología molecular de la célula*. 4<sup>a</sup> Ed. Ediciones Omega. Barcelona. Pp: 1313-1362.
- Andera, L. 2009. Signaling activated by the death receptors of the Tnfr family. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 153(3):173–180.
- Anderson, J.W., Johnstone, B.M., and Cook-Newell, M.E. 1995. Metaanalysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *New Engl J Med.* 333: 276–282.
- AOAC, 2002. *Official Methods of Analysis* (17<sup>th</sup> ed). Association of Official Analytical Chemist. Washington, DC. EEUU. Método: 920.105, 925.23, 945.46, 991.43.
- Aparicio-Fernández, X.O., Manzo-Bonilla, L., and Loarca-Piña, GF. 2005. Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans *Phaseolus vulgaris* against aflatoxin B<sub>1</sub>. *J Food Sci.* 70(1): 73-78.
- Arimochi, H., Kataoka, K., Kuwahara, T., Nakayama, H., Misawa, N., and Ohnishi, Y. 1999. Effects of beta-glucuronidase-deficient and lycopene-producing *Escherichia coli* strains on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Biochem Biophys Res Commun.* 262(2): 322-7.



- Augenlicht, L.H., Mariadason, J.M., Wilson, A., Arango, D., Yang, W.C., Heerdt, B.G., and Velcich, A. 2002. Short chain fatty acids and colon cancer. *J. Nutr.* 132:3804S-3808S.
- Avivi-Green, C., Polak-Charcon, S., Madar, Z., and Schwartz, B. 2002. Different molecular events account for butyrate-induced apoptosis in two human colon cancer cell lines. *J. Nutr.* 132:1812-1818.
- Baetu, T.M., Kwon, H., Sharma, S., Grandvaux, N., and Hiscott, J. 2001. Disruption of NF- $\kappa$ B signaling reveals a novel role for NF- $\kappa$ B in the regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand expression. *J Immunol.* 167: 3164-73.
- Bai, J., and Meng, Z. 2005. Expression of apoptosis-related genes in livers from rats exposed to sulfur dioxide. *Toxicology.* 216: 253–260.
- Ballesteros, C.D., González, P.A., Riascos, O.M.R., and Zambrano, T.H.I. 2007. Protein p53: Signaling pathways and role in carcinogenesis: a review. *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac.* 7:37-54.
- Barkett, M., and Gilmore, T.D. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene.* 18: 6910 – 6924.
- Bednar, G.E., Patil, A.R., Murray, S.M., Grieshop, C.M., Merchen, N.R., and Fahey, G.C. Jr. 2001. Starch and fiber fractions in selected food and feed ingredients affect their small intestinal digestibility and fermentability and their large bowel fermentability *in vitro* in a canine model. *J. Nutr.* 131: 276–286.
- Beninger, C.W., and Hosfield, G.L. 1999. Flavonol glycosides from Monthcarm dark red kidney bean: Implications for the genetics of seed coat color in *Phaseolus vulgaris* L. *J Agric Food Chem.* 47: 4079-4082.
- Bingham, S.A., Norat, T., Moskal, A., Ferrari, P., Slimani, N., Clavel-Chapelon, F., Kesse, E., Nieters, A., Boeing, H., Tjønneland, A., Overvad, K., Martinez, C., Dorronsoro, M., González, C.A., Ardanaz, E., Navarro, C., Quirós, J.R., Key, T.J., Day, N.E., Trichopoulou, A., Naska, A., Krogh, V., Tumino, R., Palli, D., Panico, S., Vineis, P., Bueno-de-Mesquita, H.B., Ocké, M.C., Peeters, P.H.M., Berglund, G., Hallmans, G., Lund, E., Skeie, G., Kaaks, R., and Riboli, E. 2005. Is the association with fiber from foods in colorectal cancer confounded by folate intake? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14(6): 1552-1556.
- 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, R.P., and Good, C.K. 2000. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol Lett.* 112–113: 395–402.

- Bissahoyo, A., Pearsall, S.R., Hanlon, K., Amann, V., Hicks, D., Godfrey, L.V., and Threadgill, W.D. 2005. Azoxymethane is a genetic background-dependent colorectal tumor initiator and promoter in mice: Effects of dose, route, and diet. *Toxicol Sci.* 88(2), 340–345.
- Bourdon, I., Olson, B., Backus, R., Richter, B.D., Davis, P.A., and Schneeman, B.O. 2001. Beans, as a source of dietary fiber, increase cholecystokinin and apolipoprotein B48 response to test meals in men. *J Nutr.* 131: 1485–1490.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Cahill, C.M., and Rogers, J.T. 2008. Interleukin (IL) 1 $\beta$  induction of IL-6 is mediated by a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent AKT/I $\beta$  Kinase  $\alpha$  pathway targeting Activator Protein-1. *J Biol Chem.* 283: 25900-25912.
- Calderón-Velasco, R. 2005. La apoptosis en biología y patología. *Revista Peruana de Cardiología.* 31(2): 119-128.
- Campbell, K.J., Rocha, S., and Perkins, N.D. 2004 Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA (p65) NF-kB. *Mol Cell.* 13: 853–865.
- Campos, V.R. 2010. Caracterización parcial de los productos de la fermentación *in vitro* de los polisacáridos de frijol común cocido (*Phaseolus vulgaris* L.) y su efecto sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. Sin publicar.
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J.A., Guzman-Maldonado, S.H., Paredes-Lopez, O., Oomah, B.D., and Loarca-Piña, G. 2009. Chemical composition and *in vitro* polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *J Food Sci.* 74: 59–65.
- Campos-Vega, R., Guevara-Gonzalez, R.G., Guevara-Olvera, B.L., Oomah, B.D., and Loarca-Piña, G. 2010. Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polysaccharides modulate gene expression in human colon cancer cells (HT-29.) *Food Res Intern.* 43: 1057–1064.
- Cardador-Martínez, A., Castaño-Tostado, E., and Loarca-Piña, GF. 2002a. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L) against aflatoxin B<sub>1</sub>. *Food Addit Contam.* 19(1): 62-9.
- Casimiro, C. 2002. Factores etiopatogénicos en el cáncer colorrectal. Aspectos genéticos y clínicos (primera de dos partes). *Nutr. Hosp.* XVII (2): 63-71

- Castellanos, J.Z., Guzmán-Maldonado, H., Jiménez, A., Mejía, C., Muñoz-Ramos, J.J., Acosta-Gallegos, J.A., Hoyos, G., López-Salinas, E., González-Eguiarte, D., Salinas-Pérez, R., González-Acuña, J., Muñoz-Villalobos, J.A., Fernández-Hernández, P., y Cáceres, B. 1997. Hábitos preferenciales de los consumidores de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. Arch Latinoam Nutr. 47(2): 163-168.
- Chen, W.C., Liu, Q., Fu, X.J., and Kang, S.Y. 2004. Expression of survivin and its significance in colorectal cancer. World J Gastroenterol. 10: 2886-2889.
- Chen, C., and Tony-Kong, A.N. 2005. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. Trends Pharmacol Sci. 26(6): 318-326.
- Chen, J., Ghazawi, F.M., Bakkar, W., and Li, Q. 2006. Valproic acid and butyrate induce apoptosis in human cancer cells through inhibition of gene expression of Akt/protein kinase B. Mol Cancer. 5:71.
- Chen, J.H., Cao, J.L. Chu, Y.L., Wang, Z.L., Yang, Z.T., and Wang, H.L. 2008. T-2 toxin-induced apoptosis involving Fas, p53, Bcl-xL, Bcl-2, Bax and caspase-3 signaling pathways in human chondrocytes. J Zhejiang Univ Sci B. 9(6): 455-463.
- Cheng, L., and Lai, M.D. 2003. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. World J Gastroenterol. 9(12):2642-2649.
- Cherbut, C. 2002. Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. Br J Nutr. 87(Suppl. 2): S159–S162.
- Choung, M.G., Choi, B.R., An, Y.N., Chu, Y.H., and Cho, Y.S. Anthocyanin profile of Korean cultivated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J Agric Food Chem. 51(24): 7040–7043
- Clemo, N.K., Collard, T.J., Southern, S.L., Edwards, K.D., Moorghen, M., Packham, G., Hague, A., Paraskeva, C., and Williams, A.C. 2008. BAG-1 is up-regulated in colorectal tumour progression and promotes colorectal tumour cell survival through increased NF-kB activity. Carcinogenesis. 29, 849–857.
- Clifford, M.N. 2004. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. Planta Med. 70:1103-1114.
- Cooley, E.K., McPhee, J.T., Simons, J.P., Sweeney, W.B., Tseng, J.F., and Alavi, K. 2009. Colorectal Neoplasia Screening Before Age 50? Current Epidemiologic Trends in the United States. Diseases of the Colon and rectum. 52: 2.

- Corpet, D.E., and Pierre, F. 2003. Point: from animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system. *Cancer Epidem Biomar.* 12: 391–400.
- Corpet, D.E., and Tache, S. 2002. Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. *Nutr Cancer.* 43(1):1-21.
- Costa de Oliveira, A., Silva Queiroz, K., Machado, S., and 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 Latinoam Nutr.* 51: 276-283.
- Cregan, S.P, Dawson, V.L., and Slack, R.S. 2004. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene.* 23: 2785–2796.
- da Silva-Fialho, L., Monteze Guimarães, V., Gonçalves de Barros, E., Alves Moreira, M., Dos Santos Dias, L.A., de Almeida Oliveira, M.G., Chamel José, I., and Tavares de Rezende, S. 2006. Biochemical composition and indigestible oligosaccharides in *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Plant Foods Hum Nutr.* 61: 87-89.
- Dai, D., Nanthkumar, N.N., Newburg, D.S., and Walker, W.A. 2000. Role of oligosaccharides and glycoconjugates in intestinal host defense. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 30: S23-S33.
- Damia, G., and Brogini, M. 2004. Cell cycle checkpoint proteins and cellular response to treatment by anticancer agents. *Cell Cycle.* 3(1): 46-50.
- Daubioul, C., Rousseau, N., Demeure, R., Gallez, B., Taper, H., Declerck, B., and Delzenne, N. 2002. Dietary fructans, but not cellulose, decrease triglyceride accumulation in the liver of obese Zucker *fafa* rats. *J Nutr.* 132: 967–973.
- Davido, D.J., Richter, F., Boxberger, F., Stahl, A., Menzel, T., Lührs, H., Löffler, S., Dusel, G., Rapp, U.R., and Scheppach, W. 2001. Butyrate and propionate downregulate ERK phosphorylation in HT-29 colon carcinoma cells prior to differentiation. *Eur J Cancer Prev.* 10: 313-321.
- Davies, M.J., Bowey, E.A., Adlercreutz, H., Rowland, I.R., and Rumsby, P.C. 1999. Effects of soy or rye supplementation of high-fat diets on colon tumour development in azoxymethane-treated rats. *Carcinogenesis* 20(6): 927–931.
- de la Rosa, J.E., Díaz, B., y Sánchez, N. 2000. Muerte celular programada: Un proceso clave en fisiología y patología. *Ciencia al día internacional.* 3(3): 1-13.
- Del Moral, A.M., Moreno-Aliaga, J., y Martínez-Hernández, A. 2003. Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. *Nutr. Hosp.* 18(4): 181-188.

