



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DE UN CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE FRIJOL Y DE FRIJOL
ENTERO EN UN MODELO DE OBESIDAD, Y SU EFECTO EN LA MICROBIOTA
INTESTINAL**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

Q A. IRMA ANGÉLICA HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARÍA AMANDA GÁLVEZ MARISCAL
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA
Facultad de Química

DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
Instituto de Química

Ciudad Universitaria, CDMX. Abril, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

TUTOR PRINCIPAL: DRA. MARÍA AMANDA GÁLVEZ MARISCAL. Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA. Facultad de Química

DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS. Instituto de Química

DRA. NIMBE TORRES Y TORRES CO-TUTORA INVITADA. INCMNSZ

SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LAB. 312, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

Planta Piloto del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por el CONACYT para la realización de esta tesis.

Financiamiento: Provino de los fondos PAIP- FQ 5000-9096

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, POR HABERME PERMITIDO FORMAR PARTE DE SU COMUNIDAD DESDE LA ENP HASTA EL POSGRADO. POR LLENARME DE ORGULLO Y DE INVALUABLES EXPERIENCIAS AL SER ESTUDIANTE DE LA FACULTAD DE QUÍMICA QUE ME HA FORMADO ACADÉMICA Y SOCIALMENTE. SIN DUDA, LA MÁXIMA CASA DE ESTUDIOS HA FORMADO RAÍCES SÓLIDAS EN MI FORMACIÓN PROFESIONAL. EL CORAZÓN DE UNIVERSITARIA ME ACOMPAÑARÁ POR SIEMPRE.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

A LA DRA. AMANDA GÁLVEZ MARISCAL, POR SER MI ASESORA, BRINDARME SU VALIOSO APOYO Y CONOCIMIENTOS PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRESENTE TESIS. GRACIAS POR SU CONFIANZA Y SUS ENSEÑANZAS QUE VAN AÚN MÁS ALLÁ DEL ÁMBITO ACADÉMICO, SIN DUDA UNA GRAN GUÍA.

A LA DRA. NIMBE TORRES y AL DR. ARMANDO TOVAR, GRACIAS POR SU APOYO Y ASESORÍA PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS. Y POR PERMITIRME TRABAJAR CON SU GRAN EQUIPO DE INVESTIGACIÓN.

A LA DRA. AMELIA FARRÉS Y LA DRA. MARICARMEN QUIRASCO, POR SU APOYO INCONDICIONAL DURANTE MI ESTANCIA EN EL LABORATORIO 312. SON PARTE IMPORTANTE DE MI FORMACIÓN PROFESIONAL.

AL DR. ROBERTO ARREGUÍN POR SU PARTICIPACION EN EL COMITÉ TUTORAL Y SUS RECOMENDACIONES.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO POR SU REVISIÓN Y ASESORÍA: DR. ADRIÁN OCHOA, DRA. MARCIA HIRIART, DRA. MA. ELENA IBARRA, DR. ARMANDO TOVAR Y DRA. ANDREA SACHI DÍAZ.

A LA PAS. Q.A SUSANA LIMA Y AL M. EN C. MANUEL CAMPOS, POR SU TRABAJO EN LA TESIS (EN PROCESO) “TRATAMIENTO TÉRMICO EN LA PRODUCCIÓN DE UN CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE FRIJOL (*PHASEOLUS VULGARIS L.*)”

A LA DRA. PERLA OSORIO, POR EL ANÁLISIS DE ALMIDÓN Y ALMIDÓN RESISTENTE.

*A mis abuelitos Emma Carrillo Sandoval y Nieves
Velázquez Trejo q.e.p.d
Porque han sido la guía de nuestras vidas,
y lo seguirán siendo
hasta el final de nuestros caminos.*

Dedicatorias

A Dios, por darme la fortaleza y compañía diaria. A la vida por permitirme elegir este camino. Una meta cumplida es el inicio de un nuevo sueño.

A mi familia que me ha apoyado de manera incondicional en cada paso que doy, por siempre estar unidos y ser un mismo equipo. Sin duda, este objetivo logrado también es de ustedes. Gracias a mis padres por ser los mejores y porque siempre nos han considerado su prioridad.

Gracias mamá por todas tus enseñanzas y paciencia. En especial por enseñarme a nunca rendirme, a sobretodo permanecer fiel a mis ideales y a mi forma de ser.

Gracias papá por tus consejos, por tu recomendación de ser mejor día con día. Y por inculcarnos que sea cual sea la situación siempre hay un aprendizaje.

A Ivonne, eres la mejor hermana. Me encanta que compartamos el camino de la vida lleno de diversión, creatividad, alegría y sonrisas. Y aunque a veces se llegaran a presentar situaciones con algunas dificultades, es bueno saber que siempre estarás allí y sobretodo lo enfrentaremos juntas con la astucia que te caracteriza y que tanto me complementa.

A mi tía Hilda y a mi tía Emma, gracias por acompañarme desde mi infancia, sin duda han formado parte importante en mi desarrollo. Y a las familias Jiménez Velázquez por su incondicional apoyo.

A todos mis compañeros del laboratorio 312 de la FQ, por hacer aún más agradable la estancia desde que iba en la licenciatura y al equipo Gálvez: Q.A.Gaby y a los M.en C. Julia, Víctor, y Cindy.

A todos mis compañeros del INCMNSZ, especialmente a la M. en C. Mónica Sánchez y al Q. Jonathan M. por su apoyo.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. EL FRIJOL EN LA DIETA TRADICIONAL MEXICANA.....	3
2.2. CAMBIOS RECIENTES EN LA DIETA DEL MEXICANO	3
2.3. PROBLEMAS DE SALUD RELACIONADOS CON LA ALIMENTACIÓN.....	5
2.3.1. Sobrepeso y obesidad.....	5
2.3.2. Diabetes.....	6
2.4. ÍNDICE GLUCÉMICO	8
2.5. SÍNDROME METABÓLICO	8
2.6. INSULINA	9
2.7. LEPTINA.....	10
2.8. INFLEXIBILIDAD METABÓLICA	11
2.8.1. Coeficiente respiratorio	12
2.9. LEGUMINOSAS	13
2.11. FRIJOL	14
2.11.1. Consumo de frijol.....	14
2.11.2. Clasificación botánica y morfología del frijol.....	14
2.11.3. Composición nutrimental y principios bioactivos del frijol	16
2.11.5. Factores tóxicos y antinutricionales del frijol	19
2.12. MICROBIOTA INTESTINAL.....	21
2.12.1. Funciones principales de la microbiota intestinal.....	22
3. ANTECEDENTES	24
3.1. Antecedentes del grupo de trabajo	24
4. JUSTIFICACIÓN	25
5. HIPÓTESIS	26
6. OBJETIVOS	26
6.1. Objetivo General.....	26
6.2. Objetivos Particulares	26
7. METODOLOGÍA	27
7.1. Diseño experimental.....	27
7.2. Obtención del concentrado de proteína de frijol negro	28

7.3 Obtención del frijol cocido deshidratado entero	30
7.4. Evaluación en modelo animal	30
7.5 Composición de la dieta.....	32
7.6. Determinación de composición corporal.....	33
7.7. Medición de la curva de tolerancia a la glucosa (CTGO) de los animales de experimentación	33
7.7.1. Método de la glucosa oxidasa	33
7.8. Determinación de coeficiente respiratorio y volumen de Oxígeno.....	34
7.9. Determinación de parámetros bioquímicos	34
7.9.1. Determinación de Glucosa.....	34
7.9.2. Determinación de colesterol.....	35
7.10. Determinación de Insulina, lipopolisacárido (LPS), leptina y adiponectina.	35
7.11. Cálculo del índice de resistencia a la insulina	36
7.12. Extracción de RNA a partir de hígado	36
7.13. Síntesis de cDNA por medio de la reacción transcriptasa reversa	37
7.14. Expresión de los factores de transcripción SREBP-1 y FAS en hígado mediante qPCR.....	37
7.15. Extracción de DNA a partir de heces fecales	39
7.16. Caracterización de las poblaciones microbianas en el intestino de ratas experimentales	39
7.17. Análisis estadístico.....	42
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
8.1. Harina de frijol crudo y concentrado de frijol.....	43
8.2. Evaluación en modelo animal	44
8.2.1. Curva de crecimiento en ratas Wistar macho.....	44
8.2.2. Consumo de alimento	47
8.2.3. Composición corporal	48
8.2.4. Conclusiones parciales	50
8.3. Calorimetría	50
8.3.1. Coeficiente respiratorio (RER).....	50
8.3.2. Volumen de Oxígeno (VO ₂).....	53
8.3.3. Conclusiones parciales	55
8.4. Curva de tolerancia a la glucosa.....	55
8.4.1. Conclusiones parciales	58

8.5. Parámetros bioquímicos en suero de los diferentes grupos experimentales	58
8.5.1. Glucosa.....	59
8.5.2. Colesterol.....	59
8.5.3. Triglicéridos	59
8.5.4. Proteína C reactiva, creatinina y urea	59
8.5.5. Conclusiones parciales	63
8.6. Determinación de insulina, adiponectina, leptina y LPS.	63
8.6.1 Determinación de Insulina en suero	63
8.6.2. Determinación del índice HOMA	64
8.6.2. Determinación de leptina y adiponectina	66
8.6.3. Determinación de Lipopolisacárido (LPS).....	68
8.6.4. Conclusiones parciales	69
8.7. Extracción de RNA a partir de hígado	70
8.8. Rangos dinámicos para ciclofilina, HPRT, FAS y SREBP1	71
8.9. Expresión relativa de SREBP1 y FAS	73
8.10. Conclusiones parciales	75
8.11. Caracterización de las poblaciones microbianas en el intestino de ratas experimentales	76
8.11.1. Calidad y cuantificación de ADN a partir de heces.....	76
8.11.2. Caracterización por qPCR	78
8.11.3. Conclusiones parciales.....	80
9. DISCUSIÓN FINAL	81
10. CONCLUSIONES.....	83
11. BIBLIOGRAFÍA	84
12. ANEXO	91
ANEXO I. Determinación de insulina	91
ANEXO II. Determinación de leptina.....	92
ANEXO III. Determinación de adiponectina.....	93
ANEXO IV. Determinación de LPS (Lipopolisacárido)	94
ANEXO V.....	95
ANEXO VI. Extracción de DNA a partir de heces fecales de rata mediante kit QIAamp DNA Mini Kit Stool (Qiagen).....	96
ANEXO VII.- Concentración de los RNA extraídos y su relación 260/280.	97

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.- INTERVALOS DE ÍNDICE DE MASA CORPORAL Y SU CLASIFICACIÓN SEGÚN LA OMS (2006).....	5
TABLA 2.- DEFINICIÓN MUNDIAL DEL SÍNDROME METABÓLICO PROPUESTO POR LA FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE DIABETES (ZIMMET ET AL., 2005).	8
TABLA 3.- COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES	32
TABLA 4.- SECUENCIAS DE CEBADORES UTILIZADOS PARA EVALUAR LA EXPRESIÓN DE SREBP1 Y FAS.....	38
TABLA 5.- MEZCLA DE REACCIÓN UTILIZADAS PARA LOS GENES CONTROL ENDÓGENOS (CICLOFILINA Y HPRT) Y LOS GENES DE INTERÉS (SREBP1 Y FAS)	38
TABLA 6.- SECUENCIAS DE CEBADORES UTILIZADOS	40
TABLA 7.- MEZCLA DE REACCIÓN UTILIZADAS PARA EL GEN UNIVERSAL, <i>FIRMICUTES</i> , <i>PREVOTELLA SPP.</i> , <i>BIFIDOBACTERIUM SPP.</i> Y <i>AKKERMANSIA SPP.</i>	40
TABLA 8.- MEZCLA DE REACCIÓN UTILIZADAS PARA LA BÚSQUEDA DE <i>BACTEROIDETES</i> ...	40
TABLA 9.- CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA PCR TIEMPO REAL (ROCHE) PARA LA CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE GEN UNIVERSAL Y <i>PREVOTELLA SPP.</i>	41
TABLA 10.- CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA PCR TIEMPO REAL (ROCHE) PARA LA CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE <i>FIRMICUTES</i>	41
TABLA 11.- CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA PCR TIEMPO REAL (ROCHE) PARA LA CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE <i>BACTEROIDETES</i> Y <i>ACTINOBACTERIAS</i>	41
TABLA 12.- CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA PCR TIEMPO REAL (ROCHE) PARA LA CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE <i>AKKERMANSIA SPP.</i> Y <i>BIFIDOBACTERIUM SPP.</i>	41
TABLA 13.- ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL (AQP) DE HARINA DE FRIJOL NEGRO BOLA, CONCENTRADO DE FRIJOL NEGRO Y FRIJOL ENTERO DESHIDRATADO.	43
TABLA 14.- % DE ALMIDÓN Y ALMIDÓN RESISTENTE EN EL CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE FRIJOL Y EL FRIJOL ENTERO DESHIDRATADO.....	44
TABLA 15.- % DE ALMIDÓN Y ALMIDÓN RESISTENTE EN LAS DIETAS EXPERIMENTALES.....	44
TABLA 16.- DATOS DE GANANCIA FINAL (G) DE PESO DE CADA GRUPO	46
TABLA 17.- % DE GRASA Y MÚSCULO AL FINAL DEL EXPERIMENTO.....	50
TABLA 18.- VALORES DE RER PROMEDIO EN ETAPA DE AYUNO Y POSTPRANDIO.....	53
TABLA 19.- COMPARATIVO (%) ÁREA BAJO LA CURVA DE LOS DISTINTOS GRUPOS, RESPECTO A LA DIETA CONTROL Y DIETA DAG + S.....	58
TABLA 20.- PARÁMETROS BIOQUÍMICOS OBTENIDOS EN RATAS EN AYUNO.	62
TABLA 21.- PARÁMETROS BIOQUÍMICOS OBTENIDOS EN RATAS SACRIFICADAS DESPUÉS DE RETO METABÓLICO.....	62

TABLA 22.- VALORES DE INSULINA EN AYUNO Y RETO METABÓLICO DE TODOS LOS GRUPOS.....	64
TABLA 23.- VALORES DE ÍNDICE HOMA	685
TABLA 24.- VALORES DE LEPTINA Y ADIPONECTINA EN AYUNO Y RETO METABÓLICO	68
TABLA 25.- VALORES DE LPS EN SUERO DE TODOS LOS GRUPOS EXPERIMENTALES..	69
TABLA 26.- CONCENTRACIONES OBTENIDAS DE LAS MUESTRAS DE ADN.	77

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- SOBREPESO Y OBESIDAD EN MÉXICO (ENSANUT, 2012).....	6
FIGURA 2.- FACTORES QUE AFECTAN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN DIABETES TIPO1 Y 2.....	10
FIGURA 3.- ESTRUCTURA INTERNA Y EXTERNA DEL FRIJOL.	15
FIGURA 4.- ESTRUCTURAS DE LOS CRISTALES DE PROTEÍNAS DEL FRIJOL COMÚN.	19
FIGURA 5.- EFECTO DE LA FERMENTACIÓN DE LA FIBRA DIETARIA EN EL COLON.....	23
FIGURA 6.- DIAGRAMA DEL PROCESO MODIFICADO DE SALINAS 2014.....	29
FIGURA 7.- DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS.....	44
FIGURA 8.- CURVA DE CRECIMIENTO Y GANANCIA DE PESO DE RATAS WISTAR MACHO DE TODOS LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.....	45
FIGURA 9.- CURVAS DE GANANCIA DE PESO.	46
FIGURA 10.-GANANCIA DE PESO PROMEDIO.....	46
FIGURA 11.- INGESTA CALÓRICA DE ALIMENTO DE TODOS LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.....	47
FIGURA 12.- PORCENTAJE DE GRASA ANTES DEL INICIO DE LA DIETA.....	48
FIGURA 13.- PORCENTAJE DE MÚSCULO ANTES DEL INICIO DE LA DIETA.....	49
FIGURA 14.- PORCENTAJE DE GRASA DE TODOS LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.....	49
FIGURA 15.- PORCENTAJE DE MÚSCULO DE TODOS LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.....	49
FIGURA 16.-RER DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES	52
FIGURA 17.- RER PROMEDIO EN LA ETAPA DE AYUNO Y POSTPRANDIO.	52
FIGURA 18.- VALORES DE VO₂ EN AYUNO Y POSTPRANDIO.....	54
FIGURA 19.- VO₂ PROMEDIO EN LA ETAPA DE AYUNO Y POSTPRANDIO.....	54
FIGURA 20.- VO₂ PROMEDIO EN LAS 24 HORAS DE ESTUDIO.....	55
FIGURA 21.- CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA DE TODOS LOS GRUPOS.....	56
FIGURA 22.- CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA DEL GRUPO CONTROL, CONCENTRADO Y FRIJOL ENTERO.....	57
FIGURA 23.- CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA DE TODOS LOS GRUPOS CON DAG.57	

FIGURA 24.- ÁREA BAJO LA CURVA DE LAS CTGO DE LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES.....	57
FIGURA 25.- GLUCOSA, COLESTEROL Y TG EN RATAS SACRIFICADAS EN AYUNO Y LAS SOMETIDAS A RETO METABÓLICO.....	60
FIGURA 26.- PROTEÍNA C REACTIVA, CREATININA Y UREA EN RATAS SACRIFICADAS EN AYUNO Y LAS TRATADAS PREVIAMENTE CON RETO METABÓLICO.....	61
FIGURA 27.- NIVELES DE INSULINA EN AYUNO Y TRAS ENFRENTARSE AL RETO METABÓLICO.....	64
FIGURA 28.- GRÁFICO DE ÍNDICE HOMA	65
FIGURA 29.- GRÁFICO DE LEPTINA Y ADIPONECTINA OBTENIDOS EN AYUNO Y TRAS UN RETO METABÓLICO.....	67
FIGURA 30.- GRÁFICO DE LPS OBTENIDOS EN GRUPOS EN AYUNO Y EN RETO METABÓLICO.....	69
FIGURA 31.- ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LAS MUESTRAS DE RNA.....	70
FIGURA 32.- GEL DE ELECTROFORESIS CAPILAR PARA LAS MUESTRAS DE RNA.....	71
FIGURA 33.- RANGOS DINÁMICOS Y CURVA DE DISOCIACIÓN DE CEBADORES PARA HPRT Y CICLOFILINA.....	72
FIGURA 34.- RANGOS DINÁMICOS Y CURVA DE DISOCIACIÓN DE CEBADORES PARA SREBP1 Y FAS.....	73
FIGURA 35.- EXPRESIÓN RELATIVA DE SREBP1 Y FAS.....	75
FIGURA 36.- ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ADN.....	76
FIGURA 37.- GEL DE ELECTROFORESIS CAPILAR PARA MUESTRAS DE ADN.....	76
FIGURA 38.- ABUNDANCIA RELATIVA DE LAS DIFERENTES <i>PHYLA</i>	79
FIGURA 39.- ABUNDANCIA RELATIVA DE <i>PREVOTELLA SPP.</i> , <i>AKKERMANSIA SPP.</i> Y <i>BIFFIDOBACTERIUM SPP.</i>	80

GLOSARIO Y ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
cDNA	ADN complementario
CTGO	Curva de tolerancia a la glucosa vía oral
DAG	Dieta alta en grasa
DAG + S	Dieta alta en grasa con 5% de sacarosa en agua de bebida
DAG Cas + S	Dieta alta en grasa con 24% de caseína, con 5% de sacarosa en agua de bebida
DAG+S + Concentrado	Dieta alta en grasa con 24% de proteína de concentrado de proteína de frijol, con 5% de sacarosa en agua de bebida.
DAG+S + Frijol entero	Dieta alta en grasa con 24% de proteína procedente de concentrado de frijol y frijol entero, con 5% de sacarosa en agua de bebida.
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
Dieta Control	Dieta con 17% de proteína (caseína). Cubre requerimientos de dieta AIN.
Dieta Concentrado	Dieta con 17% de proteína (de concentrado de proteína de frijol).
Dieta Frijol entero	Dieta con 17% de proteína (de concentrado de proteína y frijol entero).
FAS	Sintasa de ácidos grasos
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa
IG	Índice glicémico
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
LPS	Lipopolisacárido
mRNA	RNA mensajero
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
OID	Obesidad inducida por dieta
RER	Coeficiente respiratorio
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa- Transcriptasa reversa
SCFAs	Ácidos grasos de cadena corta
SREBP1	Proteína de unión al elemento regulador de esterol
TG	Triglicéridos
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
UIT	Unidades inhibitoras de tripsina
UniProtKB	Universal Protein Knowledgebase



1. RESUMEN

El frijol en México es un producto estratégico en el desarrollo rural y social del país, ya que representa una tradición de consumo y producción, así como disponibilidad, accesibilidad y destacable valor nutrimental.

Actualmente se ha observado una marcada disminución en el consumo de alimentos tradicionales que se han sustituido por alimentos procesados o refinados de trigo con elevadas cantidades de azúcares y grasas; influyendo en el estado metabólico y en el desarrollo obesidad, diabetes y síndrome metabólico.

En investigaciones anteriores (Quiñones, 2010; Márquez, 2011; Salinas 2014; Lima, 2018), se desarrolló un concentrado de proteína de frijol, con la finalidad de buscar diversificar el uso del frijol como ingrediente funcional para el desarrollo de nuevos productos alimenticios que contribuya con una fuente de proteína, además de proporcionar beneficios a la salud.

En este trabajo se evaluó el efecto del consumo del concentrado de proteína de frijol negro y de frijol entero en un modelo de obesidad inducida por dieta (OID) (ratas Wistar), sus consecuencias metabólicas y los efectos en la microbiota intestinal. Paralelamente se alimentó a otro grupo de animales con dieta alta en grasa con caseína como fuente de proteína. Además de los grupos control con dietas de caseína, concentrado de frijol y frijol entero.

Lo anterior permitió evaluar, además del papel de la proteína vegetal, a los componentes del frijol completo como: fibra, almidón y almidón resistente presentes en el grano completo cocido, siendo que en el concentrado de proteína de frijol se encuentran en menor proporción respecto al grano completo.

Se evaluaron parámetros bioquímicos, leptina, adiponectina, CTGO (curva de tolerancia a la glucosa), LPS, RER (coeficiente respiratorio), composición corporal, expresión de factores de transcripción que regulan la expresión de genes relacionados con lipogénesis y la abundancia relativa de la microbiota intestinal.

Las ratas con obesidad desarrollaron inflexibilidad metabólica, intolerancia a la glucosa y a la insulina. Sin embargo, en los grupos con dietas altas en grasa (AGS) suplementadas con frijol y/o concentrado, se encontró que se logró contrarrestar los efectos adversos de una dieta AGS, incluso al enfrentarse a un reto metabólico.



Como conclusión, los resultados obtenidos sugieren que el consumo cotidiano de frijol negro regula la respuesta metabólica postprandial, lo que contribuye a la salud metabólica, mejora la sensibilidad a la insulina y contrarresta en cierto grado las consecuencias de la obesidad. Además de contribuir a un cambio en la microbiota intestinal.

Adicionado a los beneficios del frijol publicados en la literatura, los resultados de esta tesis demuestran por primera vez los efectos *in vivo* del consumo de frijol en una dieta alta en grasa, asociados a los parámetros bioquímicos y la microbiota intestinal.



EFFECTO DE UN CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE FRIJOL Y DE FRIJOL ENTERO EN UN MODELO DE OBESIDAD, Y SU EFECTO EN LA MICROBIOTA INTESTINAL

2. MARCO TEÓRICO

2.1. EL FRIJOL EN LA DIETA TRADICIONAL MEXICANA

Para México, el frijol es un producto estratégico en el desarrollo rural del país, debido a que conjuntamente con el maíz, representa toda una tradición productiva y de consumo, cumpliendo diversas funciones de carácter alimentario y socioeconómico que le han permitido trascender hasta la actualidad (SIAP, 2012).

Su presencia a lo largo de la historia de México, lo ha convertido no sólo en un alimento tradicional, sino también en un elemento de identificación cultural, que son básicos para explicar la dieta alimentaria de ayer, hoy y muy probablemente del futuro (SIAP, 2012).

México, como parte de Mesoamérica, es considerado como el Centro de Origen y Domesticación más importante (primario) de varios tipos de frijol, entre los que destaca por su valor comercial el frijol común *Phaseolus vulgaris* L. (CONABIO, 2013; Acosta et al., 1996; Sánchez et al., 2001; Hernández et al., 2013). Se conocen alrededor de 150 especies, y en México se concentran 50 de ellas (Miranda, 1987; CONABIO, 2013).

Tradicionalmente, la dupla maíz/frijol se complementa con alimentos de la biodiversidad de nuestro país como amaranto, aguacate, raíces y hojas verdes (Gálvez, 2015).

2.2. CAMBIOS RECIENTES EN LA DIETA DEL MEXICANO

Hace aproximadamente 20 años, inició una marcada disminución en el consumo de alimentos tradicionales que se sustituyeron por alimentos refinados de trigo o procesados con elevadas cantidades de azúcares y grasas, pues cada vez resultan más accesibles por su precio y disponibilidad. Además, en nuestro país, comer a diario huevo y carne se adoptó como símbolo de estatus y, por consiguiente, de una buena alimentación, como sucede en países industrializados (FAO, 2008). Así, se ha ido abandonando una dieta ejemplar y que tiende a ser más saludable, así como económica y ecológicamente más eficiente que otras dietas por ser completa, suficiente, equilibrada, diversa y atractiva, producto de milenios de cultura y experiencia que se basa en el nixtamal y el frijol, y no



exagera el consumo de grasas, colesterol, azúcar y productos de origen animal (Bourges, 2000; Gálvez, 2015).

Una de las consecuencias del abandono de la dieta tradicional es que el 72.5% es la cifra de los adultos en México padece una combinación de sobrepeso y obesidad de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2016), siendo 1.3 puntos porcentuales superior a los resultados de la encuesta 2012. La prevalencia de obesidad en este grupo fue de 33.3% y la de sobrepeso de 39.2% (Figura 1). En México, se calcula que los costos atribuibles al sobrepeso y obesidad son de 80,000 millones de pesos y causan pérdidas adicionales de 250 mil millones de pesos anuales (Rawe *et al.*, 2012; Gutiérrez *et al.*, 2012; INSP, 2014). El cambio de hábitos de consumo de los mexicanos del siglo XXI está complicado por un sedentarismo exacerbado, cada vez más frecuente en la población que sufre también de enfermedades cardiovasculares y diabetes. No es raro encontrar en una misma familia preescolares desnutridos o niños y adultos con sobrepeso u obesidad (Peña & Bacallao, 2000); (Gálvez, 2015).

Desde la perspectiva genética, se ha sugerido que la susceptibilidad de los hispanos a diabetes tipo 2, obesidad y dislipidemia se encuentra relacionada con su herencia Nativo Americana. Diversos estudios han encontrado el polimorfismo, una frecuencia de una variante no sinónima (R230C) del gen ABCA1 (transportador dependiente de la unión de ATP), asociada con concentraciones bajas de HDL-C, obesidad y diabetes tipo 2 en poblaciones de mexicanos mestizos (Alonzo, 2010).

La variante R230C había sido estudiada en otras poblaciones; no fue detectada en sujetos caucásicos, hindúes y en afroamericanos. Por el contrario, Canizales *et al* encontraron alta prevalencia en indígenas yaquis, mazahuas, purépechas y mayas (29.9-52.5%). Esta observación sugiere que la variante R230C del gen ABC-A1 es un alelo de susceptibilidad para el síndrome metabólico y algunos de sus componentes, específico para las poblaciones amerindias mexicanas.

Sin embargo, cabe destacar que la susceptibilidad genética para desarrollar obesidad y enfermedades metabólicas se podría explicar por la interacción entre variantes de diferentes genes.



2.3. PROBLEMAS DE SALUD RELACIONADOS CON LA ALIMENTACIÓN

2.3.1. Sobrepeso y obesidad

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación excesiva de grasa, que puede ser perjudicial para la salud. La causa fundamental es un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas, además de un aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos que son ricos en grasa, sal y azúcares pero pobres en vitaminas, minerales y otros micronutrientes (OMS, 2015a). El sobrepeso y obesidad constituyen factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares (principalmente cardiopatía y accidente cerebrovascular), la diabetes tipo 2, osteoartritis y algunos cánceres (OMS, 2015a).

El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2) (OMS, 2015b). En la Tabla 1 se muestran los rangos de índice de masa corporal y su clasificación propuesta (OMS, 2015b).

La OMS informa que en 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso de los cuales, más de 600 millones eran obesos, es decir el 39% de las personas adultas tenían sobrepeso y el 13% eran obesas. En 2013, más de 42 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso (Gutierrez et al., 2012).

Los cambios en la alimentación actual han repercutido de manera importante en el aumento de estos padecimientos; además se exagera por la disminución de la actividad física, los nuevos modos de desplazamiento y la creciente urbanización.

En los últimos años, ha quedado demostrado que la hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo asociadas a la obesidad pueden causar hipoxia, y la activación de distintas respuestas celulares entre las que se incluyen el estrés oxidativo, el estrés de retículo endoplasmático y la inflamación (Olefsky et al., 2010)

Tabla 1.- Intervalos de índice de masa corporal y su clasificación según la OMS (2006)

IMC	
Desnutrición	<18.5
Normal	18.5-24.9
Sobrepeso	25-29.9
Obesidad I	30-34.9
Obesidad II	35-39.9
Obesidad III	>40

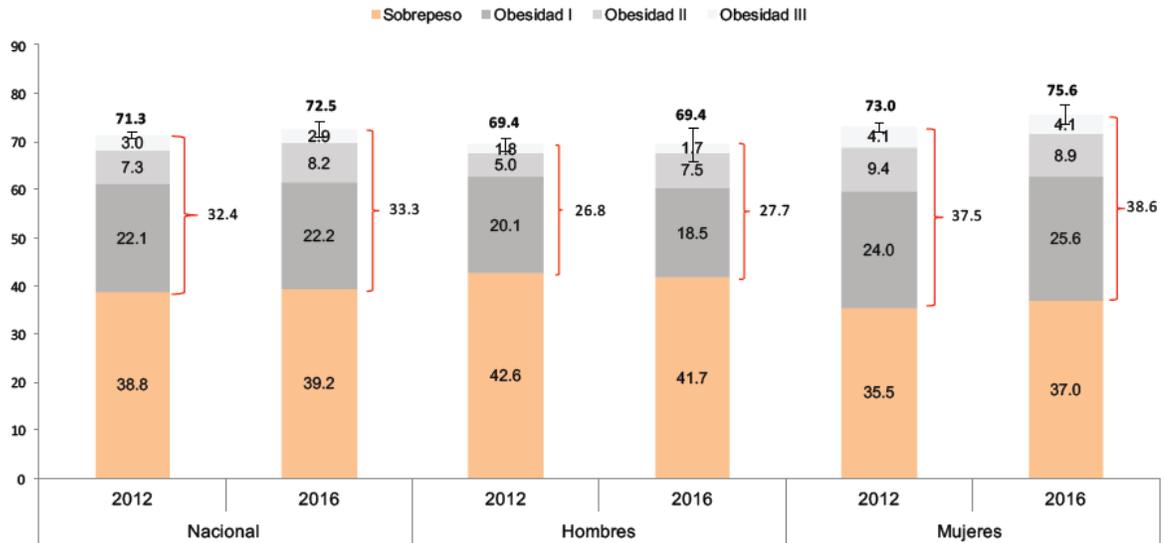


Figura 1 .- Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población de 20 o más años de edad, en la ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016 (ENSANUT, 2012 y 2016).

2.3.2. Diabetes

La diabetes es una enfermedad crónica caracterizada por hiperglucemia, que se desarrolla cuando el páncreas no produce insulina suficiente y/o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce (OMS, 2014a).

2.3.2.1. Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 es causada por una reacción autoinmune, en la que el sistema de defensa del cuerpo ataca las células β productoras de insulina en el páncreas. Como resultado, el cuerpo no puede producir la insulina que necesita. La enfermedad puede afectar a personas de cualquier edad, pero generalmente se presenta en niños o adultos jóvenes. Las personas con este tipo de diabetes necesitan insulina para controlar los niveles de glucosa en sangre. Suele desarrollarse repentinamente y puede producir síntomas tales como: sed anormal y sequedad de boca, micción frecuente, falta de energía, cansancio extremo, hambre constante, pérdida repentina de peso, heridas con cicatrización lenta, infecciones recurrentes y visión borrosa (FID, 2015).