- Del Razo L.M., Garcia-Vargas, G.G., Garcia-Salcedo, J., Sanmiguel, M.F., Rivera, M., Hernandez, M.C., and Cebrian M.E. 2002. Arsenic levels in cooked food and assessment of adult dietary intake of arsenic in the Region Lagunera, Mexico. *Food Chem Toxicol.* 40: 1423-1431.
- Deshpande, S.S., and Cheryan, M. 1985. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. *J. Food Sci.* 50: 905-910.
- Díaz-Batalla, L., Widholm, J.M., Fahey, C.G., 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.
- Díaz-Román, T.M., Faxas-García, M.E., y Arango-Prado, M.C. 1998. Factores etiopatogénicos y moleculares en la génesis del cáncer. *Rev Cub Oncol.* 14(1): 42-50.
- Díez-Alonso, M., Pérez-Piqueras, J., y Martín-Duce, A. 2001. Marcadores tumorales de valor pronóstico en adenocarcinomas de colon y recto. *Gastroenterol Integr.* 2(4): 207-221.
- Ding, J., Feng, Y., and Wang, H. 2007. From cell signaling to cancer therapy. *Acta Pharmacol Sin.* 28(9): 1494–1498.
- Duane, W.C. 1997. Effects of legume consumption on serum cholesterol, biliary lipids, and sterol metabolism in humans. *J. Lipid Hps.* 38: 1120-1128.
- Edgar, B.A., and Orr-Weaver, T.L. 2001. Endoreplication Cell Cycles: More for Less. *Cell.* 105: 297–306.
- Emenaker, N.J., Calaf, G.M., Cox, D., Basson, M.D., and Qureshi, N. 2001. Short-chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating uPA TIMP-1, TIMP-2, mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA protein expression in an *in vitro* cell culture model. *J Nutr.* 131: 3041S-3046S.
- Escudero-Álvarez, E., y González-Sánchez, P. 2006. La fibra dietética. *Nutr. Hosp.* 21 (Supl.2): 61-72.
- Espinosa-Alonso, L.G., Lygin, A., Wildholm, J.M., Valverde, M.E., and Paredes-Lopez, O. 2006. polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* 54: 4436-4444.
- Feregrino, P.A.A. 2009. Caracterización y efecto de los polisacáridos presentes en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Negro 8025 sobre el estadio temprano de

cáncer de colon. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. Pp. 171-174.

- Feregrino-Pérez, A.A., Berumen, L.C., García-Alcocer, G., Guevara-González, R.G., Ramos-Gómez, M., Reynoso-Camacho, R., Acosta-Gallegos, J.A., and Loarca-Piña, G. 2008. Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on Azoxymetane-induced colon cancer. *J Agric Food Chem.* 56: 87-8744.
- Fiala, E.S., Sohn, O.S., and Hamilton, S.R. 1987. Effects of chronic dietary ethanol on in vivo and in vitro metabolism of methylazoxymethanol and on methylazoxymethanol-induced DNA methylation in rat colon and liver. *Cancer Res.* 47: 5939-5943.
- Fischer, U., and Schulze-Osthoff, K. 2005. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev.* 57(2): 187-215.
- Fishman, W.H., Springer, B., and Brunetti, R. 1948. Application of an improved glucuronidase assay method to the study of human blood. *J Biol Chem.* 173: 449.
- Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F., and Jacks, T. 2002. p63 and p73 are required for p53- dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature.* 416: 560-564.
- Florez, A., Pujolà, M., Valero, J., Centelles, E., Almirall, A., and Casañas, F. 2009. Genetic and environmental effects on chemical composition related to sensory traits in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem* 113: 950-956
- Foijer, F., and te Riele, H. 2006. Restriction beyond the restriction point: mitogen requirement for G2 passage. *Cell Div.* 1:8: 1-5.
- Frame, S., and Balmain, A. 2000. Integration of positive and negative growth signals during ras pathway activation in vivo. *Curr Opin Genet Dev.* 10: 106-113.
- Fujioka, S., Schmidt, C., Sclabas, G.M., Li, Z., Pelicano, H., Peng, B., Yao, A., Niu, J., Zhang, W., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Huang, P., and Chiao, P.J. 2004. Stabilization of p53 is a novel mechanism for proapoptotic function of NF-kB. *J Biol Chem.* 279: 27549-27559.
- Gálvez-Ranilla, L., Genovese, M.I., and Lajolo, F.M. 2007. Polyphenols and antioxidant capacity of seed coat and cotyledon from Brazilian and Peruvian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* 55: 90-98.
- Gao, K., Xu, A., Krul, C., Venema, K., Liu, Y., Niu, Y., Lu, J., Bensoussan, L., Seeram, N.P., Heber, D., and Henning, S.M. 2006. Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid

- supplements, only 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *J. Nutr.* 136: 52–57.
- Gariglio, P. Orozco E. 2000. *Genética y biomedicina molecular*. Orozco. 1ª edición. Ed.Limusa, México, D.F. Pp.181–198
- García-Peris, P., Bretón-Lesmes, I., de la Cuerda-Compes, C., y Cambor-Álvarez, M. 2002. Metabolismo colónico de la fibra. *Nutr. Hosp.* XVII (Sup. 2): 11-16.
- Geier, M.S., Butler, R.N., and Howarth, G.S. 2006. Probiotics, prebiotics and synbiotics. *Cancer Biol Ther.* 5:10, 1265-1269.
- Gonthier, M.P., Cheyner, V., Donovan, J.L., Manach, C., Morand, C., Mila, I., Lapierre, K., Rémesy, C., and Scalbert. A. 2003. Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J. Nutr.* 133: 461–467.
- Gonzalez, F.J. 2007. The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture. CYP2E1. *Drug Metabolism and Disposition.* 35(1): 1-8.
- Gonzalez de Aguilar JL, Gordon JW, and Rene F. 2000. Alteration of the Bcl-x/Bax ratio in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: evidence for the implication of the p53 signaling pathway. *Neurobiol Dis.* 7(4):406–415.
- Gonzalez de Mejia, E., Bradford, T., and Hasler, C. 2003. The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. *Nutr Rev.* 61(7): 239–246.
- Gorodner, Z. O., Avalos, R., Vertinaldo, R., San José, C.F., García, F.C., Enrique, O., Galarza, A.C., Imfeld, M.V., Benítez, J.J. 2001. Caracterización Morfológica de la Apoptosis (Suicidio Celular) en el Cáncer de Mama con Adyuvancia Quimioterápica Prequirúrgica Cátedra II Histología y Embriología - Facultad de Medicina - U.N.N.E. Sargento Cabral - (3400) Corrientes – Argentina.
- 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.
- Graña, X., Garriga, J., and Mayol, X. 1998. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene.* 17: 3365-3383.
- Greer, E.L., and Brunet, A. 2005. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene.* 24: 7410–7425.
- Guarner, F. 2002. El colon como órgano: hábitat de la flora bacteriana. *Nutr Hosp.* XVII (Sup. 2): 7-10.

- Guéraud, F., and Paris, A. 1998. Glucuronidation: a dual control. *Gen Pharmacol.* 31(5): 683-8.
- Guda, K., Marino, J.N., Jung, Y., Crary, Dong, K.M., and Rosenberg, D.W. 2007. Strain-specific homeostatic responses during early stages of Azoxymethane-induced colon tumorigenesis in mice. *Int J Oncol.* 31: 837-842,
- Gutiérrez, J.B., and Salsamendi, A.L. 2001. *Fundamentos de ciencia toxicológica.* Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid, España. 1ª ed., 1ª imp. Pp: 155-177.
- Hague, A., Manning, A., Hanlon, K., Huschtscha, L.I., Hart, D., and 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.
- Haier, J., and Nicolson, G.L. 2002. PTEN regulates tumor cell adhesion of colon carcinoma cells under dynamic conditions of fluid flow. *Oncogene.* 21: 1450-1460.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. Review. *Cell.* 100: 57–70.
- Hangen, L., and Bennink, MR. 2002. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutr Cancer.* 44(1): 60-5.
- Harford, T.J., Shaltouki, A., and Weyman, C.M. 2010. Increased expression of the pro-apoptotic Bcl2 family member PUMA and apoptosis by the muscle regulatory transcription factor MyoD in response to a variety of stimuli. *Apoptosis.* 15: 71–82.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., and Haupt, Y. 2003. Apoptosis-the p53 network. *J Cell Sci.* 116: 4077-4085.
- Hengartner, M.O. 2000. The Biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407: 770-776.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1997. 14-3-3 $\sigma$  is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell.* 1: 3–11.
- Hernández, A., Martín-Vasallo, P., Torres, A., y Salido, E. 1994. Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *Nefrología.* 9(2): 145-162.
- Hernández-Ledesma, B., Hsieh, C.C., and de Lumen, B.O. 2009. Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. *Peptides.* 30: 426–430.



- Hernández-Menéndez, M., y Ríos-Hernández, M.A. 1999. Oncogenes y cáncer. *Rev Cub Oncol.* 15(2): 131-9.
- Herrera, I.M., González, E.P., y Romero J.G. 1998. Fibra dietética soluble, insoluble y total en leguminosas crudas y cocidas. *Arch Latinoam Nutr.* 48: 179-182.
- Hildesheim, J., and Fornace, A.J. 2002. Gadd45a: an elusive yet attractive candidate gene in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 8: 2475–2479.
- Hiranuma, C., Kawakami, K., Oyama, K., Ota, N., and Watanabe, G. 2004. Hypermethylation of the MYOD1 gene is a novel prognostic factor in patients with colorectal cancer. *Int J Mol Med.* 13: 413-7.
- Ho, J., and Benchimol, S. 2003. Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor. *Cell Death and Differ.* 10, 404–408.
- Hollams, E.M. Giles, K.M., Thomson, A.M., and Leedman, P.J. 2002. mRNA Stability and the control of gene expression: implications for human disease. *Neurochem Res.* 27(10): 957–980.
- Hsu, C.K., Liao, J.W., Chung, Y.C., Hsieh, C.P., and Chan, Y.C. 2004. Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. *J. Nutr.* 134: 1523–1528.
- Hsu, W., Vavak, D.L., Satterlee, L.D. y Millar G.A. (1977). A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J.Food Sci.* 42: 1269-1273.
- Hu, Y., Martin, J., Le, R., and Young, G.P. 2002. The colonic response to genotoxic carcinogens in the rat: regulation by dietary fibre. *Carcinogenesis.* 23(7): 1131-1137.
- Iacomino, G., Tecce, M.F., Grimaldi, C., Tosto, M., and Russo, G.L. 2001. Transcriptional response of a human colon adenocarcinoma cell line to sodium butyrate. *Biochem Biophys Res Commun.* 285: 1280–1289.
- Iacopetta, B. 2003. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat.* 21: 271-276.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. 2010. GLOBOCAN 2008. Section of cancer information. <http://globocan.iarc.fr>
- Imbriano, C., Gurtner, A., Cocchiarella, F., Agostino, S.D., Basile, V., Gostissa, M., Dobbstein, M., Del Sal, G., Piaggio, G., and Mantovaniet, R., 2005. Direct p53 transcriptional repression: *in vivo* analysis of CCAAT-containing G2/M promoters. *Mol Cell Biol.* 25: 3737–3751.

- INEGI. Instituto Nacional de Estadísticas, Geografía e Informática. 2008. Información sobre Tumores Malignos. México.
- Iniestra-González, J.J., Ibarra-Pérez, F.J., Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzmán, N.E., and González-Laredo R.F. 2005. Factores antinutricios y actividad antioxidante en variedades mejoradas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia*. 39(6): 603-610.
- Itzkowitz, S.H., and Yio, X. 2004. Inflammation and Cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G7–G17.
- Jackson, M.W., Agarwal, M.K., Yang, J., Bruss, P., Uchiumi, T., Agarwal, M.L., Stark, G.R., and Taylor, W.R. 2005. p130/p107/p105Rb-dependent transcriptional repression during DNA-damage-induced cell-cycle exit at G2. *J Cell Sci*. 118: 1821-1832.
- Jansson, A., and Sun, X.F. 2002. *Bax* expression decreases significantly from primary tumor to metastasis in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 20: 811-816.
- Jenab, M; and Thompson, L.U. 2002. Role of phytic acid in cancer and other diseases. *In: Food Phytates*. Reddy, N. R., Sathe, S. K., Eds., CRC Press: Boca Raton, FL, Pp. 225-248.
- Jung, H.J., Kim, E.H., Mun, J.Y., Park, S., Smith, M.L., Han, S.S., and Seo, Y.R. 2007. Base excision DNA repair defect in Gadd45a-deficient cells. *Oncogene*. 26: 7517–7525.
- Kaldis, P., and Aleem, E. 2005. Cell cycle sibling rivalry: Cdc2 vs. Cdk2. *Cell Cycle*. 4(11): 1491-4.
- Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Mahboubi, A., and Green, D.R. 1998. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- $\kappa$ B and AP-1. *Mol Cell*. 1: 543–551.
- Kastan, M.C. 1997. Cap 6: Molecular Biology of Cancer: The cell cycle. En: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. De Vita VT, Hellman S Jr, Rosenberg SA. (editores) 5a edition, Philadelphia. Lippincott-Raven Publishers. Pp: 121-133.
- Kautenburger, T., Beyer-Sehlmeyer, G., Festag, G., Haag, N., Kühler, S., Küchler, A., Weise, A., Marian, B., Peters, W.H.M., Liehr, T., Claussen, U., and Pool-Zobel, B.L. 2005. The gut fermentation product butyrate, a chemopreventive agent, suppresses glutathione S-transferase theta (hGSTT1) and cell growth more in human colon adenoma (LT97) than tumor (HT29) cells. *J Cancer Res Clin*. 131: 692–700.

- Kawakami, K., Ruszkiewicz, A., Bennett, G., Moore, J., Grieu, F., Watanabe, G., and Iacopetta, B. 2006. DNA hypermethylation in the normal colonic mucosa of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*. 94: 593 – 598.
- Kennedy, A.R. 1998. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *Am J Clin Nutr*. 68(suppl): 1406S–12S.
- Kennedy, A.R., Billings, P.C., Wan, X.S., and Newberne, P.M. 2002. Effects of Bowman-Birk Inhibitor on Rat Colon Carcinogenesis. *Nutr Cancer*. 43(2): 174–186.
- Kern, S.E. 2001. Cap 4: Progressive genetic abnormalities in human neoplasia. En: *The molecular basis of cancer*. Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA (editors). Saunders Company. 2nd Edit. United States of America. Pp: 41-69.
- Kim, K.M., and Shibata, D. 2002. Methylation reveals a niche: stem cell succession in human colon crypts. *Oncogene*. 21: 5441 – 5449.
- Kimmelman, A., Bafico, A., and Aaronson, S.A. 2001. Cap 7: Oncogenes and signal transduction. En: *The molecular basis of cancer*. Mendelsohn J, Howley PM, Israel, M.A., Liotta, L.A. (editors). Saunders Company. 2nd Ed. United States of America. Pp: 115-135.
- Kinzler, W.K., and Vogelstein, B. 2002. Cap 34: Colorectal tumors. En: *The genetic basis of human cancer*. Vogelstein B, Kinzler WK (editors). 2a ed. Mc. Graw Hill. Pp 583-612
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J., and Ashkenazi, A. 2000. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and Caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*. 12: 611–620.
- Klurfeld, M.D.,. 1995. Cap 5: Animal models of colon cancer. En: *Dietary fiber in health and disease*. Kritchevsky D, Bonfield C (editors). Eaga Press. St. Paul, Minnessota, USA. Pp 321-339.
- Kosinski, C., Li, V.S.W., Chan, A.S.Y., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W.Y., Chan, T.L., Mifflin, R.C., Powell, D.W., Yuen, S.T., Leung, S.Y., and Chen, X. 2007. Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *PNAS*. 104: 15418–15423.
- Knoll, N., Ruhe, C., Veeriah, S., Sauer, J., Gleib, M., Gallagher, E.P., and Pool-Zobel, B.L. 2005. Genotoxicity of 4-hydroxy-2-nonenal in human colon tumor cells is associated with cellular levels of glutathione and the modulation of glutathione S-transferase A4 expression by butyrate. *Toxicol Sci*. 86(1): 27-35.

- Krajewska, M., Moss, S.F., Krajewski, S., Song, K., Holt, P.R., and Reed, J.C. 1996. Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res.* 56: 2422-2427.
- Kurtzman, R.H., and Halbrook, W.U. 1970. Polysaccharide from dry Navy beans, *Phaseolus vulgaris*: Its isolation and stimulation of *Clostridium perfringens*. *Appl Microbiol.* 20(5): 715-719.
- Kuntz, S., Kunz, C., and Rudloff, S. 2009. Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth-related cell cycle genes in intestinal epithelial cells. *Br J Nutr.* 101: 1306–1315.
- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N., and Strobel, S. 2000. Oligosaccharides in human milk: Structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr.* 20: 699–722.
- Lackner, D.H., and Bähler, J. 2008. Translational control of gene expression: from transcripts to transcriptomes. *Int Rev Cell Mol Biol.* 271: 199-251.
- Lam, E.W.F., Francis, R.E., and Petkovic, M. 2006. FOXO transcription factors: key regulators of cell fate. *Biochem Soc Trans.* 34: 722-726.
- Lamprecht, S.A., and Lipkin, M. 2002. Migrating colonic crypt epithelial cells: primary targets for transformation. *Carcinogenesis.* 23(11): 1777–1780.
- 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., and 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.
- Laronga, C., Yang, H.Y., Neal, C., and Lee, M.H. 2000. Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *J Biol Chem.* 275: 23106–23112.
- Le-Leu, R.K., Brown, I.L., Hu, Y., Bird, A.R., Jackson, M., Esterman, A., and Young, G.P. 2005. A symbiotic combination of resistant starch and *Bifidobacterium lactis* facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. *J Nutr.* 135: 996-1001.
- Le Leu, R.K., Brown, I.L., Hu, Y., Morita, T., Esterman, A., and Young, G.P. 2007. Effect of dietary resistant starch and protein on colonic fermentation and intestinal tumourigenesis in rats. *Carcinogenesis.* 28(2): 240–245.
- Li, M., Liu, L., Wang, Z., Wang, L., Liu, Z., Xu, G., and Lu, S. 2008. Overexpression of hMSH2 and hMLH1 protein in certain gastric cancers and their surrounding mucosae. *Oncol Rep.* 19: 401-406.

- Lin YL, Sengupta S, Gurdziel K, Bell, G.W., Jacks, T., and Flores, E.R. 2009. p63 and p73 transcriptionally regulate genes involved in DNA repair. *PLoS Genet.* 5: 1-13.
- Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V., and Medema, R.H. 2009. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network *J. Cell Biol.* 185(2): 193–202.
- Lodish, H., Berk, A., Lawrence, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., y Darnell, J. 2003a. Cap 1: La célula dinámica. En: *Biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana. 4a Ed. Madrid, España. Pp: 9-11.
- Lodish, H., Berk, A., Lawrence, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., y Darnell, J. 2003b. Cap 23: Interacciones celulares en el desarrollo. En: *Biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana. 4a Ed. Madrid, España. Pp: 1044-1050.
- Lowe, S.W., and Lin, A.W. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 21(3): 485-495.
- Luo, L., Shen, G.Q., Stiffler, K.A., Wang, Q.K., Pretlow, T.G., and Pretlow, T.P. 2006. Loss of heterozygosity in human aberrant crypt foci (ACF), a putative precursor of colon cancer. *Carcinogenesis* 27(6): 1153–1159.
- Luk, S.C.W., Siu, S.W.F., Lai, C.K., Wu, YJ., and Pang, S.F. 2005. Cell cycle arrest by a natural product via G2/M checkpoint. *Int J Med Sci.* 2: 64-69.
- Maeda, S., and Karin, M. 2003. Oncogene at last—c-Jun promotes liver cancer in mice. *Cancer Cell.* 3: 102-104.
- Maga, G., and Hübscher, U. 2003. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci.* 116: 3051-3060.
- Mahyar-Roemer, M., and Roemer, M. 2001. p21 Waf1/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.
- Manoj, G., Thampi, B.S.H., Leelamma, S., and Menon, P.V.G. 2001. Effect of dietary fiber on the activity of intestinal and fecal beta-glucuronidase activity during 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Plant Foods Hum Nutr.* 56: 13–21.
- Markowitz, S.D., Dawson, D.M., Willis, J., and Willson, J.K.V. 2002. Focus on colon cancer. *Cancer Cell.* 1: 233-236.
- Marsden, V.S., Ekert, P.G., Delft, M.V., Vaux, D.L., Adams, J.M., and Strasser, A. 2004. Bcl-2–regulated apoptosis and cytochrome C release can occur independently of both caspase-2 and caspase-9. *J Cell Biol.* 165: 775–780.

- Mathews, C.K., van Holde, K.E., y Ahern, K.G. 2002. Cap 23: Coordinación metabólica, control metabólico y transducción de señal. En: Bioquímica. Pearson Addison Wesley. 3a edición. Madrid, España. Pp: 967-973.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., and Ewert, B. 1999. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *J Agric Food Chem.* 47: 4009-4017.
- McBain, A.J., and Macfarlane, G.T. 2001. Modulation of genotoxic enzyme activities by non-digestible oligosaccharide metabolism in *in vitro* human gut bacterial ecosystems. *J. Med. Microbiol.* 50: 833-842.
- McCole, D.F., and Barrett, K.E. 2003. Epithelial transport and gut barrier function in colitis. *Curr Opin Gastroen.* 19(6): 578-582.
- McCormick, D., Kibbe, P.J., and Morgan, S.W. 2002. Colon Cancer: Prevention, Diagnosis, Treatment. *Gastroenterol Nurs.* 25(5): 204-211.
- Mentor-Marcel, R.A., Bobe, G., Barrett, K.G., Young, M.R., Albert, P.S., Bennink, M.R., Lanza, E., and Colburn, N.H. 2009. Inflammation-associated serum and colon markers as indicators of dietary attenuation of colon carcinogenesis in ob/ob mice. *Cancer Prev Res.* 2(1): 60-69.
- Mohamad, N., Gutiérrez, A., Nuñez, M., Cocca, C., Martin, G., Cricco, G., Medina, V., Rivera, E., and Bergoc, R. 2005. Mitochondrial apoptotic pathways. *Biocell.* 29(2): 149-161.
- Mohammad, S.N., and Hopfinger, A.J. 1980. Chemical reactivity of a methyldiazonium ion with nucleophilic centers of DNA bases. *J. Theor. Biol.* 87: 401-419.
- Mori, H., Hata, K., Yamada, Y., Kuno, T., and Hara, A. 2005. Mini review: Significance and role of early-lesions in experimental colorectal carcinogenesis. *Chem Biol Interact.* 155: 1-9.
- Murakami, M.S., and Vande-Woude, G.F. 2001. Cap 2: Regulation of the cell cycle. En: *The molecular basis of cancer.* Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA (editors). Saunders Company. 2nd Edit. United States of America. Pp: 10-18.
- Murray, A.W. 2004. Recycling the cell cycle: review cyclins revisited. *Cell.* 116: 221-234.
- Muzquiz, M., Burbano, C., Ayet, G., Pedrosa, M.M., and Cuadrado, C. 1999. The investigation of antinutritional factors in *Phaseolus vulgaris*. Environmental and varietal differences. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 3(4): 210-216.