2.3.2.2. Diabetes tipo 2

La diabetes tipo 2 es la más común. Por lo general ocurre en adultos, aunque se presenta actualmente con frecuencia en niños y adolescentes. En la diabetes tipo 2, el cuerpo puede producir insulina, pero no es suficiente. Así mismo los tejidos no responden de manera adecuada a sus efectos, dando lugar a la hiperglucemia. Es una enfermedad compleja en la que interviene la obesidad, mala alimentación, inactividad física, antecedentes genéticos, grupo étnico y alta glucosa en sangre durante el embarazo que afecta al feto (FID, 2015; Guía Mexicana de Diabetes, 2005).

2.3.2.3. Prevalencia de diabetes en México y en el mundo

Los datos de la ENSANUT 2012 identifican a 6.4 millones de adultos mexicanos con diabetes, es decir, 9.2% de los adultos en México han recibido ya un diagnóstico de diabetes. El total de personas adultas con diabetes podría ser incluso el doble, de acuerdo a la evidencia previa sobre el porcentaje de diabéticos que no conoce su condición. En la ENSANUT 2016 se observó un ligero aumento en la prevalencia de diabetes por diagnóstico médico (9.4% de los adultos entrevistados).

Se estima que tienen diabetes aproximadamente (dentro de un rango de 20-79 años) 387 millones de personas en el mundo (8.3% de los adultos). Cerca del 80% vive en países de ingresos medios y bajos. Si siguen estas tendencias, para el año 2035 unos 592 millones de personas, o un adulto de cada 10, tendrá diabetes.

La Federación Internacional de Diabetes en su informe del 2015 reportó que el país Latinoamericano con mayor prevalencia es México (11.5 millones de adultos) y en el mundo es China (109.6 millones de adultos) (FID, 2015). Según proyecciones de la OMS, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030 (OMS, 2011). La diabetes costó como mínimo 673 000 millones de USD en gastos de salud en el 2015, el 12% del gasto total en adultos (FID, 2015).



2.4. ÍNDICE GLUCÉMICO

El índice Glucémico (IG) mide el aumento de la glucosa en sangre que se produce después de la ingesta de un alimento determinado en relación con los resultados producidos por una ingesta de glucosa (IG = 100), expresado en porcentaje (Venn et al., 2007).

El IG indica numéricamente si los carbohidratos llegan lenta, moderada o rápidamente al torrente sanguíneo. Si el IG es de 70 o mayor se considera que el alimento tiene un IG alto; si se encuentra entre 56 y 69 el IG es moderado y si el valor es de 55 o menor se dice que el alimento tiene un IG bajo (Torres et al., 2006).

2.5. SÍNDROME METABÓLICO

Se denomina síndrome metabólico al conjunto de alteraciones metabólicas constituido por obesidad de distribución central, disminución de las concentraciones del colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad (cHDL), elevación de las concentraciones de triglicéridos, aumento de la presión arterial (PA) e hiperglucemia (Eckel, 2005). En la tabla 2, se muestra la caracterización propuesta por la Federación Internacional de Diabetes IDF.

Tabla 2.- Condiciones que definen el síndrome metabólico propuesto por la Federación Internacional de Diabetes (Modificado de Zimmet et al., 2005).

Obesidad central	
Perímetro de la cintura: con especificidad respecto a los distintos grupos étnicos Si el IMC es >30, se puede asumir a presencia de obesidad central y no es necesario medir el perímetro de la cintura.	
Más dos cualquiera de los factores siguientes:	
Aumento de los triglicéridos:	≥1.7 mmol/l (150 mg/dL)
Disminución del cHDL	<1.03 mmol/l (40 mg/dL) en los varones <1.29 mmol/l (50 mg/dL) en las mujeres o tratamiento específico para esta alteración lipídica
Aumento de la presión arterial	Sistólica ≥ 130 mm Hg ó Diastólica ≥ 85 mm Hg o tratamiento de hipertensión diagnosticada previamente
Incremento de la glucemia	Glucemia en ayunas ≥ 5.6 mmol/l (100 mg/dL) o bien diabetes tipo 2 diagnosticada previamente.



2.6. INSULINA

La insulina es una hormona peptídica producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas que interviene en muchos de los procesos vitales en los mamíferos, regula la expresión gran cantidad de genes relacionados con los procesos de transporte de glucosa, glucogénesis, glucólisis, lipogénesis, antilipólisis, antiapoptosis y los involucrados en el ciclo celular que controlan el crecimiento y diferenciación. La mayor parte de los efectos de la insulina se llevan a cabo a través del sistema proteínico FRAP/mTOR (mTORC1) (Kim et al, 2007; Choi, 2010).

Diversas investigaciones han asociado a la obesidad y la resistencia a la insulina con una inflamación sistémica crónica de “bajo grado”. En modelos de obesidad inducido por dieta, el tejido adiposo presenta un incremento en la expresión de citocinas como TNF- α , interleucina IL-1 y IL-6, este incremento es perjudicial para la acción de la insulina en el músculo, por ejemplo, el aumento de la expresión de TNF- α produce resistencia a la insulina. La consecuencia de la resistencia a la insulina favorece la hiperinsulinemia y el almacenamiento de lípidos en hígado y tejido adiposo (Cani et al., 2007).

La detección de la resistencia se realiza mediante el cálculo del índice de resistencia a la insulina medido por el modelo *homeostasis model assessment* (HOMA) o bien en curvas de tolerancia a glucosa para detectar la hiperinsulinemia (Pérez, 2011), se realiza tomando en cuenta los valores de insulina en ayunas.

Como se muestra en la figura 2, la homeostasis de la glucosa es un balance entre la producción de insulina, determinado por la cantidad y/o función de las células pancreáticas así como de la acción de la propia insulina.

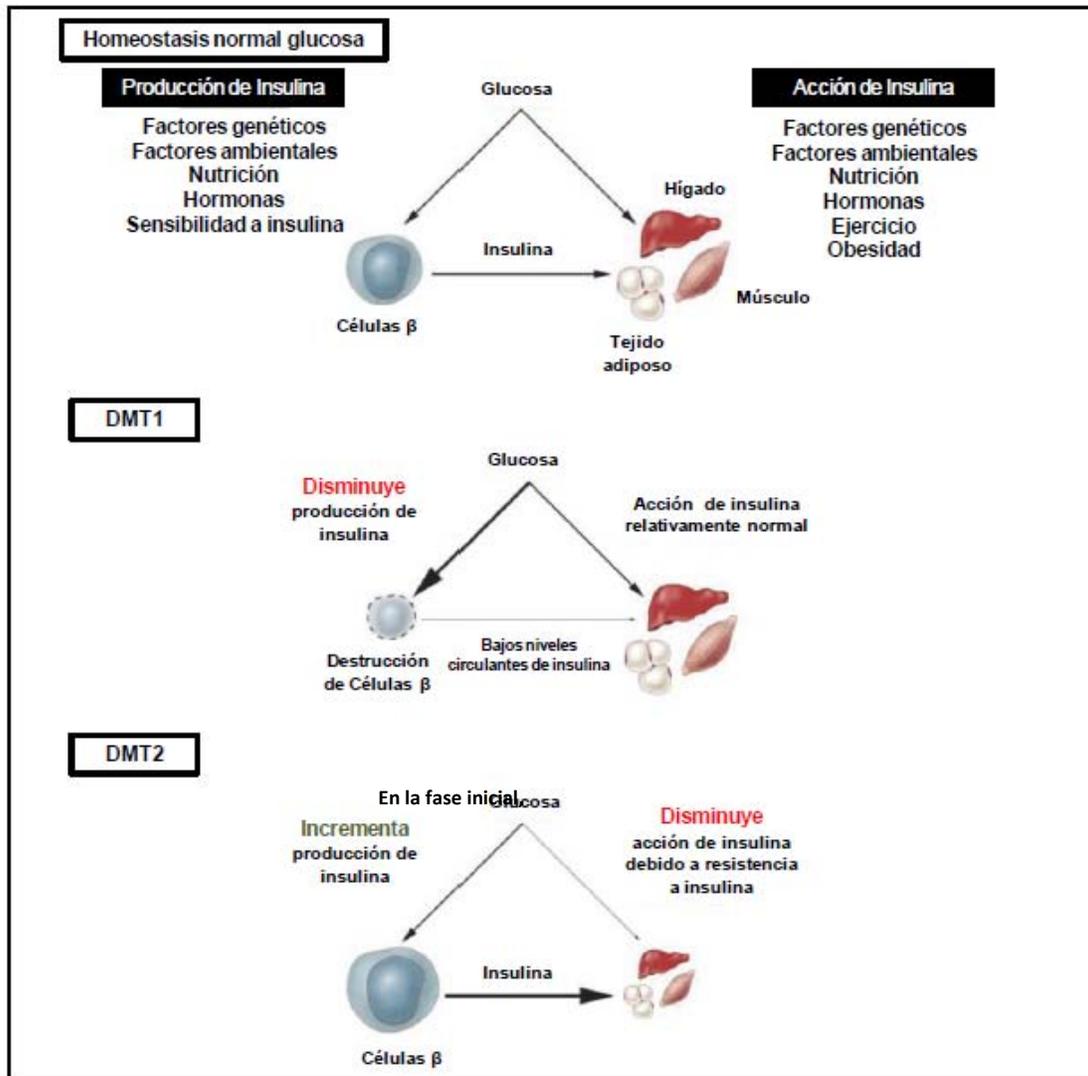


Figura 2.- Factores que afectan la homeostasis de la glucosa en diabetes tipo1 y 2. (Lomas, 2012; Modificado de Permutt y col., 2005)

2.7. LEPTINA

El nombre de leptina deriva de la raíz griega leptos que significa delgado, lo que se debe a su evidente función en el control del peso corporal a través de la regulación del apetito y la termogénesis. También es conocida como proteína OB, es una hormona producida principalmente por los adipocitos (Yang et al, 2007).

La leptina es un péptido de 167 aminoácidos, con una secuencia de 21 aminoácidos que se escinde antes de pasar al torrente circulatorio. El tejido adiposo blanco es el principal productor de leptina, actuando como un "marcador" de las reservas energéticas del organismo (Zhang et al., 1997). La leptina interviene en diversos procesos fisiológicos tales



como: la regulación del balance energético, el control del apetito y del peso corporal, el metabolismo de las grasas y glúcidos. Existen numerosos receptores OB a escala central y en diferentes regiones del hipotálamo que están implicados en parte de los efectos observados de esta hormona. Además, existen receptores Ob en numerosos tejidos periféricos como son el pulmón, riñón, hígado, músculo esquelético, tejido adiposo, testículos, islotes pancreáticos y células hematopoyéticas. El estudio de su regulación y efectos sobre el sistema nervioso central están resultando fundamentales en la comprensión del sistema de regulación del balance energético y de los mecanismos implicados en el desarrollo de obesidad (Clavijo, 2010).

En condiciones normales, cuando se produce un aumento de grasa en el organismo, la leptina actúa sobre el hipotálamo y disminuye el apetito y aumenta el metabolismo basal. En las personas obesas aumenta la secreción de leptina llegando a alcanzarse valores cuatro veces mayores que en las que no presentan obesidad, lo cual refleja un estado de resistencia a la leptina. Su expresión se incrementa por sobrealimentación, aumento de concentración de la insulina, glucocorticoides, endotoxinas y citocinas, y se disminuye por el ayuno, la testosterona, la hormona tiroidea, y exposición al frío (Yang et al, 2007).

La hiperlipidemia es común en la obesidad y se refleja en un aumento de adiposidad y resistencia a la leptina. Notablemente las respuestas renales a la leptina e insulina pueden jugar un papel importante en la hipertensión, obesidad y el síndrome metabólico (Morton, 2007).

La restricción y el exceso de alimento regulan los niveles de leptina plasmática y la expresión del gen OB en los roedores y humanos. Una dieta alta en grasa aumenta los niveles de leptina en plasma y tejido adiposo en ratas (Morton, 2007).

2.8. INFLEXIBILIDAD METABÓLICA

El músculo esquelético es el tejido sensible a insulina más abundante del cuerpo humano, siendo capaz de captar el 40% de la glucosa postprandial a la vez de que consume el 20% de la energía corporal. La flexibilidad metabólica es la capacidad de cambiar entre los distintos tipos de energía disponible. En los casos cuando se presenta inflexibilidad metabólica el organismo no es capaz de intercambiar el uso de sustratos (fuente de energía). Es decir, no puede intercambiar del uso de lípidos a glucosa.

En investigaciones recientes se han identificado defectos específicos en la señalización posterior a la unión de la insulina a su receptor, que se acompañan con una disminución de



la capacidad oxidativa de la mitocondria, un aumento de la grasa intramuscular, un incremento de la generación de especies reactivas a oxígeno, y una estimulación de las vías de inflamación lo que finalmente conlleva un riesgo metabólico aumentado (Nistala et al., 2006).

Esto conduce a un incremento del glucógeno en el músculo esquelético y por el contrario una disminución del consumo de glucosa postprandial. Por otro lado ya en la vía de los ácidos grasos de cadena larga que se almacenan a nivel muscular y hepático en forma de triglicéridos; el exceso de los mismos pueden llegar entorpecer la señalización de la insulina, causando la progresión para la aparición de diabetes tipo 2 (Nistala et al., 2006). Por tanto, en los obesos y diabéticos tipo 2, como consecuencia de la resistencia a la insulina que origina una disminución de la oxidación lipídica, se pierde una parte de esa capacidad para la utilización de grasa, por lo que se favorece la acumulación de triglicéridos dentro y alrededor de la célula muscular (Kelley et al., 2002).

2.8.1. Coeficiente respiratorio

La existencia de un estado de flexibilidad o inflexibilidad metabólica, se puede determinar mediante la determinación del coeficiente respiratorio.

En un estado de flexibilidad metabólica, durante el ayuno el organismo utiliza como fuente de energía los lípidos y durante la etapa postprandio el organismo es capaz de intercambiar como fuente de energía al uso de carbohidratos.

Cuando un organismo presenta inflexibilidad metabólica, es incapaz de realizar el cambio hacia la oxidación de carbohidratos al tener el sustrato disponible durante el consumo de alimento por lo que continúan con la oxidación de lípidos.

En caso de utilizar glucosa como fuente de carbono el RER (Respiratory Exchange Rate) sería cercano a 1, en caso de usar lípidos como fuente de energía el valor sería cercano a 0.70.

El coeficiente respiratorio (RER) se calcula con la cantidad de O_2 consumido y el CO_2

$$\text{producido} \quad RER = \frac{CO_2 \text{ producido}}{O_2 \text{ consumido}}$$



De esta forma se determina cuál sustrato se está oxidando:

- **Carbohidratos (glucosa)**



$$RER = 6CO_2 / 6O_2 = \underline{1.00}$$

- **Lípidos (ácido palmítico)**



$$RER = 16CO_2 / 23O_2 = \underline{0.70}$$

2.9. LEGUMINOSAS

La palabra leguminosa se deriva del latín *legumen*, que significa semillas cosechadas en vainas. Pertenecen a la familia botánica de las Fabáceas, y a su vez a las fanerógamas, plantas que se caracterizan por producir frutos en forma de vainas, como se mencionó anteriormente, las cuales se abren longitudinalmente en dos valvas dentro de las que coexisten en una hilera ventral, una o más semillas (Aykroyd & Doughty, 1982; Bourges, 1987).

En las leguminosas se encuentran bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno (género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, entre otros) que son capaces de infectar las raíces de las leguminosas mediante la formación de nódulos en la raíz. El nitrógeno se fija mediante un proceso de simbiosis entre la planta y la bacteria, la planta proporciona los carbohidratos necesarios, las condiciones de anaerobiosis y las bacterias fijadoras convierten el N_2 a NH_4 (Tortora et al., 2007). Lo anterior se suma al valor nutrimental del frijol pues enriquece los suelos donde se cultiva y en las milpas juega un importante papel por la sinergia que se genera el co-cultivo con el maíz.

De las especies más consumidas se puede mencionar; el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), soya (*Glycine max*), lenteja (*Lens esculenta*) y garbanzo (*Cicer arietinum*).

Las leguminosas son una fuente rica de proteínas, sin embargo, son deficientes en aminoácidos azufrados como metionina y cisteína, y ricos en lisina. Sin embargo su consumo puede ser complementado mediante el uso de cereales en la dieta, dado que estos son ricos en aminoácidos azufrados y deficientes en lisina, de esta manera el consumo conjunto de estos alimentos proporciona un buen aprovechamiento de los alimentos (Clark et al., 2014). Ejemplo de esta complementación nutrimental de proteína son



los múltiples platillos mexicanos que conjuntan a esta leguminosa con el maíz, que une los aminoácidos procedentes del cereal (maíz) y leguminosa (frijol).

2.11. FRIJOL

2.11.1. Consumo de frijol

El frijol, como fuente de proteína de origen vegetal, es consumido principalmente en los países en desarrollo. Sin embargo en muchos países se ha reducido su consumo en los años recientes. En los años sesenta el registro anual de consumo en México era de 18.45 kg *per cápita*. En 2013 se estimaron solamente 10.2 kg *per cápita*, es decir, hubo un decremento de 45% (SIAP, 2013; CONAPO, 2014; Rodríguez-Licea *et al.*, 2010). De acuerdo con la FAO, el consumo per cápita de frijol es de alrededor de 18.6 kilogramos por persona al año en Nicaragua, 16.2 kilogramos en Brasil y 11.0 kilogramos en México. En tanto, en países desarrollados como Alemania, Reino Unido, Francia, Italia y Japón, no supera 2 kilogramos por persona al año (Financiera Rural, 2011).

Sólo un 23% del consumo nacional de frijol se industrializa en forma de enlatados y en bolsa retortable. El otro 77% se consume de manera tradicional como frijoles de olla o refritos. La población mexicana prefiere el frijol negro, sobresaliendo el Jamapa y el Veracruz; seguido por los de color claro, como el peruano y los flores de mayo y junio, y variedades pintas o azufradas/amarillas dependiendo de la zona del país (Rodríguez-Licea *et al.*, 2010, SIAP, 2012; Financiera rural, 2011; ASERCA, 2007; Castellanos *et al.*, 1997). Dos de los principales países productores de frijol, India y Brasil, son los mayores consumidores y juntos concentran el 43% del consumo global. México tiene el 7.3 % y Estados Unidos el 6.1 % del consumo. (Financiera rural, 2011; Gálvez, 2015).

2.11.2. Clasificación botánica y morfología del frijol

El frijol pertenece a la familia de las leguminosas o fabáceas. El género *Phaseolus*, se clasifica dentro de la familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionoidae*, tribu *Phaseolae* y subtribu *Phaseolinae* (Conabio, 2014).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una especie autógama, diploide y con un genoma relativamente pequeño, con un tamaño estimado entre 587 Mbp y 637 Mbp (Saburido, 2014).

Estructura externa del frijol

Las partes que componen a la semilla externamente son:

- Testa o cubierta: Capa secundaria del óvulo, la cual es dura, seca y usualmente lisa. Está formada por una cutícula delgada que cubre un área de células prismáticas contiguas denominadas palizada de células.
- Hilum: Cicatriz dejada por el funículo. Conecta la semilla con la placenta.
- Micrópilo: Abertura en la cubierta cerca del hilum. A través de esta abertura se realiza principalmente la absorción de agua.
- Rafe: Proveniente de la soldadura del funículo con los tegumentos externos del óvulo (CIAT, 1984; Arias et al., 2007). En la figura 3 se muestran la estructura interna y externa del frijol.

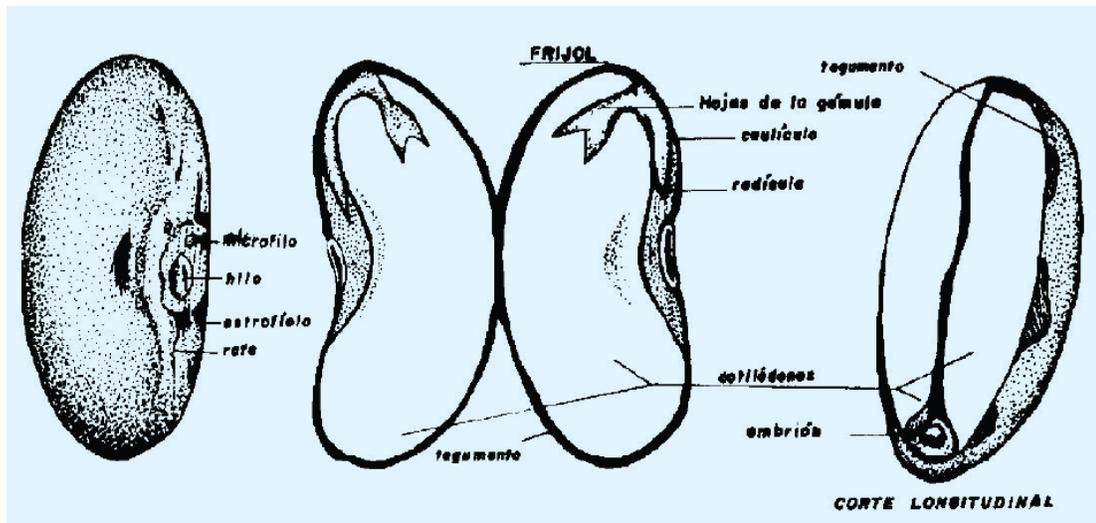


Figura 3.- Estructura interna y externa del frijol. Fuente: CIAT (1984).

Estructura interna del frijol

Las partes internas de la semilla de frijol se encuentran distribuidas en: embrión, dos hojas primarias, hipocótilo, dos cotilédones y la radícula. El complejo plúmula-radícula está situado entre los dos cotilédones, a un lado del grano contra la testa, de tal manera que la radícula está en contacto con el micrópilo y la plúmula está encerrada hacia el interior del grano (CIAT, 1984; Arias et al., 2007).



En el grano seco, los cotiledones exhiben una estructura altamente organizada. Contiene células con gránulos de almidón embebidos en una matriz proteínica consistente de cuerpos proteínicos y gránulos de aleurona (CIAT, 1984).

Los cuerpos proteínicos son generalmente esféricos y relativamente menores que los gránulos de almidón y están rodeados por una membrana lipoproteica. Con base en la materia seca, la testa representa el 9%, los cotiledones un 90% y el 1% restante es el embrión de la semilla entera (CIAT, 1984).

2.11.3. Composición nutrimental y principios bioactivos del frijol

Phaseolus vulgaris es una de las leguminosas más consumidas alrededor del mundo. Los frijoles son una excelente fuente de proteínas, carbohidratos, fibra dietaria, minerales y fitoquímicos.

Los carbohidratos son el mayor componente, su contenido en la semilla es de 50% - 76% dependiendo de la variedad de frijol, siendo el almidón el de mayor proporción, el cual representa del 32% al 52% y la fibra dietética total representa de 15 a 45%. El contenido de proteína en la semilla seca varía entre 17-30%, de 2 a 5% de minerales (entre ellos Potasio, Fósforo, Calcio, Hierro, Sodio y Selenio) y menos de 1% de vitaminas (Vitamina C, Niacina, Colina, Vitamina K y Vitamina E (Ramírez et al., 2015; USDA, 2015).

El frijol tiene un bajo índice glicémico (IG), a pesar de su alto contenido de almidón y otros carbohidratos, pues no eleva marcadamente la glucosa en sangre. Presenta un IG=30, y cuando se combina con tortilla y salsa de jitomate el índice glicémico se mantiene bajo (IG=39), cuando la tortilla sola puede tener hasta un IG de 52 (Foster-Powell et al., 2002).

Los frijoles son una fuente importante de componentes bioactivos que promueven diversos efectos benéficos para la salud humana, los compuestos más relevantes son los compuestos fenólicos que se encuentran ligados a su actividad antioxidante, antimutagénica y anticarcinogénica; polisacáridos no digeribles e inhibidores de enzimas, además de un potencial bifidogénico, péptidos bioactivos con propiedades antihipertensivas, saponinas y fitoesteroles, los cuales se ha confirmado que tienen beneficios hipolipidémicos, taninos condensados, fitatos y oligosacáridos (Ramírez et al., 2015; Champ., 2002; Campos-Vega et al., 2009)



El consumo de frijol se ha relacionado con la reducción de riesgo de enfermedades crónicas y en estudios con animales han mostrado que su consumo regular disminuye el riesgo de incidencia de cáncer de colon (Hangen et al., 2002; Lanza et al., 2006).

2.11.4.1 Carbohidratos del frijol

La fibra dietética en el frijol negro contiene sobre todo celulosa y hemicelulosa, es decir fibra insoluble y soluble, que previenen la constipación y bajan el índice glicémico. Se ha encontrado que la fibra dietética mejora la concentración de lípidos séricos mediante la inhibición parcial de la absorción de colesterol en el intestino delgado (Ramirez et al., 2015; Sanchez-Muñiz, 2012).

A pesar de que el frijol en general se considera como una fuente importante de carbohidratos, una fracción de su contenido de almidón forma parte de la fracción no digerible del frijol. Esta fracción de almidón resistente a la digestión, posee un efecto similar al de la fibra soluble (disminución de la síntesis hepática del colesterol). Se sabe que el tratamiento térmico es uno de los factores más importantes que afectan la digestibilidad y disponibilidad del almidón, este tiende a la retrogradación generando así fracciones resistentes, las cuales pueden ser fermentadas en el colon para producir ácidos grasos de cadena corta cuya presencia cobra importancia en la nutrición (Pujola et al., 2007; Ramírez-Jímenez et al., 2014). El almidón resistente ayuda a contrarrestar los mecanismos de hiperlipidemia mediante la disminución de la absorción de grasas, su utilización y la sensación de saciedad mediante la unión de los ácidos biliares (Darzi, et al. 2011; Tapsell, 2004).

Además en otros estudios *in vitro* se ha demostrado que la fibra soluble, carbohidratos y taninos condensados del frijol común sufren fermentación mediante la microbiota presente en el colon, produciendo SCFAs como acético, butírico y ácido propiónico, estos modificando el pH, a la vez que contribuyen a la salud de la mucosa intestinal, además de proporcionar beneficios en el metabolismo, entre ellos la disminución de la síntesis hepática del colesterol (Campos-Vega et al., 2009).



2.11.4.2. Lípidos del frijol

El frijol negro posee una baja cantidad de lípidos. La porción mayoritaria, corresponde a los ácidos grasos poliinsaturados (omega-3 y omega-6), seguida de los ácidos grasos saturados y los ácidos grasos monoinsaturados (omega-9). Se relaciona el consumo de estos lípidos encontrados en el frijol, con la salud cardiovascular y la regulación de procesos inflamatorios (Coronado et al., 2006; Winham & Hutchins, 2007).

2.11.4.3. Proteínas del frijol

Las proteínas del frijol pueden clasificarse con base a su función: proteínas de almacenamiento, metabolismo de carbohidratos, defensa, respuesta al estrés, detoxificación, crecimiento y desarrollo, transporte de proteínas y metabolismo del nitrógeno (De la Fuente et al., 2011).

En la base de datos UniProtKB se encuentran reportadas 160 secuencias de proteínas del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). La mayoría de las reportadas están relacionadas con la función metabólica en la planta. Entre ellas las más relevantes son las faseolinas, lectinas, inhibidores de α -amilasas e inhibidores Bowman-Birk (Luna-Vital et al., 2014). En la Figura 4 se muestran los cristales de sus estructuras.

Las faseolinas representan del 30-50% del total de las proteínas, su estructura secundaria consiste en 10% de α -hélices, 9% de giros β , 48% de hojas β y 33% de estructura al azar. El alto porcentaje de hojas β limita el acceso a las proteasas. Generalmente son proteínas glicosiladas, que consisten en 3 subunidades peptídicas (α , β , γ). Su valor nutrimental es considerado limitado debido a la baja cantidad de metionina y cisteína, además de contar con alta resistencia a la proteólisis.

La familia de las lectinas representa del 10-12% del total proteínico. Estas proteínas son las lectinas, fitohemlutinas, inhibidores de α -amilasas y arcelinas (Luna-Vital, 2014).

Las lectinas, inhibidores de α amilasas y arcelinas en plantas son responsables de actuar como defensa en mecanismos bióticos contra estrés, y en los abióticos como condiciones salinas y de sequía, además de intervenir en los mecanismos de resistencia al ataque de insectos. El incremento en proteínas responsables de mecanismos de defensa tiene una

relación positiva con el valor nutrimental debido a su alto contenido de aminoácidos azufrados (Luna-Vital, 2014).

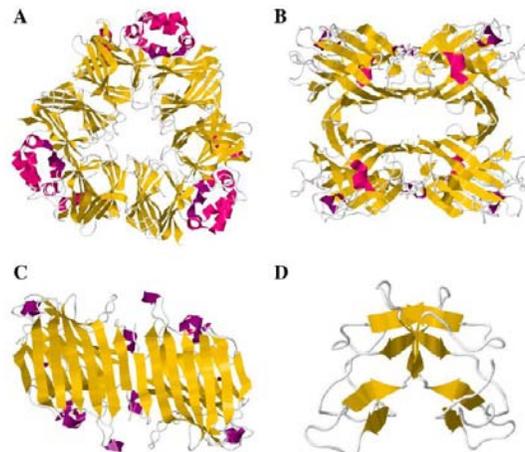


Figura 4.- Estructuras de los cristales de proteínas del frijol común: a) faseolina, b) fitohemaglutinina (lectina), c) arcelina y d) inhibidor de proteasa Bowman-Birk. (Luna-Vital et al., 2014).

2.11.5. Factores tóxicos y antinutricionales del frijol

Entre los principales factores antinutricionales asociados a las leguminosas se encuentran los glucósidos cianogénicos, inhibidores de proteasas, fitohemaglutininas y saponinas (Valle, 2013; Cabrera, 2011). Los cuales son termolábiles, es decir que se pueden eliminar o disminuir su concentración mediante tratamiento térmico, que generalmente es el proceso de cocción.

2.11.5.1 Lectinas

Las lectinas pertenecen a un grupo variado de proteínas no inmunogénicas conocido como hemaglutininas, ampliamente distribuidas en la naturaleza encontrándose en plantas, animales y organismos inferiores (Hernández, 2009). Las lectinas vegetales se presentan en forma de glicoproteínas, su efecto *in vitro* consiste en combinarse con las glicoproteínas de las membranas de los glóbulos rojos las cuales aglutinan o coagulan (de ahí el nombre de fitohemaglutininas). Su acción *in vivo* se basa en su alta especificidad para reconocer carbohidratos, su principal efecto está relacionado con el hecho de que se adhieren a los carbohidratos sobre la superficie del intestino delgado (duodeno y yeyuno) y causan daños



en la pared intestinal, afectando los procesos de absorción y transporte de nutrimentos a través de ella (Bassan et al, 2002). Por lo anterior, es de gran importancia realizar un buen tratamiento térmico que permita reducir al máximo la actividad de estos compuestos.

2.11.5.2. Inhibidores de proteasas

Estos factores se pueden definir como compuestos termolábiles de naturaleza proteínica, que alteran la digestión de las proteínas, inhibiendo la acción de las enzimas digestivas bloqueando la hidrólisis de las proteínas de la dieta; los más conocidos son los que reaccionan con serinproteasas, como la tripsina y la quimotripsina (Muzquiz et al., 2006).

En el frijol se identifican las familias de inhibidores Bowman–Birk (que actúan uniéndose a la tripsina y quimotripsina), y de Kunitz (que actúa uniéndose en forma preferente a la tripsina).

Se ha comprobado que el consumo de inhibidores de tripsina provoca efectos nocivos en animales de experimentación mediante la formación de complejos inactivos, lo que provoca la reducción de la disponibilidad de estas enzimas digestivas, dificultándose así la proteólisis y absorción de la proteína adquirida con la dieta, por lo que se consideran un factor antinutricional. Además se ha observado que su consumo provoca una hipertrofia/hiperplasia en el páncreas debido principalmente a que tanto los inhibidores como los complejos formados, se unen a la mucosa duodenal y la liberación de colecistoquinina, incrementando así la secreción de enzimas pancreáticas (tripsina y quimiotripsina) (Liener,1989).



2.12. MICROBIOTA INTESTINAL

El intestino humano contiene más de 1000 diferentes especies de bacterias (Rajilic-Stojanovic et al., 2014). El intestino grueso contiene un ecosistema microbiano complejo y dinámico, con concentraciones de más de 10^{11} - 10^{12} células/g de lumen intestinal. Alrededor del 60% de la masa fecal está compuesta por bacterias (Guarner et al., 2003).

La interacción entre el hospedero (humano) y los microorganismos presentes en el intestino pueden reportar importantes beneficios para el hospedero. La composición de la microbiota entre los individuos varía en gran proporción como una respuesta a eventos como infecciones causantes de diarrea, tratamiento con antibióticos y la composición de la dieta (Guarner et al., 2003).