- Nair, V.D., Yuen, T., Olanow, C.W., and Sealfon, S.C. 2004. Early single cell bifurcation of pro- and antiapoptotic states during oxidative stress. *J Biol Chem.* 279: 27494–27501.
- Nakanishi, S., Kataoka, K., Kuwahara, T., and 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.
- Nelson, C. 2000. “Lehninger, Principios de Bioquímica” 3a ed. Ed Omega.
- Newburg, D.S. 2000. Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 30: S8-S17.
- Niba, L.L., and Niba, S.N. 2003. Role of non-digestible carbohydrates in colon cancer protection. *Nutr Food Sci.* 33(1): 28-33.
- Niederhuber, J.E., Cole, C.E., Grochow, L., Jacoby, R.F., Lee, F.T. Jr., Mooney, M., and Ritter, M. 2004. Chapter 80 – Colon Cancer. Abeloff: *Clinical Oncology*, 3rd ed.
- Nurmi, K; Ossipov, V; Huakioja, E and Pihlaja, K. 1996. Variation of total phenolic content and individual low molecular weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp. *tortuosa*). *J Chem Ecology* 22: 2023-2040
- O’Brate, A., and Giannakakou, P. 2003. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? Bax-induced apoptotic cell death. *Drug Resist Updat.* 6, 313–322.
- Obaya, A.J., and Sedivy, J.M. 2002. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 126–142.
- Oboh, H.A., and Omofoma, C.O. 2008. The effects of heat treated lima beans (*Phaseolus lunatus*) on plasma lipids in hypercholesterolemic rats. *Pakistan J Nutr.* 7(5): 636-639.
- Ohki, R., Nemoto, J., Murasawa, H., Oda, E., Inazawa, J., Tanaka, N., and Taniguchi, T. 2004. Reprimin, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J Biol Chem.* 275: 22627–22630.
- Oliveira, P.A., Colaco, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-la-Cruz, L.F., and Lopes, C. 2007. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cien.* 79(4): 593-616.
- Oomah, D., Cardador-Martínez, A., and Loarca-Piña, G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *J Sci Food Agric.* 85: 935-942.

- Papanikolaou, A., Wang, Q.S., Papanikolaou, D., Whiteley, H.E., and Rosenberg, D.W. 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.
- Park, J., and Floch, M.H. 2007. Prebiotics, probiotics, and dietary fiber in gastrointestinal disease. *Gastroenterol Clin N*. 36: 47–63.
- Pawlowski, J., and Kraft, A.S. 2000. Bax-induced apoptotic cell death. *PNAS*. 97(2): 529-531.
- Peralta-Zaragoza, O., Bahena-Román, M., Díaz-Benítez, C.E., y Madrid-Marina, V. 1997. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Publica Mex*. 39: 451-462.
- Plati, J., Bucur, O., and Khosravi-Far, R. 2011. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr. Biol*. 3: 279–296.
- Rafter, J. 2002. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *Br J Nutr*. 88(Suppl. 1): S89–S94.
- Rahman-Roblick, R., Roblick, U.J., Hellman, U., Conrotto, P., Liu, T., Becker, S., Hirschberg, D., Jörnvall, H., Auer, G., and Wiman, K.G. 2007. p53 targets identified by protein expression profiling. *PNAS*. 104: 5401–5406.
- Rao, C.V., Chou, D., Simi, B., Ku, H., and Reddy, B.S. 1998. Prevention of colonic aberrant crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffee fiber, inulin and pectin. *Carcinogenesis*. 19 (10): 1815-1819.
- Ravagnan, L., Roumier, T., and Kroemer, G. 2002. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol*. 192: 131–137.
- Ray, R., Chen, G., Velde, C.V., Cizeau, J., Park, J.H., Reed, J.C., Gietz, R.D., and Greenberg, A.H. 2000. BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-XL and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol Chem*. 275: 1439–1448.
- Reddy, B.S., Narisawa, T., and Weisburger, J.H. 1976. Colon carcinogenesis in germ-free rats with intrarectal 1,2-Dimethylhydrazine and subcutaneous azoxymethane. *Cancer Res*. 36: 2874-2876.
- Reyes-Moreno, C., and Paredes-López, O., 1993, Hard-to-cook phenomenon in common beans, *Crit Rev Food Sci Nutr*. 33: 227-286.



- Robert, M.F., Morin, S., Beaulieu, N., Gauthier, F., Chute, I.C., Barsalou, A., and MacLeod, A.M. 2003 DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet.* 33: 61-65.
- Robertson, K.D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P.A., Jones, P.L., and Wolffe, A.P. 2000. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet.* 25: 338-342.
- Rodriguez, M.A.M., Silva, L.A.G., Salvadori, D.M.F., de Camargo, J.L.V., and Montenegro, M.R. 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.
- Rodríguez-Castillo, L., y Fernández, X.E. 2003. Los frijoles (*Phaseolus vulgaris*): su aporte a la dieta del costarricense. *Acta Med Costar.* 45(3): 120-125.
- Rouet-Benzineb, P., Aparicio, T., Guilmeau, S., Pouzet, C., Descatoire, V., Buyse, M., and Bado, A. 2004. Leptin counteracts sodium butyrate-induced apoptosis in human colon cancer HT-29 cells via NF- $\kappa$ B signaling. *J Biol Chem.* 279(16): 16495–16502.
- Rozen, P., Liphshitz, I., and Barchana, M. 2011. The changing epidemiology of colorectal cancer and its relevance for adapting screening guidelines and methods. *Eur J Cancer Prev.* 20: 46–53.
- SaBiosciences 2009. Qiagen. <http://www.sabiosciences.com/>
- Sakamoto, K., Maeda, S., Hikiba, Y., Nakagawa, H., Hayakawa, Y., Shibata, W., Yanai, A., Ogura, K., and Omata, M. 2009. Constitutive NF- $\kappa$ B activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth. *Clin Cancer Res.* 15(7): 2248-2258.
- Sanz, Y., Collado, M.C., Haros, M., y Dalmau, J. 2004. Funciones metabólico nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. *Acta Pediatr Esp.* 62: 520-526
- Saura-Calixto, F., Goñi, I., Bravo, L., and Mañas, E. 1993. Resistant starch in foods: modified method for dietary fiber residues. *J Food Sci.* 58(3): 642-643.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., and Goñi, I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem.* 101: 492–501.
- Schafer, Z.T., and Brugge, J.S. 2007. IL-6 involvement in epithelial cancers. *J Clin Invest.* 117(12): 3660-3663.

- Scheppach, W., and Weiler, F. 2004. The butyrate story: old wine in new bottles? Review. *Curr Opin Clin Nutr.* 7(5): 563-567.
- Schmelz, E.M., Xu, H., Sengupta, R., Du, J., Banerjee, S., Sarkar, F.H., Rishi, A.K., and Majumdar, A.P.N. 2007. Regression of Early and Intermediate Stages of Colon Cancer by Targeting Multiple Members of the EGFR Family with EGFR-Related Protein. *Cancer Res.* 67: 5389.
- Schneider, M.R., Fischerb, J., Wolfa, E., Sordatec, B., and Lahma, H. Interleukin-6 stimulates clonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Lett.* 151(1): 31-38.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2007. Síntesis ejecutiva del cultivo de frijol en el Estado de Chiapas. [www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)
- SIAP y SAGARPA. Servicio de información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2004. Situación actual y perspectiva de Frijol en México 2000–2005. [www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)
- Sengupta, S., and Roychoudhury, S. 2005. DNA double strand break and repair: mechanisms and involvement in human cancer. *Int J Hum Genet.* 5: 1-10.
- Sengupta, S., Muir, J.G., and Gibson, P.R. 2006. Does butyrate protect from colorectal cancer? Review. *J Gastroen Hepatol.* 21:209–218.
- Serrano, J., y Goñi, I. 2004. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. *Arch Latinoam Nutr.* 54(1): 36-44.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13: 1501–1512.
- Sherr, C.J. 2004. Principles of Tumor Suppression. *Cell.* 116: 235–246.
- Shrivastava, A., Tiwari, M., Sinha, R.A., Kumar, A., Balapure, A.K., Bajpai, V.K. Sharma, R., Mitra, K., Tandon, A., and Godbole, M.M. 2006. Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway. *J Biol Chem.* 281(28): 19762-19771.
- Sohn, O.S., Fiala, E.S., Puz, C., Hamilton, S.R., and Williams, G.M. 1987. Enhancement of rat liver microsomal metabolism of azoxymethane to methylazoxymethanol by chronic ethanol administration: similarity to the microsomal metabolism of *N*-nitrosodimethylamine. *Cancer Res.* 47: 3123-3129.

- Song, G., Mao, Y.B., Cai, Q.F., Yao, L.M., Ouyang, G.L., and Bao, S.D. 2005. Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression. *Braz J Med Biol Res.* 38: 1791-1798.
- Smulikowska, S., Pastuszewska, B., Swiech, E., Ochtabinska, A., Mieczkowska, A., and Nguyen, V.C. Buraczewska, L. 2001. Tannin content affects negatively nutritive value of pea for monogastrics. *J Anim Feed Scis.* 10: 511-523.
- Stoimenov, I., and Helleday, T. 2009. PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 37: 605–613.
- Swennen, K., Courtin, C.M., and Delcour, J.A. 2006. Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Crit Rev Food Sci.* 46(6): 459-471.
- Tak, P.P., and Firestein, G.S. 2001. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* 107(1): 7-11.
- Takahashi, M., and Wakabayashi, K. 2004. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. Review Article. *Cancer Sci.* 95: 475–480.
- Tamura, M., Gu, J., Danen, E.H.J., Takino, T., Miyamotoi, S., and Yamada, K.M. 1999. PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem.* 274(29): 20693–20703.
- Ten Bruggencate, S.J., Bovee-Oudenhoven, I.M. Lettink-Wissink, M.L. and Van der Meer, R. 2003. Dietary fructo-oligosaccharides dose-dependently increase translocation of salmonella in rats. *J. Nutr.* 133: 2313–2318.
- Telphly, TR, and Burchell, B. 1990. UDP-glucuronosyltransferases: a family of detoxifying enzymes. *Trends Pharmacol Sci.* 11(7): 276-9.
- Tergaonkar, V., Pando, M., Vafa, O., Wahl, G., and Verma, I. 2002. p53 stabilization is decreased upon NF $\kappa$ B activation: a role for NF $\kappa$ B in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell.* 1: 493–503.
- Topping, D.L., and Clifton, P.M. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* 81: 1031-1064.
- Torruco-Uco, J.G., Domínguez-Magaña, M.A., Dávila-Ortíz, G., Martínez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L.A., and Betancur-Ancona, D.A. 2008. Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 6(2): 158-168

- Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz, G., and Betancur-Ancona, D. 2009. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *Food Sci Technol.* 42: 1597–1604.
- Trebichavsky, I., Rada, V., Splichalova, A., and Splichal, I. 2009. Cross-talk of human gut with bifidobacterial. *Nutr Rev.* 67(2): 77–82.
- Trosko, J.E. 2003. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 36(1): 43-48.
- Tzortzis, G., Goulas, A.K., Gee, J.M., and Gibson, G.R. 2005. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. *J. Nutr.* 135: 1726–1731.
- Vainio, H., and Miller, A.B. 2003. Primary and secondary prevention in colorectal cancer. *Acta Oncol.* 42(8): 809-815.
- Valenzuela, B.A., y Maiz, G.A. 2006. El rol de la fibra dietética en la nutrición enteral. *Rev Chil Nutr.* 33(Supl. 2): 342-351.
- Vanamala, J., Leonardi, T., Patil, B.S., Taddeo, S.S., Murphy, M.E., Pike, M.L., Chapkin, R.S., Lupton, J.R., and Turner, N.D. 2006. Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. *Carcinogenesis.* 27(6): 1257–1265.
- Vargas-Torres, A., Osorio-Díaz, P., Tovar, J., Paredes-López, O., Ruales, J., and Bello-Pérez, LA. 2004. Chemical composition, starch bioavailability and indigestible fraction of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Starch.* 56: 74-78.
- Veeriah, S., Hofmann, T., Gleib, M., Dietrich, H., Will, F., Schreier, P., Knaup, B., and Pool-Zobel, B.L. 2007. Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29). *J Agric Food Chem.* 55(8): 2892-900.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36: 131–149.
- Vioque, J., Pedroche, J., Yust, M.M., Lqari, H., Megías, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M., and Millán, F. 2006. Peptídeos bioativos em proteínas vegetais de reserva. *Braz. J. Food Technol.*, 51(5): 361-365.
- Vulevic, J., Drakoularakou, A., Yaqoob, P., Tzortzis, G., and Gibson, G.R. 2008. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-

- galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *Am J Clin Nutr*. 88: 1438–46.
- Waldecker, M., Kautenburger, T., Daumann, H., Busch, C., and Schrenk, D. 2008. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J Nutr Biochem*. 19(9): 587-93.
- Waldman, T., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1995. p21 is necessary for the p53-mediated G<sub>1</sub> arrest in human cancer cells. *Cancer Res*. 55: 5187-5190.
- Wenzel, U., Kuntz, S., Brendel, M.D., and Daniel, H. 2000. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*. 60(14): 3823-31.
- WHO, 2011. <http://www.who.int/topics/cancer/es/index/.html>
- Wijnands, M.V.W., Schoterman, H.C., Bruijntjes, J.P., Hollanders, V.M.H., and Woutersen, R.A. 2001. Effect of dietary galacto-oligosaccharides on azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colorectal cancer in Fischer 344 rats. *Carcinogenesis*. 22(1): 127-132.
- Williams, G.M. 2001. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology* 161: 3–10.
- Williamson, R.C., Bauer, F.L., Terpstra, O.T., Ross, J.S., and Malt, R.A. 1980. Contrasting effects of subtotal enteric bypass enterectomy and colectomy on azoxymethane induced intestinal carcinogenesis. *Cancer*. 40: 538-543.
- Winkler, P., Ghadimi, D., Schrezenmeir, J., and Kraehenbuhl, J.P. 2007. Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. *J. Nutr*. 137: 756S–772S.
- Wong, J.M.W., de Souza, R., Kendall, C.W.C., Emam, A., and Jenkins, D.J.A. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*. 40: 235–243.
- [www.nccn.org](http://www.nccn.org) National Comprehensive Cancer Network.
- Wu, Z.H., and Miyamoto, S. 2008. Induction of a pro-apoptotic ATM–NF- $\kappa$ B pathway and its repression by ATR in response to replication stress. *EMBO J*. 27: 1963–1973.
- Xiang, J., Chao, D.B., and Korsmeyer, S.J. 1996. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci*. 93: 14559–14563.
- Yamada, Y., and Mori, H. 2003. Pre-cancerous lesions for colorectal cancers in rodents: a new concept. *Carcinogenesis*. 24(6): 1015-1019.

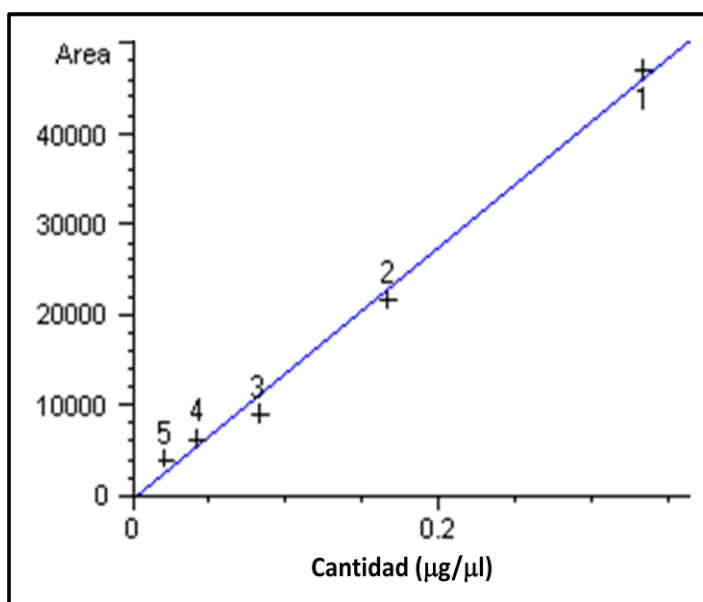
- You, H., Yamamoto, K., and Mak, T.W. 2006. Regulation of transactivation-independent proapoptotic activity of p53 by FOXO3a. *PNAS*. 103: 9051–9056.
- Yu, Z., Li, W., and Liu, F. 2004. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. *Cancer Lett*. 215: 159-166.
- Zhang, J.P., and Normark, S. 1996. Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. *Science*. 273(5279): 1234-6.
- Zörning, M., Baum, W., Hueber, A.O., and Evan, G. 2001. Cap 3: Programmed cell death and senescence. En: *The molecular basis of cancer*. Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA (editors). Saunders Company. 2nd Edit. United States of America. Pp: 19-40.
- Zorrilla-García, A.E., Eirez-Izquierdo, M., e Izquierdo-Expósito, M. 2004. Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Rev Cub Invest Biomed*. 23(1) supl.1: 51-57.

# **ANEXOS**

## ANEXO 1

### Curva de calibración de oligosacáridos

Las Figuras A.1.1, A.1.2 y A.1.3 muestran las curvas de calibración para rafinosa, verbascosa y estaquiosa, respectivamente. A partir de estas curvas, se interpoló la concentración de oligosacáridos de las muestras frijol común de la variedad Bayo Madero y su fracción no digerible.



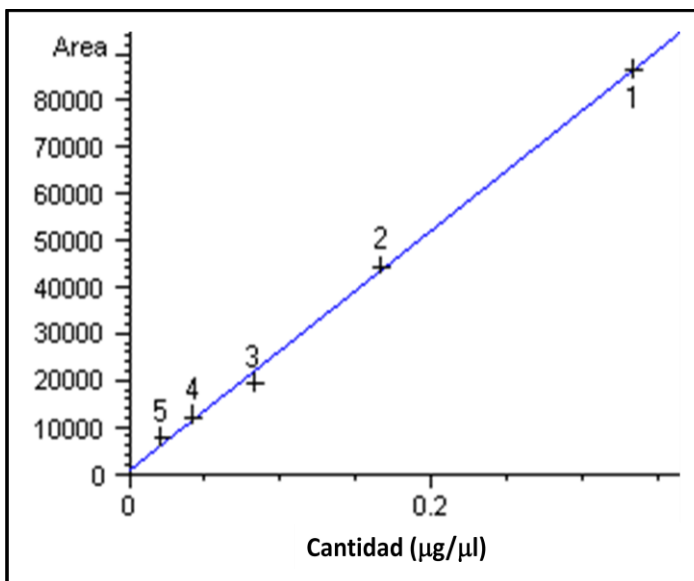
#### **Rafinosa**

Correlación 0.99668  
Fórmula  $y = mx + b$   
m: 139014.68938  
b: -297.28041  
x: Cantidad ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )  
y: Area

Figura A.1.1 Curva de calibración de rafinosa obtenida por HPLC.

Cada punto representa la media de tres experimentos independientes con tres repeticiones.

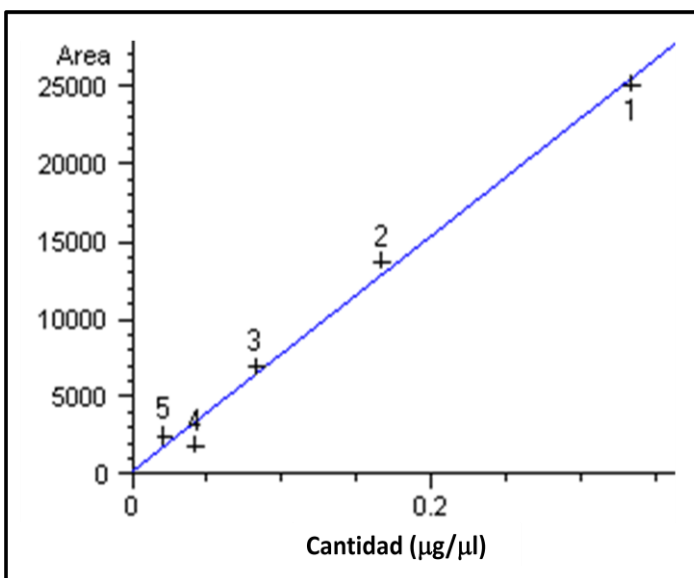




### Estaquiosa

Correlación 0.99901  
 Fórmula  $y = mx + b$   
 m: 257217.50839  
 b: 834.97661  
 x: Cantidad (µg/µl)  
 y: Area

Figura A.1.2 Curva de calibración de estaquiosa obtenida por HPLC.  
 Cada punto representa la media de tres experimentos independientes con tres repeticiones.



### Verbascosa

Correlación 0.99585  
 Fórmula  $y = mx + b$   
 m: 76017.61913  
 b: 186.71229  
 x: Cantidad (µg/µl)  
 y: Area

Figura A.1.3 Curva de calibración de verbascosa obtenida por HPLC.  
 Cada punto representa la media de tres experimentos independientes con tres repeticiones.

## ANEXO 2

### Cuantificación de fenoles totales

#### *Reactivos*

- Folin-Ciocalteu 1N (1:1 con agua destilada)
- Carbonato de sodio al 20%
- Metanol
- Ácido gálico (0.1 mg/ml)

#### Curva de calibración

Tubo	Solución ácido gálico (μl)	Agua destilada (μl)	Reactivo de Folin (μl)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (μl)
0	0	500	250	1250
1	20	480	250	1250
2	40	460	250	1250
3	60	440	250	1250
4	80	420	250	1250
5	100	400	250	1250
6	120	380	250	1250
7	140	360	250	1250
8	160	340	250	1250

1. Adicionar a cada tubo la cantidad de ácido gálico.
2. Adicionar a cada tubo la cantidad de agua destilada.
3. Adicionar a cada tubo la cantidad del reactivo de Folin.
4. Agitar por vortex.
5. Adicionar cantidad de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.
6. Dejar reposar 2 horas en oscuridad.
7. Leer en espectrofotómetro a 760 nm.

#### Determinación de fenoles totales en la muestra.

Adicionar los reactivos de la forma anteriormente descrita pero sustituyendo la solución de ácido gálico con 40 μl del extracto metanólico.

Si es necesario realizar diluciones.

### Curva de calibración de ácido gálico

La Figura A.2 muestra la curva de calibración para fenoles totales. La ecuación que se obtuvo fue  $y = 0.048x + 0.028$  con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.995. De esta curva se interpoló la concentración de fenoles totales de la muestras de la variedad Bayo Madero y su fracción no digerible, y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra liofilizada.

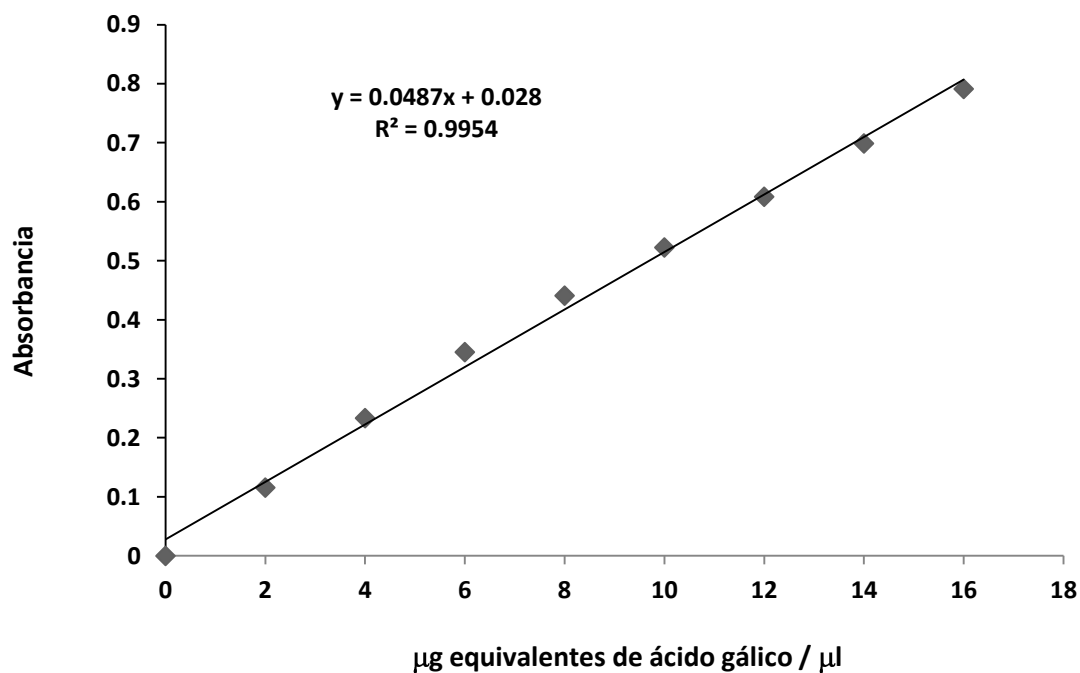


Figura A.2 Curva de calibración de fenoles totales obtenida por el método de Folin-Ciocalteu.