La colonización del tracto gastrointestinal de los niños recién nacidos comienza inmediatamente después del nacimiento. Inicialmente el pasaje a través del canal vaginal y el tipo de dieta (alimentación mediante leche materna vs. fórmula) puede afectar el patrón de colonización. Las primeras bacterias son capaces de modular la expresión de genes en las células epiteliales del neonato creando un ambiente favorable para ellas y prevenir el crecimiento de algunas otras. Las primeras bacterias que colonizan son relevantes para la composición de la microbiota permanente en la edad adulta del sujeto. Se ha reportado que las bacterias anaerobias sobrepasan a las aerobias en proporción por un factor de 100-1000 (Guarner et al., 2003).

Los microorganismos presentes en el intestino distal están compuestos por miles de millones de organismos pertenecientes a los géneros bacteria y archaea. Los cinco phyla bacterianos presentes son: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia* (Lozupone et al., 2012).

Bacteroidetes y *Firmicutes* forman parte de más del 90% de toda la microbiota intestinal en humanos y en ratones (Guo et al., 2008) y existe una posible relación entre la microbiota intestinal y la ganancia de peso en los individuos. Se han estudiado grupos de personas obesas, encontrando que la proporción de material genético de *Firmicutes* en heces es mayor que la encontrada en individuos delgados. Cuando los individuos obesos pierden peso durante un año, la proporción de *Firmicutes* se vuelve más parecida a la de los individuos delgados, de acuerdo con lo publicado por Bajzer et al. en 2006. Los *Firmicutes* y



Bacteroidetes son phylas pertenecientes al dominio Bacteria, la mayoría de microorganismos pertenecientes a estos son benignos, sin embargo existen algunos que son patógenos.

El phylum *Firmicutes* incluye más de 250 géneros, incluyendo *Lactobacillus* spp., *Mycoplasma* spp., *Bacillus* spp y *Clostridium* spp. Las características de los géneros presenta diferencias, por ejemplo: las especies de *Clostridium* son anaerobios estrictos, mientras que las pertenecientes al género *Bacillus* forman esporas y son aerobios estrictos (Bajzer et al., 2006).

El phylum *Bacteroidetes* incluye 20 géneros, en la microbiota humana los *Bacteroides* son el género predominante, siendo *Bacteroides thetaiotaomicron* el más abundante. Las especies de *Bacteroides* son anaerobios estrictos y habitantes benignos en el intestino (Bajzer et al., 2006).

2.12.1. Funciones principales de la microbiota intestinal

Se ha mostrado que la microbiota tiene funciones importantes y específicas en el metabolismo (Figura 5), en proliferación - diferenciación celular y protección contra algunos patógenos (Bajzer et al., 2006).

Funciones metabólicas: la más importante es la fermentación de fracciones no digeribles procedentes de la dieta, y la estimulación de formación del moco intestinal producido por el epitelio. La fermentación de carbohidratos es la mayor fuente de energía en el colon. Los carbohidratos no digeribles incluyen polisacáridos (almidones resistentes, celulosa, hemicelulosa, pectinas y gomas), algunos oligosacáridos y azúcares que no son absorbidos y alcoholes; teniendo como resultado final la generación de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) y gases como CO₂ y H₂. El acetato y propionato actúan como moduladores del metabolismo de la glucosa, ya que su absorción genera una menor respuesta glicémica al consumo de glucosa esto debido a que mejora la sensibilidad a la insulina (Guarner et al., 2003).

El butirato es una fuente de energía importante para los colonocitos, además se ha encontrado que aumenta la actividad mitocondrial, previene la endotoxemia metabólica, mejora la sensibilidad a la insulina, posee potencial anti-inflamatorio, mejora la función de la barrera intestinal y protege de la obesidad causada por dieta. Además, se ha reportado que

induce apoptosis, inhibe la proliferación y conduce a un fenotipo diferenciado de líneas celulares de carcinoma de colon humano (Avivi-Green et al., 2002; Shoaie et al., 2013).

Mientras que el butirato es metabolizado principalmente por los colonocitos, el acetato y el propionato son absorbidos hacia la circulación portal (Shoaie et al., 2013; Hartstra et al., 2015; Puddu et al., 2014).

El acetato, al ser captado por el hígado sirve como sustrato preferencial para la gluconeogénesis y la síntesis de colesterol y triglicéridos (Wong *et al.*, 2006).

El propionato es absorbido, inhibe la síntesis de colesterol y la expresión de resistina en los adipocitos, reduce la ingesta de alimentos y síntesis de colesterol, aumentando la expresión del gen que codifica para leptina e inhibe la expresión génica de las enzimas hepáticas involucrados en lipogénesis de novo (Hijova et al., 2007; Harris et al., 2012; Puddu et al., 2014).

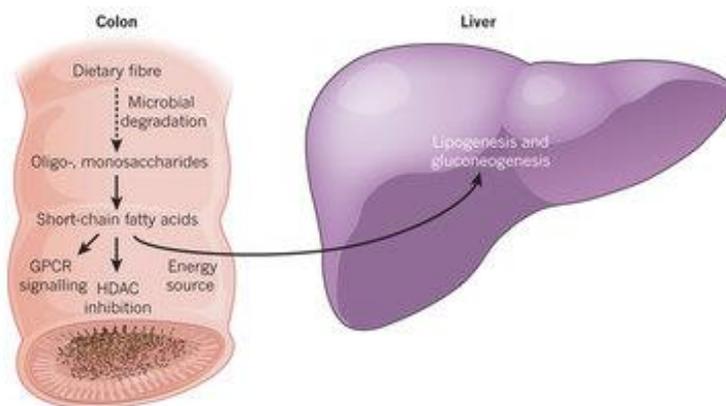


Figura 5.- Efecto de la fermentación de la fibra dietaria en el colon (Tremaroli et al., 2012)

El metabolismo anaeróbico de péptidos y proteínas también produce ácidos grasos de cadena corta, pero también produce una serie de compuestos tóxicos como amonio, aminas, polioles, tioles e indoles.

Los microorganismos también juegan un papel importante en la síntesis de vitaminas y en la absorción de calcio, magnesio y hierro (Guarner et al., 2003).

Diferenciación y proliferación de células: ayuda al desarrollo y homeostasis del sistema inmune. La colonización de microorganismos en el tracto gastrointestinal afecta la composición del tejido linfoide asociado a las mucosas, esto relacionado en la formación de los mecanismos de memoria del sistema inmune. La microbiota intestinal puede actuar como barrera para poblaciones patógenas en el huésped (Guarner et al., 2003).

El contenido de grasa en la dieta es un factor que puede alterar la composición de la microbiota intestinal, generando un aumento de las concentraciones plasmáticas de LPS,



causando un estado pro-inflamatorio que promueve la aparición de la resistencia a la insulina, diabetes y obesidad (Cani et al., 2007).

3. ANTECEDENTES

3.1. Antecedentes del grupo de trabajo

El concentrado de frijol utilizado en el presente estudio fue diseñado a partir de los trabajos de Quiñones y Salinas: “Obtención de un concentrado de proteína de frijol negro, caracterización fisicoquímica y efecto en la concentración de insulina y expresión génica de SREBP-1” y (Quiñones, 2010) y “Caracterización funcional de un concentrado de proteínas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) variedad INIFAP-8025 y su aplicación en formulaciones de alimentos” (Salinas, 2014).

Se logró obtener un concentrado de proteínas de frijol negro en planta piloto, con una alta concentración de proteína (72%), 18% de carbohidratos y una baja cantidad de lípidos (<5%) (Salinas, 2014). Las principales proteínas recuperadas fueron las faseolinas. El concentrado posee un bajo contenido de aminoácidos azufrados y alto contenido de lisina (Salinas, 2014).

La concentración de lectinas fue menor que la de los frijoles industrializados por lo que su nivel final como factor tóxico es aceptable. El tratamiento térmico logró una disminución importante en los niveles de inhibidores de tripsina (Lima, 2018).

Las antocianinas presentes en el concentrado son 50% menores a las presentes en el frijol negro crudo, sin embargo se obtuvo 42.03 mg antocianinas/g muestra (Salinas, 2014).

Mediante el uso de un modelo animal, se observó el crecimiento de ratas al consumir una dieta con 20% de proteína del concentrado de frijol, con los siguientes resultados:

Aumento de peso de los animales similar a la soya, por lo que la proteína del aislado de frijol puede ser considerada de buena calidad (Quiñones, 2010).

El aumento de glucosa en sangre fue similar al de la soya, siendo ambos (aislado de frijol y soya) más lentos en comparación con la proteína de origen animal (caseína) (Quiñones, 2010).

Se obtuvo menor relación de insulina/glucagón y disminuyó el factor de transcripción SREBP-1 en hígado, por lo que el aislado de frijol generó un efecto hipolipidémico (Quiñones, 2010).



El consumo de proteína de frijol, así como la combinación de proteína frijol-maíz, favorecen la recuperación de peso en ratas sometidas a un periodo de alimentación restringida en proteína (Márquez, 2016).

Se demostró que la combinación de frijol-maíz como fuente de proteína en la dieta, favorece la activación de mTORC1 en hígado (Márquez, 2016).

4. JUSTIFICACIÓN

El frijol en México es un producto estratégico en el desarrollo rural y social del país, ya que representa una tradición de consumo y producción, así como disponibilidad, accesibilidad y destacable valor nutrimental.

En los últimos años la población ha dejado de consumir frijol. A lo largo de las últimas tres décadas su consumo pasó de 18 kg/ persona/año a 10 kg/ persona/ año (SIAP, 2013). Esto es debido a las nuevas tendencias de consumo y el abandono de la dieta tradicional mexicana; teniendo como consecuencia un aumento en la población con sobrepeso, obesidad y enfermedades relacionadas con estos padecimientos como la diabetes. Los datos publicados por la ENSANUT 2016, muestran que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en México en adultos es de 72.5 % (Gálvez, 2015; ENSANUT MC, 2016).

En la dieta mexicana, el frijol se ha consumido junto al maíz (en forma de tortilla), siendo esto la complementación del consumo de un cereal con una leguminosa, teniendo así un mejor balance de aminoácidos y buena calidad de proteína vegetal.

El equipo de la Dra. Gálvez ha desarrollado un concentrado de proteína de frijol (Patente en trámite), que busca diversificar el uso del frijol negro. Debido a sus propiedades funcionales es posible utilizarlo como un ingrediente en alimentos tales como productos de panificación, cárnicos y bebidas.

En este estudio, con la finalidad de conocer mejor las propiedades del concentrado ya desarrollado, se buscó evaluar el efecto bioquímico y metabólico de su consumo en un modelo *in vivo* de obesidad. Paralelamente se alimentó a otro grupo de animales con frijol entero cocido para conocer su efecto, compararlo con el concentrado y con las dietas altas en grasa



5. HIPÓTESIS

El consumo de frijol entero y concentrado de proteína de frijol en un modelo de obesidad inducido por dieta, ocasionará una mejora en parámetros bioquímicos y ejercerá un efecto benéfico en la composición de la microbiota y disbiosis. Esto debido a la presencia de fibra soluble, almidón resistente, fitoquímicos y bajo índice glucémico del frijol.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Determinar el efecto del consumo de un concentrado de proteína de frijol negro y de frijol entero en un modelo de obesidad inducida por dieta (OID) en ratas, sus efectos en parámetros bioquímicos, consecuencias metabólicas y efectos en la composición de microbiota intestinal.

6.2. Objetivos Particulares

1) Evaluación del efecto de consumo del concentrado de proteína de frijol negro y frijol negro entero deshidratado en un modelo de OID en rata Wistar macho, sobre:

- La ganancia de peso y la composición corporal de los animales de grupos control como con dietas altas en grasa.
- Los parámetros bioquímicos en suero: glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos, creatinina, urea, leptina, adiponectina y LPS.
- La tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina.
- La capacidad de flexibilidad metabólica.
- La lipogénesis, mediante la medición de la abundancia de mRNA de SREBP-1 y FAS en hígado.

2) Estudiar el efecto del consumo de una dieta con el concentrado o del frijol entero cocido como única fuente de proteína sobre la microbiota intestinal.

7. METODOLOGÍA

7.1. Diseño experimental

- a) Obtención del concentrado de proteína frijol en la planta Piloto del IBT
- b) Obtención del frijol entero deshidratado

Análisis Químico Proximal

Evaluación en modelo animal con ratas Wistar macho de 6 semanas de edad

1 semana de aclimatación
Dieta Chow

10 SEMANAS DE DIETA

Grupos eutanasia:
Reto metabólico
Ayuno

Grupo I: Control Caseína

Grupo II: Concentrado proteína de frijol

Grupo III : Frijol entero
(suplementado con concentrado de frijol)

Grupo IV: DAG Cas + S
(Dieta caseína alta en grasa + 5%
sacarosa en agua de bebida)

Grupo V: DAG+S + concentrado proteína
de frijol
(5% sacarosa en agua de bebida)

Grupo VI: DAG+S+ frijol entero
(suplementado con concentrado de frijol)
(5% sacarosa en agua de bebida)

Durante el experimento *in vivo*,
determinar:

- 3 veces por semana
Ganancia de peso corporal
Consumo de alimento
- Cada 15 días
Composición corporal
- Semana 6
Curva de tolerancia a la glucosa
- Semana 8
Calorimetría

Día previo al sacrificio se realizó
la recolección de heces



• **Parámetros Bioquímicos en suero:**
Glucosa, colesterol, triglicéridos, creatinina, urea, prot. C reactiva, insulina, adiponectina, leptina, LPS.



• **Evaluación de la expresión de los genes *SREBP1* y *FAS***
Evaluación de los niveles de mRNA de *SREBP1* y *FAS* en hígado mediante qPCR con química de SybrGreen™

• **Identificación de las poblaciones microbianas:** *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* *Prevotella spp.*, *Bifidobacterium spp.* y *Akermansia spp.*
Mediante técnica de qPCR, se utilizaron cebadores específicos para regiones v3 Y v5 del gen 16S.



7.2. Obtención del concentrado de proteína de frijol negro

En las investigaciones anteriores (Quiñones, 2010; Márquez, 2011; Salinas 2014) se utilizó frijol negro variedad INIFAP 8025 sembrada en la región del centro del país (Celaya, Guanajuato) y se consideraba que en este trabajo de investigación se utilizara la misma variedad. Se realizó una amplia búsqueda de esta variedad, sin embargo, no ha sido sembrada recientemente. Por lo tanto, fue necesario buscar una variedad similar de frijol negro, de preferencia con un contenido de proteínas aproximado al de la línea 8025, que es de aproximadamente 17.3% (Salinas, 2014).

El lote de frijol utilizado para este trabajo se obtuvo de la comercializadora de semillas Campo Verde S.A. de C.V, quien donó al proyecto 200 kg de frijol negro “Bola” de Zacatecas. Se eligió esta variedad de frijol debido a su % de proteína y disponibilidad de tener una muestra comercial lo más homogénea posible.

El proceso de obtención del aislado se realizó en la planta Piloto IBT (Instituto de Biotecnología, UNAM), al inicio del proceso se realizó mediante la metodología y proceso desarrollado en la tesis de Salinas (2014) y Quiñones (2010), en la figura 6 se muestra el diagrama del proceso establecido por Quiñones. El principio de extracción de proteínas y elaboración del concentrado de frijol fue el mismo, sin embargo, fue necesario realizar algunas modificaciones al proceso dado que esta variedad presentó un comportamiento diferente en algunas operaciones unitarias (Lima, 2018).

Básicamente, el proceso de aislamiento proteínico de frijol negro, consiste en la extracción por solubilidad diferencial de las fracciones proteínicas en la semilla (globulinas, glutelinas y albúminas) con posterior precipitación isoeléctrica, recuperación de proteína, tratamiento térmico (para la eliminación de factores tóxicos y antinutricionales) y finalmente secado por aspersión (Quiñones, 2010 y Salinas, 2014).

Es importante destacar los beneficios de elaborar un concentrado de proteína de frijol, que sirva como buena fuente de proteína de origen vegetal. Con esto se busca diversificar el uso del frijol como ingrediente funcional para el desarrollo de nuevos productos alimenticios que contribuya con una fuente de proteínas a los requerimientos nutrimentales, además de proporcionar beneficios a la salud.