Cada punto representa la media de tres experimentos independientes con tres repeticiones.

## ANEXO 3

### **Cuantificación de taninos condensados**

#### ***Reactivos:***

- Ácido clorhídrico al 8% en metanol.
- Ácido clorhídrico al 4% en metanol.
- Vainillina al 1% en metanol (+) Catequina.
- Solución (1:1) de HCl 8%:vainillina 1% (tomar 10ml de cada reactivo y mezclar= 20 ml). Se preparan a momento de emplearse. No reutilizar.

#### **Curva de calibración**

Concentraciones: 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 y 0.1 mg/ml

- Pesar 0.008 g de (+)-catequina y aforar a 10 ml con metanol.
  - De la solución anterior tomar 3.75 ml y aforar a 5 ml con metanol.
  - De la solución anterior tomar 3.33 ml y aforar a 5 ml con metanol.
  - De la solución anterior tomar 2.5 ml y aforar a 5 ml con metanol.
  - De la solución anterior tomar 2.5 ml y aforar a 5 ml con metanol.
1. Los experimentos se realizan por triplicado.
  2. Colocar 50 µl de cada concentración en la placa de 96 pozos por triplicado.
  3. Adicionar 200µl de la solución 1:1 de HCl 8% : vainillina 1%. Debe adicionarse de 50 µl en 50 µl a cada uno de los pozos y repetir la operación hasta completar los 250 µl.
  4. Al blanco se le adicionan 50 µl de metanol más 200 µl de HCl 4%.
  5. Las muestras se tapan con papel aluminio.
  6. Se lee la absorbancia con filtros de 492-540nm.

#### **Determinación de taninos condensados en la muestra.**

#### ***Reactivos:***

- Metanol.
- Ácido clorhídrico.
- Vainillina
- Solución (1:1) de HCl 8% : vainillina 1% (tomar 10 ml de cada reactivo y mezclar = 20 ml). Se prepara al momento de emplearse. No reutilizar.
- Los experimentos se realizan por triplicado para cada muestra.

***Método:***

1. Colocar 200 mg de muestra en un matraz de 50 ml y adicionar 10 ml de metanol.
2. Cubrir la muestra con papel aluminio y agitar durante 24 h.
3. Centrifugar a 4,000 rpm por 10 min.
4. Tomar 50  $\mu$ l del sobrenadante (muestra) y colocarlo en los pozos.
5. Adicionar 200  $\mu$ l de la solución 1:1 de HCl 8% : vainillina 1%. Debe adicionarse de 50  $\mu$ l en 50  $\mu$ l a cada uno de los pozos y repetir la operación hasta completar los 250  $\mu$ l.
6. Se prepara un blanco al cual se le adicionan 50  $\mu$ l del sobrenadante (muestra y se le añaden 200  $\mu$ l de HCl al 4%).
7. Leer en MULTISKAN con filtros de 492 540 nm.
8. Comparar con la curva de calibración estándar de (+)-catequina.

### Curva de calibración (+)-catequina

En la Figura A.3 se muestra la curva de calibración de (+)-catequina. La ecuación que se obtuvo fue  $y = 0.271x + 0.007$  con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.996. De esta curva se interpoló la concentración de taninos condensados de las muestras de la variedad Bayo Madero y su fracción no digerible, y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de (+)-catequina por gramo de muestra liofilizada.

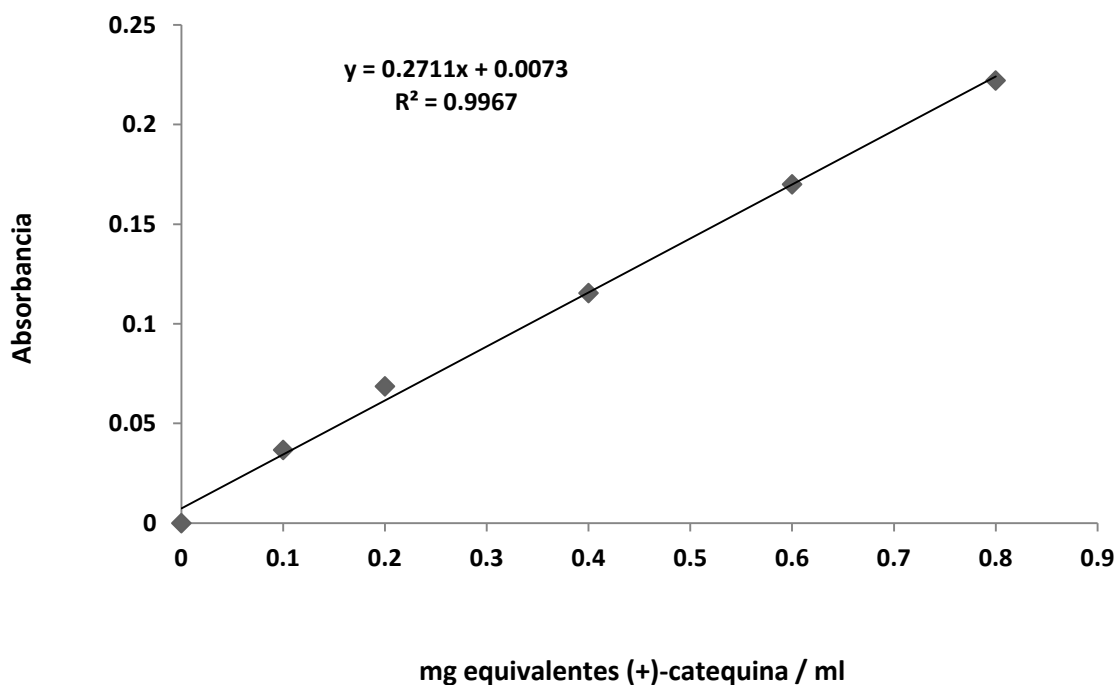


Figura A.3. Curva de calibración de (+)-catequina obtenida por el método de la vainillina-HCl para la cuantificación de fenoles.

Cada punto representa la media de tres experimentos independientes con tres repeticiones.

## ANEXO 4

### Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta

En la Figura A.4 se muestra la curva de calibración de ácidos grasos de cadena corta. Las ecuaciones obtenidas fueron para ácido acético  $y = 33.70x - 62.32$  con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.997; para ácido propiónico  $y = 24.45x - 47.59$  con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.997; para ácido butírico  $y = 10.85x - 24.96$  con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.996. A partir de esta curva, se interpoló la concentración de ácidos grasos de cadena corta en el contenido cecal, colónico y fecal de ratas tratadas con FC o FND de frijol cocido Bayo Madero e inducidas químicamente con AOM, y son expresados como mM equivalentes de ácido acético, propiónico y butírico por gramo de muestra.

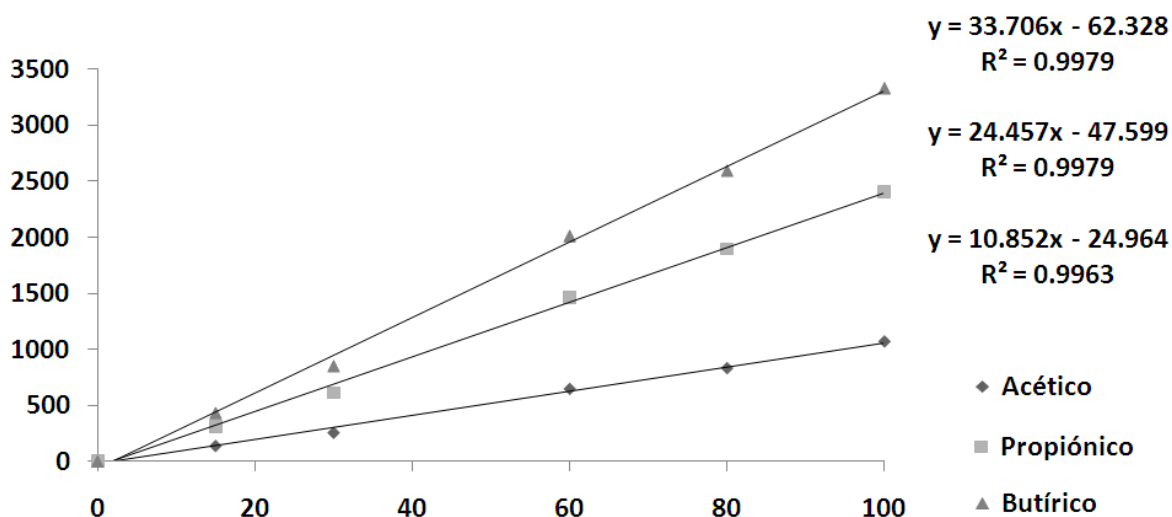


Figura A.4. Curva de calibración de ácidos grasos de cadena corta obtenida por cromatografía de gases. Cada punto representa la media y la desviación estándar de dos análisis independientes con dos repeticiones.

## ANEXO 5

### Actividad de $\beta$ -glucoronidasa

La Figura A.5 muestra la curva de calibración de la actividad de  $\beta$ -glucoronidasa. La ecuación obtenida fue  $y = 0.075x + 0.000$  con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.999. Partiendo de esta curva, se interpoló la actividad de la enzima  $\beta$ -glucoronidasa en el contenido cecal, colónico y fecal de ratas tratadas con FC o FND de frijol cocido Bayo Madero e inducidas químicamente con AOM, y es expresada como nmol / min / gramo de muestra.

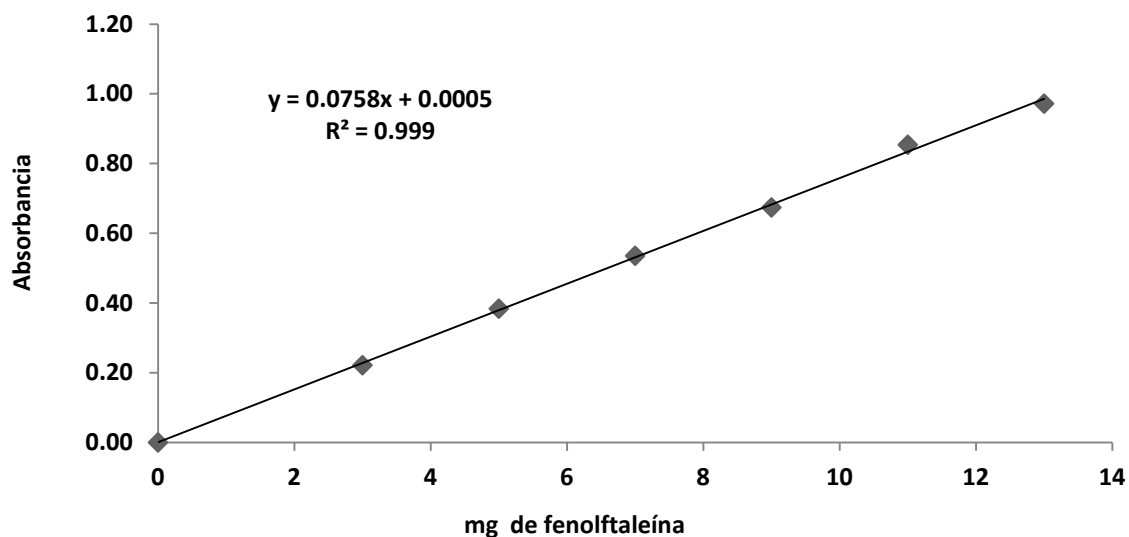


Figura A.5. Curva de calibración de la actividad de  $\beta$ -glucoronidasa.