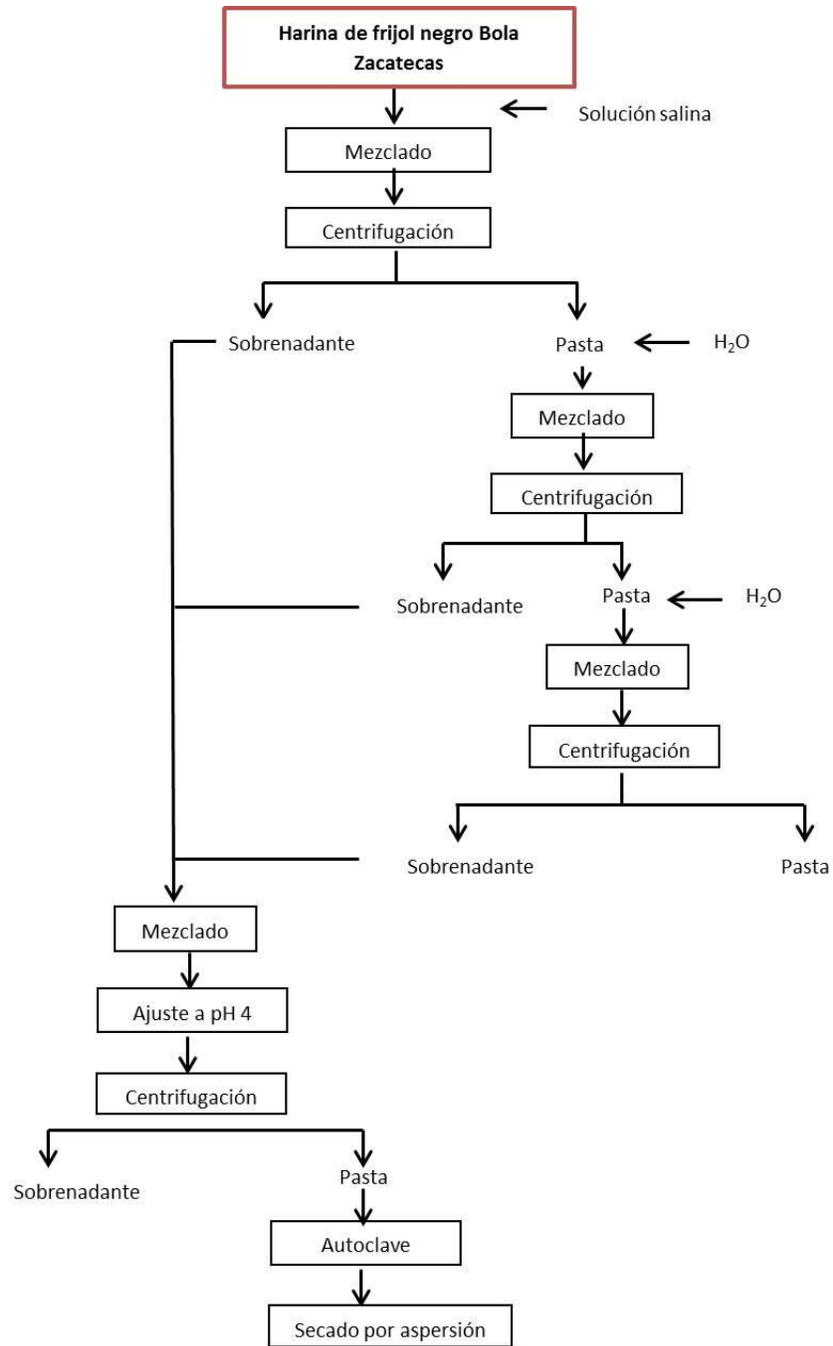


Figura 6.- Diagrama del proceso modificado de Salinas 2014.



7.3 Obtención del frijol cocido deshidratado entero

Para poder comparar los efectos metabólicos y en la microbiota intestinal se tendrá un grupo experimental que consumió el frijol completo. Para lograrlo se mandó maquilar una porción del lote de frijol Bola Zacatecas a la empresa DeFrut SA de CV, de forma que se tuviera un deshidratado con todas las fracciones de almidón del frijol entero, con un tratamiento térmico que permitiera la desactivación de los factores antinutricionales. Además, para poder formular las dietas experimentales con este frijol entero cocido y deshidratado, considerando que su contenido de proteínas es sólo de 17.8%, fue necesario suplementarlas con el concentrado de proteína de frijol, gracias a su alto contenido proteínico (68%). Lo anterior permitió evaluar, además del papel de la proteína vegetal, a los componentes del frijol completo como: fibra, almidón y almidón resistente presentes en el grano completo cocido, siendo que en el concentrado de proteína de frijol se encuentran en menor proporción respecto al grano completo.

7.4. Evaluación en modelo animal

Se utilizaron 38 ratas macho Wistar (Harlan, México) de 6 semanas de edad. Se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en cajas individuales en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Las ratas consumieron dieta Chow por una semana para aclimatación. Posteriormente se dividieron en seis grupos con dietas diferentes:

- Seis ratas se asignaron a la **dieta Control Caseína** (cubre requerimientos de dieta AIN, 17% caseína).
- Seis ratas a la **dieta DAG Cas+S**: (24% de proteína caseína) + 5% de sacarosa en agua de bebida.
- Seis ratas se asignaron a la dieta **Concentrado de frijol**: (17% proteína procedente del concentrado de frijol).
- Seis ratas se asignaron a la **dieta DAG+S+ Conc. de frijol** (24% proteína procedente del concentrado de frijol) + 5% de sacarosa en agua de bebida.
- Seis ratas se asignaron a la **dieta de frijol entero** suplementado con concentrado de frijol (17% proteína total).
- Seis ratas se asignaron a la dieta **DAG+S+ frijol entero** suplementado con concentrado de frijol (24% proteína total) + 5% de sacarosa en agua de bebida.



Todos los grupos se alimentaron *ad libitum* durante las 10 semanas de dietas experimentales. La composición de las dietas se muestra en la tabla 3.

Durante el estudio, los animales se pesaron y se registraron los pesos tres veces a la semana, para obtener una curva de crecimiento respecto al tiempo.

Se pesaron los comederos y alimento tres veces por semana. Además, se midió el volumen de agua con 5% de sacarosa con la finalidad de determinar la ingesta calórica de cada una de las ratas de experimentación.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la curva de tolerancia a la glucosa, y con la finalidad de poder evaluar la respuesta de los animales al enfrentarse a un reto metabólico considerando los posibles efectos de las diferentes dietas evaluadas, se decidió dividir el sacrificio de todos los grupos experimentales en dos modalidades diferentes:

Ayuno: Los animales se pusieron en ayuno de ocho horas y se realizó el sacrificio.

Reto metabólico: Los animales se pusieron en ayuno de ocho horas. Posteriormente se administró vía peritoneal una dosis de 2 g de glucosa / kg de peso corporal (pc) de una solución glucosada al 35% (previamente filtrada). Se realizó el sacrificio después de 30 min de haber administrado la solución de glucosa.

El sacrificio de ambos grupos se realizó colocando los animales en una cámara saturada con CO₂, para su posterior decapitación. Se recolectó la sangre de las ratas en tubos con gel separador (BD Vacutainer, BD Franklin, Lakes NJ, EUA). Los órganos colectados se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C (Revco, Rielsa).



7.5 Composición de la dieta

Tabla 3.- Composición de las dietas experimentales

	Nutriente	CONTROL			DAG		
		Control Cas	Concentrado proteína de Frijol	Frijol entero	DAG Cas+ S	DAG+ S+ Conc. frijol	DAG+ S+ Frijol entero
Fuente proteínica (g)	17% Proteína Total			24% Proteína Total			
	Caseína	18.68 g	-	-	26.37 g	-	-
	Concentrado de proteína de frijol	-	26.87 g	5.77 g	-	37.94 g	22 g
	Frijol cocido deshidratado	-	-	74.93 g	-	-	56 g
Lípidos (g)	Aceite de soya	7g	7 g	7 g	7 g	6.73 g	-
	Manteca de cerdo	-	-	-	17 g	16.35 g	17 g
Carbohidratos (g)	Almidón de maíz	40.6g	39.44 g	5.20 g	23.97 g	18.9 g	-
	Maltodextrinas	13.48 g	13.1 g	1.7 g	10.3 g	8.56 g	-
	Sacarosa	10.21 g	9.92 g	1.3 g	7.8 g	6.48 g	-
Otros componentes (g)	Fibra (Celulosa)	5 g	-	-	2.5 g	-	-
	Minerales	3.5 g	3.5 g	3.5 g	3.5 g	3.5 g	3.5 g
	Vitaminas	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g
	Colina	0.25 g	0.25 g	0.25 g	0.25 g	0.25 g	0.25 g
	TBHQ	0.0014 g	0.0014 g	0.0014 g	0.0014 g	0.0014 g	0.0014 g
Total (g)		100	100	100	100	100	



7.6. Determinación de composición corporal

Se determinó la composición corporal de todos los animales al inicio y durante los días 15, 30, 45, 60 y 75 del consumo de las dietas experimentales, mediante resonancia magnética cuantitativa utilizando el equipo ECHO-MRI (Echo Medical Systems, Houston, TX) para rata. Esta metodología permitió obtener el contenido de grasa, masa magra y agua corporal en cada animal experimental.

La masa magra cuantificada corresponde a músculo, huesos, y tejidos de órganos.

7.7. Medición de la curva de tolerancia a la glucosa (CTGO) de los animales de experimentación

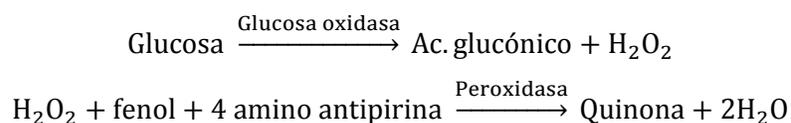
La determinación de la CTGO se realizó a la semana siete de alimentación con los diferentes grupos experimentales. Para realizar el estudio se mantuvieron a los animales en ayuno durante las ocho horas previas. Al iniciar, se realizó un corte en la punta de cola de cada animal para obtener las muestras de sangre. Se cuantificó el nivel de glucosa basal de cada uno de los animales mediante el uso de tiras reactivas para el glucómetro Contour TS™ (Bayer). El glucómetro permite medir la cantidad de glucosa mediante el método de glucosa oxidasa.

Posteriormente se administró vía peritoneal una dosis de 2g/kg pc de glucosa al 35% (previamente esterilizada por filtración), se tomaron muestras de glucosa en sangre y se cuantificaron a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración. Se graficó la CTGO por cada grupo experimental y se determinó el área bajo la curva (Método de los trapezoides).

Los resultados obtenidos se analizaron mediante una ANOVA y prueba de Bonferroni.

7.7.1. Método de la glucosa oxidasa

La glucosa oxidasa produce ácido glucónico y H₂O₂. El peróxido de hidrógeno liberado reacciona con un cromógeno (fenol/-aminoantipirina) por la reacción de Trinder, para dar una quinona que absorbe entre 492 y 550 nm. La intensidad de color producida es directamente proporcional a la concentración de glucosa (Stryer, 2003).





7.8. Determinación de coeficiente respiratorio y volumen de Oxígeno

Se realizó mediante una calorimetría indirecta con el uso del equipo Oxymax-CLAMS Lab Animal Monitoring System (Columbus Instruments, Columbus, OH, EUA). Los animales se colocaron en cajas individuales, cerradas herméticamente y conectadas a un sistema de flujo de aire. Se mantuvieron en un periodo de aclimatación, posteriormente se evaluaron durante los periodos de ayuno y etapa postprandial. Los parámetros determinados fueron: el consumo de O₂ (VO₂, mL/kg/h) y la producción de CO₂ (VCO₂, mL/kg/h), se midieron durante un lapso de 90s, repitiendo la medición cada 22 min.

El coeficiente respiratorio (RER) se calculó como la relación de CO₂ producido respecto al O₂ consumido:

$$RER = \frac{CO_{2\text{producido}}}{O_{2\text{consumido}}}$$

7.9. Determinación de parámetros bioquímicos

Para la determinación de los parámetros bioquímicos de todos los animales en ayuno, se tomó una muestra de sangre de 400 µL mediante vía senoretroorbital. La sangre obtenida mediante el sacrificio permitió obtener las cuantificaciones de los animales sometidos al reto metabólico.

Para la obtención del suero, las muestras de sangre se centrifugaron a 5500 x g durante 10 min.

Se determinaron los parámetros bioquímicos **de glucosa, colesterol, triglicéridos, proteína C reactiva** como marcador de posible inflamación, **creatinina y urea**, a partir del suero mediante el analizador COBAS C111 de Roche™.

7.9.1. Determinación de Glucosa

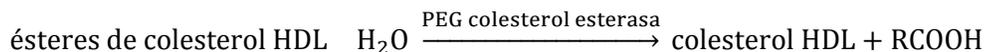
Se realizó por el método de la hexocinasa. La hexocinasa (HK) cataliza la fosforilación de la glucosa por ATP a glucosa-6-fosfato (G6P). La glucosa-6-fosfato originada es reducida a 6-fosfogluconato en presencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6F-DH), cuantificando la reducción paralela de NAD a NADH (Kaplan, 1984).



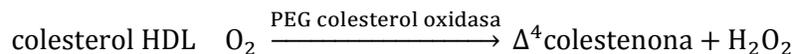


7.9.2. Determinación de colesterol

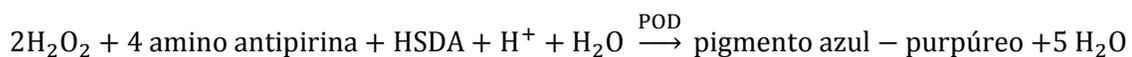
Se determinó mediante el método colorimétrico enzimático homogéneo. En presencia de iones de magnesio, el sulfato de dextrano forma complejos hidrosolubles, selectivamente con LDL, VLDL y quilomicrones resistentes contra las enzimas modificadas con PEG. La concentración del colesterol HDL se determina enzimáticamente por la colesterol esterasa y colesterol oxidasa acopladas con PEG a los grupos amínicos (aprox. 40 %). La colesterol esterasa provoca el desdoblamiento de los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos (Sugiuchi, 1995; Roche, 2013).



En presencia de oxígeno, el colesterol es oxidado por la colesterol oxidasa a Δ^4 -colestenona y peróxido de hidrógeno.



En presencia de la peroxidasa (POD), el peróxido de hidrógeno formado reacciona con 4-aminoantipirina y HSDA para formar un colorante purpúreo azul. La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración del colesterol HDL que se mide fotométricamente (Sugiuchi, 1995; Roche, 2013).



7.10. Determinación de Insulina, lipopolisacárido (LPS), leptina y adiponectina.

Se determinaron mediante un ensayo de sándwich de Elisa. ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar



la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Stryer, 1988).

Los kits utilizados para las determinaciones fueron los siguientes:

Insulina: Kit para Insulina, (Alpco.. cat. 80-INSRT-E01). La metodología se describe en el Anexo I.

Leptina: Kit para Leptina, (Abcam. cat. ab100773). La metodología se describe en el Anexo II.

Adiponectina: Kit para Adiponectina (ADP), (Cloud-Clone Corp, Houston, TX. cat. SEA605Ra). La metodología se describe en el Anexo III.

Lipopolisacárido (LPS): Kit para Lipopolisacárido (LPS), (Cloud-Clone Corp, Houston, TX. cat. CEB526Ge). La metodología se describe en el Anexo IV.

7.11. Cálculo del índice de resistencia a la insulina

Se determinó el índice de resistencia a la insulina mediante el índice HOMA:

$$\text{HOMA IR} = \frac{\left[\text{insulina} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) \right] * \left[\text{glucosa} \left(\frac{\mu\text{U}}{\text{mL}} \right) \right]}{22.5}$$

7.12. Extracción de RNA a partir de hígado

La extracción de RNA total se realizó utilizando TRIzol (Invitrogen, cat. 15596026), a través de la modificación del método de Chomczynski (1993). El TRIzol es una solución monofásica que mantiene la integridad del RNA, compuesta por fenol, hidroxiquinoleína (actúa como inhibidor de RNAasas), tiocinato de guanidina (permite romper células y componentes celulares), tiocianato de amonio y glicerol.