Cada punto representa la media y la desviación estándar de tres análisis independientes con tres repeticiones.



## ANEXO 6

### Extracción de ARN

En la Figura A.6 se muestra el ARN extraído de los diferentes grupos experimentales.

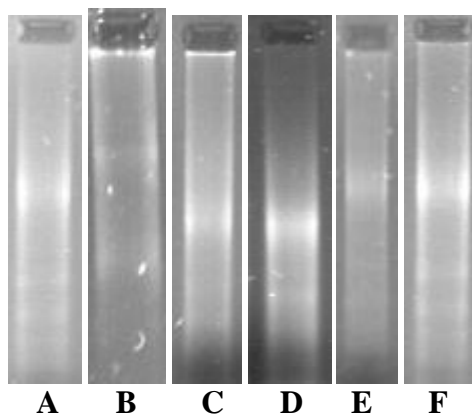


Figura A.6. ARN total de los grupos evaluados: A) Control, B) AOM, C) FC, D) FND, E) FC+AOM y F) FND+AOM.  
FC = Frijol cocido; FND = Fracción no digerible; AOM = Azoximetano.

## ANEXO 7

### Síntesis de ADNc

La Figura A.7 muestra los geles representativos del ADNc sintetizado a partir de los diferentes grupos experimentales durante la estandarización de los ciclos óptimos.

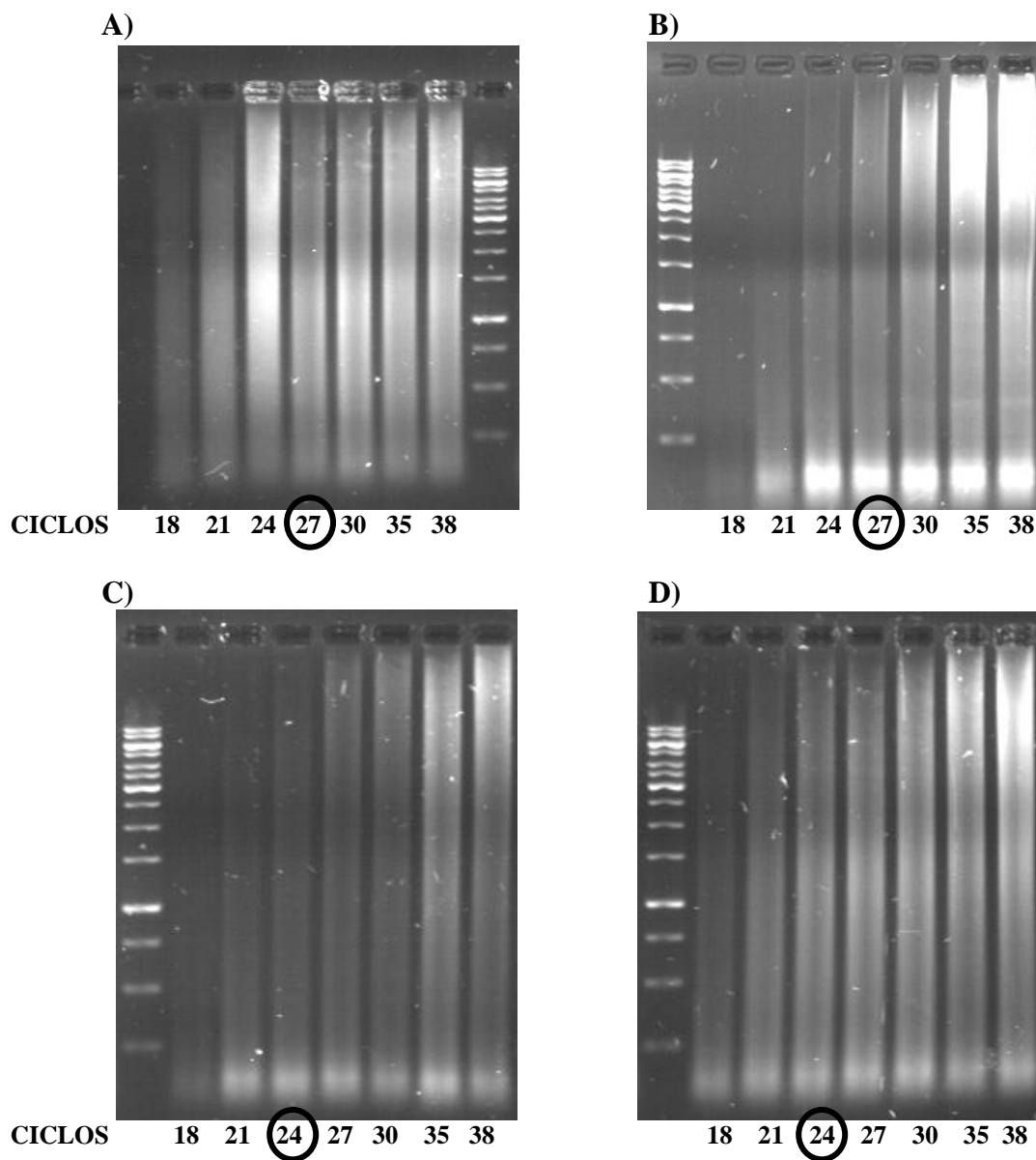


Figura A.7. Optimización de ciclos de PCR: A) Control, B) AOM, C) FC+AOM y D) FND+AOM. El círculo rojo indica el ciclo elegido como el óptimo para cada grupo de tratamiento.

FC = Frijol cocido; FND = Fracción no digerible; AOM = Azoximetano.

## ANEXO 8

Apaf1 A01	Apex1 A02	Atm A03	Bag1 A04	Bax A05	Bcl2 A06	Bid A07	Birc5 A08	Bnip3 A09	Brca1 A10	Brca2 A11	Btg2 A12
Casp2 B01	Casp9 B02	Ccnb2 B03	Ccne2 B04	Ccng1 B05	Ccng2 B06	Ccnh B07	Cdc25a B08	Cdc25c B09	Cdc2 B10	Cdk4 B11	Cdkn1a B12
Cdkn2a C01	Chek1 C02	Chek2 C03	Cradd C04	Vcan C05	Dapk1 C06	Dnmt1 C07	E2f1 C08	Egr1 C09	Ep300 C10	Ercc1 C11	Esr1 C12
Fadd D01	Faslg D02	Foxo3 D03	Gadd45a D04	Hif1a D05	Il6 D06	Jun D07	Kras D08	Lig4 D09	LOC367198 D10	Mcl1 D11	Mdm2 D12
Mlh1 E01	Msh2 E02	Myc E03	Myod1 E04	Nf1 E05	Nfkb1 E06	Numb E07	Pcna E08	Pmaip1 E09	Ppm1d E10	Prc1 E11	Prkca E12
Pten F01	Pttg1 F02	Rb1 F03	Rela F04	Rev3l F05	E2f3 F06	Parc F07	RGD1566319 F08	Rprm F09	Serpib5 F10	Sfn F11	Sirt1 F12
Stat1 G01	Tnf G02	Tnfrsf10b G03	Tp53 G04	Traf1 G05	Tp53bp2 G06	Tp73l G07	Tp73 G08	Zmat3 G09	Wt1 G10	Xrcc4 G11	Xrcc5 G12
Rplp1 H01	Hprt1 H02	Rpl13a H03	Ldha H04	Actb H05	RGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

172

Figura A.8. Diseño del arreglo de PCR con genes que participan en la cascada de señalización de p53 de rata (PARN-027A)

## ANEXO 9

### Extracción de proteínas en tejido animal

#### Solución amortiguadora para extracción de proteínas

##### *Reactivos*

Preparar las siguientes soluciones stock para 100 ml cada una

- Hepes 500 mM (0.5 M)  
11.915 g en 100 ml
- NaCl 1500 mM (1.5 M)  
8.766 g en 100 ml
- NaPP 100 mM (0.1 M)  
4.4671 g en 100 ml
- MgCl<sub>2</sub> 10 mM (0.01 M)  
0.2033 g en 100 ml
- NaF 500 mM (0.5 M)  
2.0995 g en 100 ml
- EDTA 20 mM (0.02 M)  
0.7604 g en 100 ml
- PMSF 60 mM (0.06 M)  
0.1046 en 100 ml de isopropanol. Alicuotar y congelar.
- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 200 mM (0.2 M)  
0.9192 g en 100 ml. Ver nota para su activación.
- CaCl<sub>2</sub> 25 mM (0.025M)  
0.2775 g en 100 ml

##### *Preparación de la solución amortiguadora*

De las soluciones stock se toman las siguientes cantidades de cada solución para preparar el buffer que se utilizará para poder homogenizar el tejido. El volumen restante es completado con agua HPLC (estos cálculos son para 1 ml de solución amortiguadora). La solución amortiguadora debe mantenerse en hielo durante su uso.

- |                          |        |
|--------------------------|--------|
| • Hepes 50 mM            | 100 µl |
| • NaCl 150 mM            | 100 µl |
| • NaPP 10 mM             | 100 µl |
| • MgCl <sub>2</sub> 1 mM | 100 µl |
| • NaF 50 mM              | 20 µl  |
| • EDTA 2 mM              | 100 µl |

- PMSF 2 mM 66.6  $\mu$ l
  - Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM 10  $\mu$ l
  - NP-40 1% 10  $\mu$ l
  - Glicerol 10% 100  $\mu$ l
  - SDS 0.01 g p/10 ml 0.001 g p/1 ml
  - CaCl<sub>2</sub> 1mM 40  $\mu$ l
- Agregar al final gota a gota.

**Nota:**

- Activación de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

Se realizan los cálculos 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 se congela.

## ANEXO 10

### Cuantificación de proteína por la técnica de Bradford

1. Se realiza una curva estándar como se muestra a continuación:

Dilución estándar (albúmina sérica bovina)	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )
100 $\mu\text{l}$ std + 500 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O	100
500 $\mu\text{l}$ + 500 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O	50
500 $\mu\text{l}$ + 500 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O	25
500 $\mu\text{l}$ + 500 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O	12.5
500 $\mu\text{l}$ + 500 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O	6.25
500 $\mu\text{l}$ + 500 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O	3.125
500 $\mu\text{l}$ + 500 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O	1.56

2. Colocar 10  $\mu\text{l}$  del estándar (albúmina sérica bovina) o la dilución más 200  $\mu\text{l}$  del reactivo de Bradford, dejar reaccionar 5 min.
3. Leer a 620 nm en microplaca.
4. Graficar y obtener ecuación.
5. Colocar 10  $\mu\text{l}$  de muestra más 200  $\mu\text{l}$  de reactivo de Bradford.
6. Sustituir absorbancia en la ecuación.

#### *Reactivo de Bradford*

- 5 mg de Azul de Coomassie G-250.
  - 2.5 etanol
  - 5 ml de ácido fosfórico
1. Aforar a 50 ml, mezclar en agitación hasta disolver.
  2. Filtrar y guardar en refrigeración.

## Curva de calibración de albúmina sérica bovina

En la Figura A.10 se muestra la curva de calibración de albúmina sérica bovina. La ecuación que se obtuvo fue  $y = 0.001x + 0.002$  con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.9990. De esta curva se interpoló la concentración de proteínas totales de los grupos de tratamientos evaluados expresados como  $\mu\text{g}$  equivalentes de albúmina por  $\mu\text{l}$  de muestra.

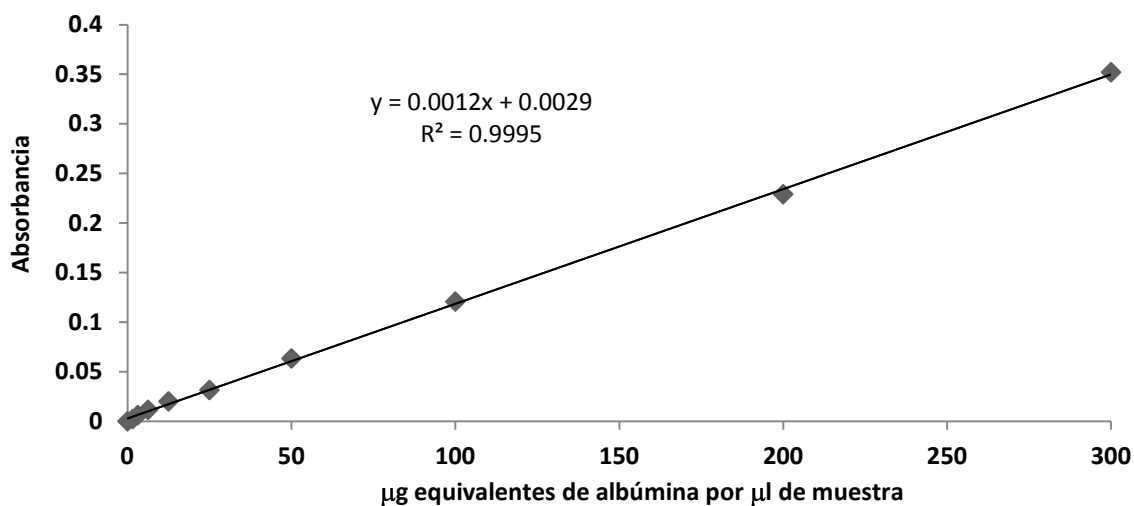


Figura A.10. Curva de calibración de la albúmina sérica bovina.

Cada punto representa la media y la desviación estándar de tres análisis independientes con tres repeticiones.

Cuadro A.10. Concentración de proteína de los diferentes tratamientos determinada por el método de Bradford.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math> del extracto de proteínas)</b>
Control	71.5
FC	52.6
FND	77.1
AOM	41.2
FC+AOM	40.7
FND+AOM	43.7

Cada valor representa la media de dos réplicas con dos repeticiones  
FC = Frijol cocido; FND = Fracción no digerible; AOM = Azoximetano.



## ANEXO 11

### **Solución digestora de proteínas (Laemmli)**

#### ***Reactivos***

- Glicerol 30% (1.5 ml)
- Tris-HCl 100 mM pH 6.8 (1 ml)
- SDS 10% (0.5 g)
- Azul de bromofenol 1% (0.05 g)
- Mercaptoetanol 4% (0.2 ml)

Adicionar las cantidades de cada reactivo y aforar a 5 ml con agua grado HPLC.

1. Después de la cuantificación, digerir la proteína 1:1 (1 ml proteína : 1 ml solución digestora) y poner en ebullición por 5 min.
2. Congelar y usar en electroforesis.
3. No olvidar re-calcular el contenido de proteína para la dilución con esta solución.

## ANEXO 12

### Electroforesis SDS-PAGE

#### *Reactivos*

- Acrilamida 30% y bisacrilamida 0.938%  
Para 200 ml    acrilamida    60 g  
                  Bisacrilamida    1.876 g  
                  Agua destilada    200 ml  
Almacenar en refrigeración en frasco ámbar o aluminio.
- Glicerol 79.5%  
Glicerol                            79.5 ml  
Agua destilada                    20.5 ml
- Persulfato de amonio al 10%  
1 g para 10 ml de agua.  
Alicuotar en eppendorff y congelar.
- Buffer separador pH 8.8 (2x)  
Tris base                            18.15 g  
Agua destilada                    100 ml  
Diluir el tris base en 80 ml de agua destilada y ajustar pH a 8.8 con HCl.  
Aforar a 100 ml.
- Buffer concentrador pH 6.8 (1x)  
Tris base                            6 g  
Agua destilada                    100 ml  
Diluir tris base en 80 ml de agua destilada.  
Ajustar pH 6.8 con HCl y aforar a 100 ml.
- SDS 10%  
1 g en 10 ml de agua destilada.
- Buffer superior  
Tris base (0.1 M)                    12.11 g/l  
Tricina (0.1 M)                    17.76 g/l  
SDS (0.1%)                        1 g/l
- Buffer inferior  
Tris-HCl 8.9 (0.2 M)  
Tris                                    24.22 g/l  
HCl                                    1.1 ml/l

- Solución de tinción de geles
 

Azul de Coomasie	1 g
Solución de lavado	100 ml
  
- Solución para teñir geles
 

Metanol	400 ml
Ácido acético glacial	100 ml
Agua destilada	500 ml

### **Procedimiento para electroforesis SDS-PAGE**

1. Limpiar con etanol los vidrios y peines.
2. Colocar los vidrios en los sujetadores y luego montar en los soportes.
3. Llenar de agua para verificar que no haya fugas. Luego se vacía el agua y se seca con un papel filtro.
4. Se coloca el peine y se marca a medio centímetro debajo del peine de la base del pozo para indicar el tamaño del gel separador.
5. Se preparan los geles, primero el separador (respetando el orden en el que aparecen los reactivos), luego se le adicionan unas gotas de agua para sellar. Se espera a que solidifique aproximadamente 20 minutos y se retira el agua con papeles filtro tratando de no tocar el gel.
6. Se prepara el gel de condensación y se agrega, se pone el peine. Se espera a que solidifique y se marcan los pozos.
7. Se montan los vidrios en la cámara de electroforesis y se retiran los peines. Se llena con buffer superior, verificando que se llenen los pozos de buffer.
8. Se cargan las muestras digeridas en los pozos.
9. Colocar 5  $\mu$ l del marcador o estándar para verificar PM.
10. Correr a 120 volts durante 120 minutos para tejido de colon en frío (4°C), en refrigerador.

Concentración de los geles para electroforesis

<b>Reactivo</b>	<b>Gel separador 10%</b>	<b>Gel condensador 4%</b>
Acrilamida (30%)- BisAcrilamida (0.938)	3.3 ml	0.4 ml
Tris-HCl 1 M pH 6.8	-----	0.75 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	3.3 ml	1.5 ml
SDS 10%	0.1 ml	0.1 ml
Glicerol 79.5 %	1.3 ml	-----
H <sub>2</sub> O HPLC	2 ml	3.65 ml
Persulfato de amonio	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l
Temed	8 $\mu$ l	8 $\mu$ l

## **Tinción de geles con azul de Coomassie**

1. Después de la electroforesis, colocar uno de los geles en la solución de tinción con azul de Coomassie de 5 a 10 minutos en agitación.
2. Retirar el colorante (reusable) y lavar con la solución de lavado hasta visualizar las bandas, aproximadamente 15 minutos.
3. Cambiar la solución de lavado las veces que sea necesario. Dejar toda la noche en solución de lavado si es necesario.

## **Transferencia semi-seca**

### ***Reactivos***

- Buffer de transferencia pH 9.0 - 9.4
  - Tris base 48 mM                      5.82 g
  - Glicina 39 mM                        2.92 g
  - Aforar a 1 l. No ajustar pH. Guardar en refrigeración.
- Solución para teñir membrana
  - Rojo Ponceau 0.1%                    0.04 g
  - Metanol 50%                            20 ml
  - Ácido acético 10%                    4 ml
  - Aforar a 40 ml con agua destilada.
- Solución 1 para desteñir
  - Metanol 80%                            80 ml
  - Ácido acético 10%                    10 ml
  - Aforar a 100 ml con agua destilada.
- Solución 2 para desteñir
  - Metanol 50%                            50 ml
  - Ácido acético 10%                    10 ml
  - Aforar a 100 ml con agua destilada.

## **Procedimiento de transferencia semi-seca**

1. Una vez terminada la electroforesis, colocar los geles en buffer de transferencia mínimo 15 minutos.
2. Activar membranas de PVDF:
  - Pasar por metanol
  - Pasar por agua HPLC
  - Colocarla en buffer de transferencia por 15 minutos.

3. Colocar 3 filtros delgados o 2 gruesos previamente humedecidos en buffer de transferencia en el equipo de transferencia. Utilizar rodillo para eliminar burbujas.
4. Colocar membrana en los filtros.
5. Colocar encima el gel con las proteínas hacia arriba.
6. Colocar otros 3 filtros delgados o 2 filtros gruesos y pasar rodillo.
7. Limpiar el excedente de buffer con papel.
8. Cerrar el equipo y correr a 15 volts durante 18 minutos.
9. Al terminar de correr se tiñe la membrana con rojo de ponceau y se destiñe con las soluciones 1 y 2.
10. Si la membrana no se utiliza en el momento, se guarda entre 2 papeles filtros secos y se cubren con papel aluminio en el refrigerador.

### **Tinción de membranas PVDF**

1. Poner membrana en solución para teñir (rojo ponceau) durante 5 minutos. La solución se reutiliza.
2. Desteñir membrana con solución 1 por 5 minutos. Tirar solución.
3. Desteñir membrana con solución 2 por 10 minutos. Tirar solución.

### **Western blot**

#### ***Reactivos***

- Soluciones stock:

Tris-HCl 1 M pH 8  
                   12.11 g para 100 ml  
 NaCl 5 M  
                   29.22 g para 100 ml.  
 Pulverizar en mortero y refrigerar.

- TBS

Tris-HCl 0.01 M pH 8           10 ml  
                   (partir de solución stock)  
 NaCl 5 M                       30 ml  
 Aforar a 1 l. Filtrar y refrigerar.

- TTBS

Tris-HCl 1 M                   10 ml  
                   (partir de solución stock)  
 NaCl 5 M                       30 ml  
 Tween 20                       1 ml  
 Aforar a 1l. Filtrar y refrigerar.

- Solución bloqueadora
 

Leche en polvo descremada	0.375 g (para 2 pozos y anticuerpos)
TBS	75 ml

 Filtrar y refrigerar. Utilizar máximo en 2 días.
  
- Anticuerpos
 

Leche bloqueadora	3 ml
Anticuerpo primario	dependiendo de la proteína
Anticuerpo secundario	dependiendo de la proteína

### **Procedimiento para Western blot**

- 1 El western blot se realiza siguiendo la metodología descrita por el sistema para detección de proteínas SNAP i.d. (Millipore, Corporation, Billerica, MA).
- 2 Los casetes se preparan de acuerdo al protocolo de manufactura y la membrana de PVDF conteniendo las proteínas y activada con metanol y agua, se coloca en su interior, con las proteínas hacia abajo.
- 3 Los sitios no específicos de la membrana se bloquean con una solución bloqueadora al 0.5% aplicando vacío.
- 4 La membrana se incuba durante 10 minutos con el anticuerpo primario de interés (15:1500) a temperatura ambiente.
- 5 Los anticuerpos se disuelven en solución bloqueadora al 0.5%. Transcurrido el tiempo de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lava con un esquema de 3 lavados con TTBS aplicando vacío continuo.
- 6 Posteriormente, la membrana se incuba con un segundo anticuerpo de interés (2.5:1500) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 7 Transcurrido este tiempo, la membrana se lava 3 veces con TTBS aplicando vacío continuo.
- 8 La membrana se incuba con la solución de quimioluminiscencia durante el tiempo necesario para cada proteína de interés exponiendo la membrana a una película fotográfica. Las bandas se cuantifican con software ImagenJ versión 1.39 y los valores se expresan como porcentaje de intensidad de pixeles.