Se utilizaron tejidos previamente congelados a -70°C , se pusieron en nitrógeno líquido y posteriormente se realizaron cortes aproximados de 200-250 mg de tejido. Se agregó el TRIzol y se realizó la homogenización del tejido usando el equipo TissueLyser II (Qiagen, Valencia, CA, USA) y un balón. Se trataron las muestras con cloroformo para la eliminación de carbohidratos, se realizó la precipitación del RNA por isopropanol y se realizaron lavados con etanol frío al 75%. El RNA obtenido se resuspendió en agua estéril DEPC libre de RNAasas. La metodología se detalla en el Anexo V.



Se evaluó la concentración y pureza de las muestras de RNA mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA), considerando la relación A_{260}/A_{280} . Para verificar la integridad de RNA se realizaron geles de electroforesis capilar en el QiAxcel Advanced System (Qiagen, CA, USA).

7.13. Síntesis de cDNA por medio de la reacción transcriptasa reversa

Se obtuvo el DNA complementario mediante su retrotranscripción. Para la síntesis del RT se empleó el termociclador My Cycler™ (BioRad, USA). La reacción de RT se llevó a cabo en un volumen final de 22 μ L, 300 ng de RNA totales, amortiguador para la transcriptasa reversa (Tris HCL 50 mM, pH 8.3, KCl 75 mM, $MgCl_2$ 3 mM), 0.4 mM de cada dNTPs, cebador dt T 0.01 μ g/ μ L, inhibidor de RNAasa 1 U/ μ L y la transcriptasa reversa M-MULV (Invitrogen, Carlsbad, CA) 5 U/ μ L.

El programa de amplificación consistió en: 1 hora a 42°C, 5 minutos a 94°C y 30 minutos a 4°C.

Se cuantificó el cDNA mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

7.14. Expresión de los factores de transcripción SREBP-1 y FAS en hígado mediante qPCR

Para evaluar la expresión de SREBP-1 y FAS se utilizó el cDNA obtenido a partir de RNA de hígado (6.12). Mediante el qPCR con la técnica de SYBR Green I Master (Roche Applied Science, Germany) y el equipo LightCycler 480 Instrument (Roche Applied Science, Germany) se realizaron experimentos para la evaluación de expresión relativa.

Se emplearon como genes endógenos control ciclofilina y HPRT. Se realizaron rangos dinámicos en qPCR para los genes control y para los genes de interés, con las concentraciones de 2000 ng/ μ L, 500 ng/ μ L, 125 ng/ μ L, 31.25 ng/ μ L, 7.81 ng/ μ L y 1.95 ng/ μ L, además de NTC. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Se calculó la eficiencia de los rangos dinámicos para cada gen, mediante la siguiente fórmula $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$. La pendiente se calculó a partir de la curva estándar para cada gen. Para la determinación de la expresión de todos los genes, de acuerdo a los resultados de los rangos



dinámicos se decidió utilizar la dilución con concentración de 31.25 ng/μL. El programa utilizado para qPCR utilizado fue:

50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, y 45 ciclos de 94°C durante 15 s, seguido por 64°C durante 1 min. Se añadió la etapa de curva de disociación, para poder evaluar la presencia de un solo pico correspondiente al amplicón de interés. Los cebadores específicos utilizados se muestran en la Tabla 4, la mezcla de reacción utilizada se muestra en la tabla 5.

Para la cuantificación relativa se realizó el análisis de los valores de Ct (threshold cycle) y se determinó la cantidad relativa de mRNA usando el método $\Delta\Delta C_t$ y ajustando la eficiencia de acuerdo a Pfaffl.

Tabla 4.- Secuencias de cebadores utilizados para evaluar la expresión de SREBP1 Y FAS

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	
HPRT	Sentido	CTGGTGAAAAGGACCTCTCG	Olivares-García, et al. (2015).
	Antisentido	GGCCACATCAACAGGACTCT	
Ciclofilina	Sentido	TGACTTTAGGTCCCTTCTTCTTATCG	Yabe, et al. (2003).
	Antisentido	CGTGGGCTCCGTTGTCTT	
SREBP1	Sentido	CGTTGTACTIONGCAGCCACACT	Sánchez (2016)
	Antisentido	AGTGGTACTGTGGCCAGGAT	
FAS	Sentido	CGGCGAGTCTATGCCACT	Oliver, et al. (2011).
	Antisentido	ACACAGGGACCGAGTAAT	

Tabla 5.- Mezcla de reacción utilizadas para los genes control endógenos (ciclofilina y HPRT) y los genes de interés (SREBP1 y FAS)

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Vol. Adicionado
SYBR Green PCR Master Mix	2X	1X	5 μL
Cebador F	10 μM	500 nM	0.5 μL
Cebador R	10 μM	500 nM	0.5 μL
DNA	31.25 ng /μL	62.50 ng	2 μL
Agua BM	-	-	2 μL
Volumen total			10 μL



7.15. Extracción de DNA a partir de heces fecales

Se recolectaron heces fecales de cada rata un día antes del sacrificio mediante el uso de cajas metabólicas. Se guardaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 500 μ L de RNA $later$ (Qiagen, cat. 76104). La extracción y purificación de ADN se realizó mediante el kit QIAamp® DNA Stool Mini (Qiagen, cat. 51504). El kit comercial se basa en la ruptura celular con detergentes iónicos y con enzimas (proteínasa K). La purificación se realiza con la pastilla Inhibitex por unión específica del ADN a una membrana de sílica, se realizan lavados para eliminar sustancias que puedan inhibir la reacción de PCR. Finalmente, el ADN se eluye con buffer ATE y se conserva a -20°C hasta su uso. La metodología se detalla en el Anexo V.

Se cuantificó el ADN mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 y mediante el uso del Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) este es un fluorómetro que permite cuantificar solamente ácidos nucleicos de doble hebra, obteniendo así una cuantificación más exacta.

7.16. Caracterización de las poblaciones microbianas en el intestino de ratas experimentales

Se determinaron las phylas de interés mediante la técnica de PCR en tiempo real, usando la técnica de Syber Green. Los ensayos de qPCR se realizaron en el termociclador Ligth Cycler 480 II de Roche ®, para normalizar se realizó la amplificación de una parte constitutiva del gen 16S, conocida como cebadores universales. Las secuencias de los cebadores utilizados para las diferentes phyla a evaluar, se basan en las regiones v3 Y v5 del gen 16S. Se realizaron previamente pruebas en Syber Green para verificar que en la amplificación se obtenga un solo producto (curva de disociación), para todos los pares de cebadores se obtuvo una amplificación correcta.

En la tabla 6 se muestran las secuencias de cebadores para la determinación de las phyla estudiadas de la microbiota intestinal. Las mezclas de reacción utilizadas se muestran en las tablas 7 y 8; las condiciones de reacción en las tablas 9, 10, 11 y 12.

**Tabla 6.-** Secuencias de cebadores utilizados

Phyla	Secuencia	Tm	Referencia
Universal	F: 5'-CGGTGAATACGTTCCCGG -3'	60.7	Furet, et al. (2009).
	R: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT -3'	56.9	
<i>Bacteroidetes</i>	F: 5'-AACGCTAGCTACAGGCTTAACA-3'	61.8	Dick, et al. (2004).
	R: 5'-ACGCTACTTGGCTGGTTCA-3'	63.5	
<i>Firmicutes</i>	F: 5'-GCGTGAGTGAAGAAGT-3'	50.9	Bacchetti, et al. (2011).
	R: 5'-CTACGCTCCCTTTACAC-3'	52.9	
<i>Prevotella spp.</i>	F: 5'- GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT -3'	66.1	Rinttil, et al. (2004).
	R: 5'- CGGAYGTAAGGGCCGTGC -3'	71.1	
<i>Bifidobacterium spp</i>	F: 5'- TCGCGTCYGGTGTGAAAG-3'	66.7	Rinttil et al. (2004).
	R: 5'- CCACATCCAGCRTCCAC-3'	67.8	
Actinobacteria	F: 5'-AAGCCCAAGACATAAGGGGC -3'	60.0	Sánchez (2016).
	R: 5'-AGAGTGCGGTAGGGGAGATT -3'	60.1	
<i>Verrucomicrobia</i>	F: 5'-CGGYCCAGACACCTACGGGT-3'	64.7	Sánchez (2016).
	R:5'-TACGGGTGGCAGCAGTCGAGAA-3'	65.3	
<i>Akkermansia spp.</i>	F: 5'-CAGCACGTGAAGGTGGGGAC-3'	70.3	Derrien et al. (2007)
	R: 5'- CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT-3'	68.5	

Tabla 7.- Mezcla de reacción utilizadas para el gen universal, *Firmicutes*, *Prevotella spp.*, *Bifidobacterium spp.* y *Akkermansia spp.*

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Vol. Adicionado
SYBR Green PCR Master Mix	2X	1X	5 µL
Cebador F	10 µM	500 nM	0.5 µL
Cebador R	10 µM	500 nM	0.5 µL
DNA	10 ng /µL	20 ng	2 µL
Agua BM	-	-	2 µL
Volumen total			10 µL

Tabla 8.- Mezcla de reacción utilizadas para la búsqueda de *Bacteroidetes*

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Vol. Adicionado
SYBR Green PCR Master Mix	2X	1X	5 µL
Cebador F	10 µM	350 nM	0.35 µL
Cebador R	10 µM	350 nM	0.35 µL
DNA	10 ng /µL	20 ng	2 µL
Agua BM	-	-	2 µL
Volumen total			10 µL



Tabla 9.- Condiciones de amplificación para PCR tiempo real (Roche) para la cuantificación relativa de gen universal y *Prevotella spp.*

Condiciones	Tiempo
50°C	2 min
95°C	10 min
45 ciclos:	
95°C	15 s
64°C	1 min

Se añadió la etapa de curva de disociación.

Tabla 10.- Condiciones de amplificación para PCR tiempo real (Roche) para la cuantificación relativa de *Firmicutes*

Condiciones	Tiempo
50°C	2 min
95°C	10 min
45 ciclos:	
95°C	15 s
60°C	1 min

Se añadió la etapa de curva de disociación.

Tabla 11.- Condiciones de amplificación para PCR tiempo real (Roche) para la cuantificación relativa de *Bacteroidetes* y *Actinobacterias*

Condiciones	Tiempo
50°C	2 min
95°C	10 min
45 ciclos:	
95°C	15 s
66°C	1 min

Se añadió la etapa de curva de disociación.

Tabla 12.- Condiciones de amplificación para PCR tiempo real (Roche) para la cuantificación relativa de *Akkermansia spp.* y *Bifidobacterium spp.*

Condiciones	Tiempo
50°C	2 min
95°C	10 min
45 ciclos:	
95°C	15 s
67°C	1 min

Se añadió la etapa de curva de disociación.



7.17. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianzas (ANOVA) con un nivel de significancia de $p < 0.05$ seguido de una prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Turkey.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Harina de frijol crudo y concentrado de frijol

Se realizó el proceso de obtención del concentrado de frijol negro bola en la planta piloto del IBT. En la tabla 13 se muestra el análisis químico proximal de la harina de frijol crudo (materia prima), concentrado de proteína de frijol y el frijol entero.

Se midieron las unidades de inhibidor de tripsina (UIT) para el concentrado de proteína de frijol y frijol entero, ambos poseen una cantidad de inhibidores de tripsina aceptables (<30 UIT) para el consumo de la ratas.

En la tabla 14 se muestran los resultados de % de almidón y almidón resistente del concentrado de proteína de frijol y del frijol cocido deshidratado. Se observa que el frijol entero tiene un mayor porcentaje de almidón resistente, el cual podría generar un cambio en la microbiota intestinal. En la tabla 15 se muestra el porcentaje de almidón resistente en cada dieta experimental, se observa que hay mayor concentración en las dietas con frijol entero.

Tabla 13.- Análisis químico proximal (AQP) de harina de frijol negro bola, concentrado de frijol negro y frijol entero deshidratado.

Análisis Químico Proximal*			
	Frijol negro crudo (materia prima) ^a	Concentrado de proteína de frijol negro ^b	Frijol entero deshidratado ^c
Proteína Cruda (Nitrógeno*6.25)	21.42	63.27	17.82
Extracto Etéreo (Lípidos)	1.52	2.43	1.12
Cenizas	3.84	4.59	3.34
Fibra dietética total	18.54	23.74	17.27
Carbohidratos digeribles totales (por diferencia)	45.97	3.20	55.56

*Resultados expresados en 100 g base seca. Método AOAC Químico Proximal (2005)
% Humedad: 8.71% (a), 2.77% (b), 4.89% (c).

Tabla 14.- Porcentaje de almidón y almidón resistente en el concentrado de proteína de frijol y el frijol entero deshidratado.

Muestra	Almidón total * (g/100g)	Almidón resistente ** (g/100g)
Concentrado de proteína de frijol	11.01 ± 0.27	1.39 ± 0.06
Frijol entero deshidratado	51.24 ± 0.43	3.49 ± 0.08

Valores en base seca. * Método AOAC 996.11, AACC 76.13; ** Método AOAC 2002.02, AACC 32-40.01

Tabla 15.- Porcentaje de almidón y almidón resistente en las dietas experimentales.

DIETAS						
g/100 g dieta	Control Cas	Concentrado frijol	Frijol entero	DAG Cas + S	DAG+S + Conc. frijol	DAG+S + Frijol entero
Almidón resistente	-	0.371	2.7	-	0.52	2.23

8.2. Evaluación en modelo animal

En la figura 7, se muestra la distribución de peso de todos los animales de cada grupo, se observa que no se encuentra diferencia en la distribución entre grupos.

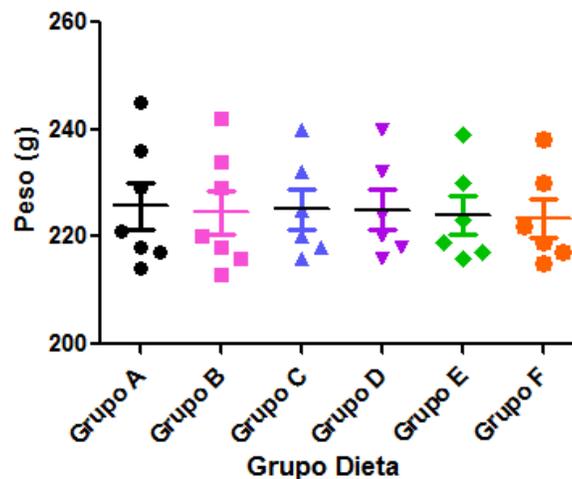


Figura 7.- Distribución de pesos en los grupos

8.2.1. Curva de crecimiento en ratas Wistar macho

En la figura 8 se muestra la gráfica de peso corporal y la ganancia de peso de todos los grupos experimentales durante las 10 semanas de tratamiento. Como se puede observar en

la figura 8a y tabla 16, el grupo alimentado con dieta DAG Cas +S tuvo un incremento de peso corporal de 25 % respecto al grupo control Cas.

El grupo con la dieta de concentrado mostró menor ganancia de peso respecto al grupo de caseína, sin embargo, la diferencia no es significativa (figura 10). El grupo de frijol entero mostró 25% menos de ganancia de peso respecto al grupo control de caseína (Tabla 16), siendo una diferencia significativa.

En cuanto a los grupos alimentados con dietas alta en grasa (figura 10 y tabla 16), se observó menor ganancia de peso promedio entre los grupos DAG+S+ conc. frijol y DAG+S+ frijol entero respecto al grupo DAG Cas+ S. (Tabla16). Esto muestra que el consumo de concentrado y/o frijol entero en la dieta produce un aumento en peso menor que el aumento obtenido con la dieta que tiene la misma concentración de proteína y calorías, pero basada en caseína.

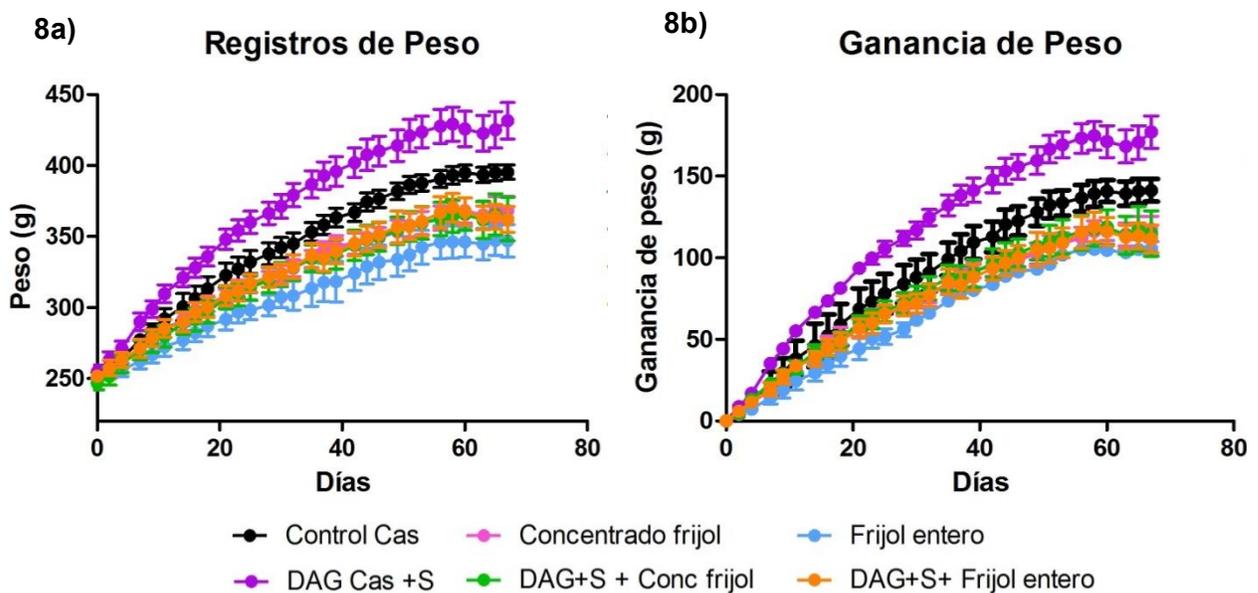


Figura 8.- Curva de crecimiento y ganancia de peso de ratas Wistar macho de todos los grupos experimentales. 8a. Curva de crecimiento. 8b. Gráfico de ganancia de peso.

Ganancia de Peso

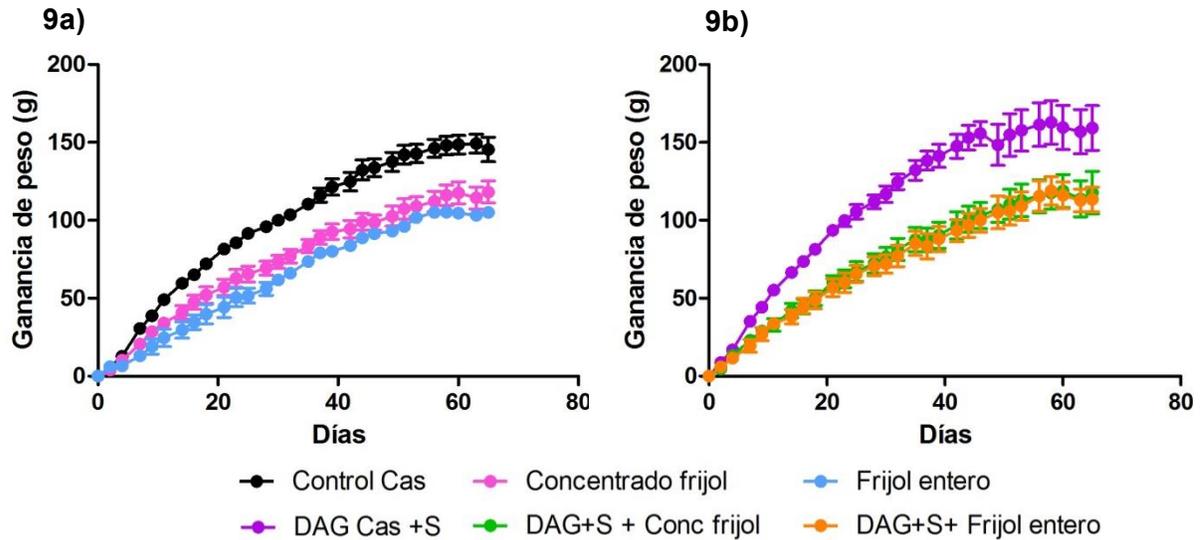


Figura 9.- Curvas de ganancia de peso. Figura 9a.-Curva de ganancia de peso de los grupos con dietas modificadas. Figura 9b.- Curva de ganancia de peso de los grupos con dietas DAG.

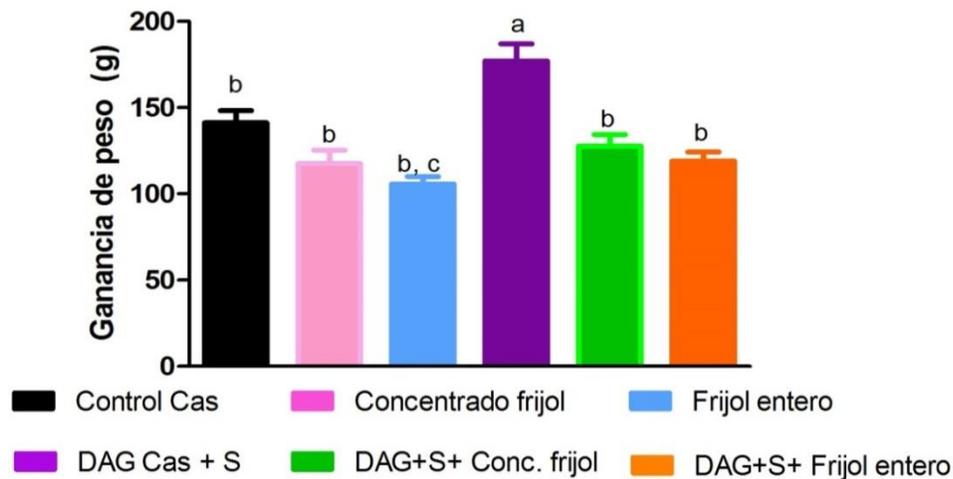


Figura 10.- Ganancia total de peso Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. $p < 0.0001$, las letras significan diferencias entre los grupos $a > b > c > d$. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía ($p < 0.05$) y prueba post-hoc de Turkey.

Tabla 16.- Datos de ganancia final (g) de peso de cada grupo. Se muestran las diferencias existentes entre el grupo control Cas y el grupo con dieta DAG Cas + S.

Grupo	Ganancia final (g)	% (vs. Control Cas)	% (vs. DAG Cas +S)
Control Cas	141 ± 7 ^b	-	↓ 20
Concentrado frijol	118 ± 8 ^b	↓ 17	↓ 33
Frijol entero	106 ± 4 ^{b,c}	↓ 25	↓ 40
DAG Cas +S	177 ± 9 ^a	↑ 25	-
DAG + S + Conc. frijol	127 ± 6 ^b	↓ 10	↓ 27
DAG + S + Frijol cocido	119 ± 5 ^b	↓ 16	↓ 32

8.2.2. Consumo de alimento

El consumo calórico de alimentos de todos los grupos no muestra diferencias significativas, por lo que las variaciones en el peso corporal no son debido a una diferencia en la ingesta calórica, más bien se debe a la fuente de proteína. En la figura 11 se muestra el gráfico de ingesta (kcal) de alimento. Se ha considerado el contenido calórico del agua con sacarosa.

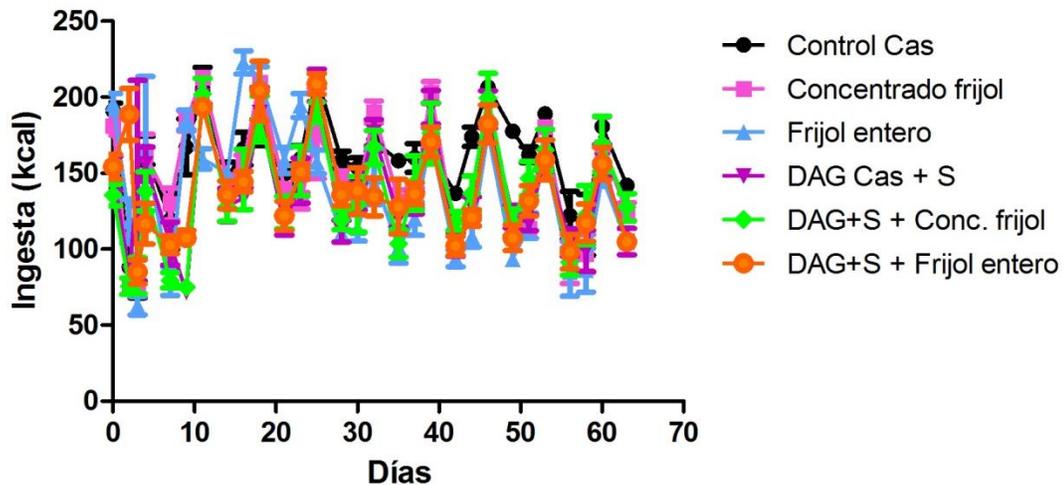


Figura 11.- Ingesta calórica de alimento de todos los grupos experimentales. Los resultados se expresaron en promedio ± SEM. $p = 0.698$ Los datos fueron analizados mediante ANOVA ($p < 0.05$)

8.2.3. Composición corporal

Se determinó la composición corporal por resonancia magnética al inicio del experimento y a los días 15, 30, 45, 60 y 75. En las figuras 12 y 13 se muestra el porcentaje de grasa y masa magra de todos los animales antes de comenzar con las diferentes dietas. En las figuras 14 y 15 se muestran los porcentajes de masa grasa y masa magra medidos durante el experimento; en la tabla 17 se muestran los porcentajes obtenidos al final del experimento.

De los grupos de dietas con 17% proteína, la dieta de frijol entero es la que obtuvo el menor porcentaje de grasa corporal y mayor porcentaje de masa magra, sin mostrar diferencia significativa.

Los animales que consumieron la dieta DAG Cas + S mostraron a final del experimento 10% más de grasa respecto al grupo control de caseína (Tabla 17). Los animales asignados a las dietas DAG+S+ Conc. frijol y DAG+S+ frijol entero, a pesar de consumir dietas con alto contenido de grasa, no muestran aumento significativo en el porcentaje de grasa corporal respecto a su grupo control, ni muestran pérdidas considerables de masa magra por lo que se infiere que tampoco pérdidas de masa muscular. Lo anterior indica que a pesar de consumir DAG, el consumo de concentrado y/o frijol entero en la dieta permite contrarrestar la ganancia de peso, de grasa y la pérdida de masa magra (incluyendo músculo) respecto a la dieta DAG+ S, siendo incluso la composición corporal igual (estadísticamente) a las obtenidas por las dietas control en un consumo durante 10 semanas.

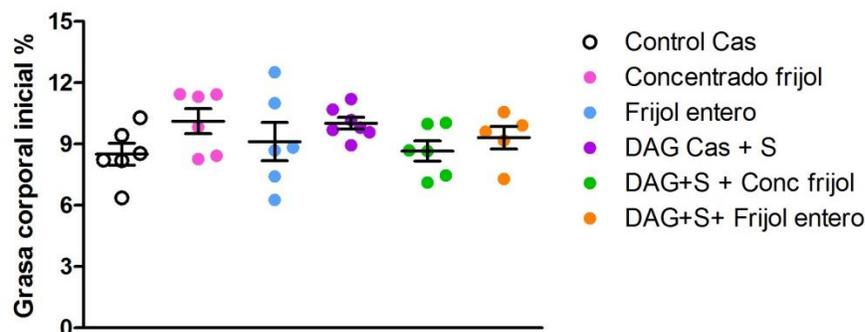


Figura 12.- Porcentaje de grasa corporal antes del consumo de la dieta. Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. $p= 0.280$ Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía ($p<0.05$)

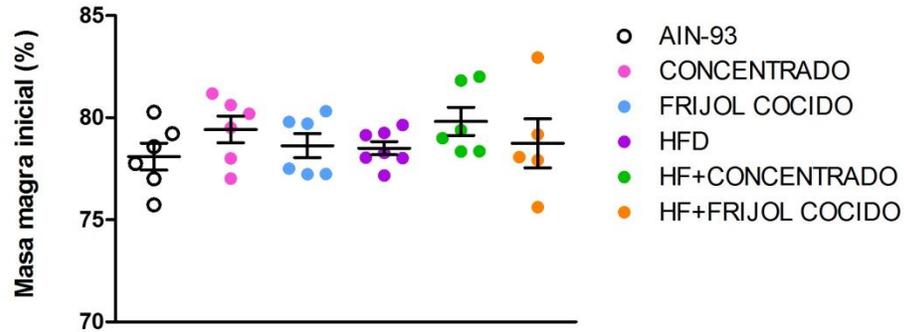


Figura 13.- Porcentaje de masa magra antes del consumo de la dieta. Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. $p = 0.332$ Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía ($p < 0.05$)

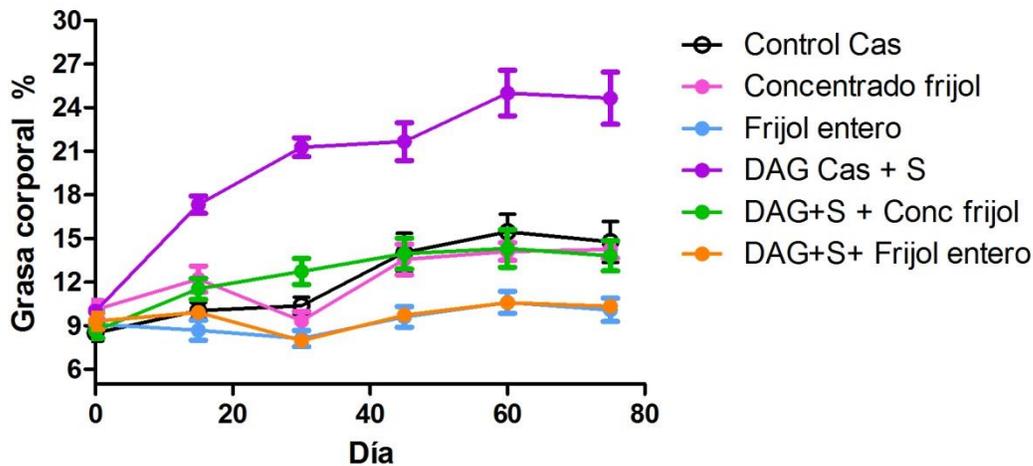


Figura 14.- Porcentaje de grasa corporal durante el experimento. Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. $p = 0.0065$ Los datos fueron analizados mediante ANOVA ($p < 0.05$)

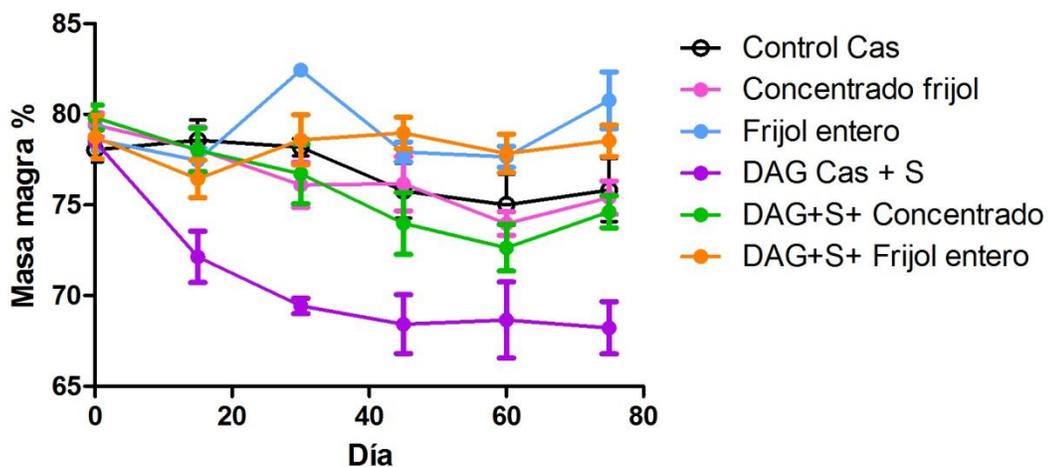


Figura 15.- Porcentaje de masa magra durante el experimento. Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. $p < 0.0001$ Los datos fueron analizados mediante ANOVA ($p < 0.05$)



Tabla 17.- Porcentaje de grasa y masa magra al final del experimento

Grupo	% Grasa final	% masa magra final
Control Cas	14.78 ± 1.41 ^b	75.82 ± 1.73 ^a
Concentrado frijol	14.26 ± 0.61 ^b	75.41 ± 0.92 ^a
Frijol entero	10.10 ± 0.81 ^b	80.78 ± 1.57 ^a
DAG Cas +S	24.7 ± 1.80 ^a	68.23 ± 1.44 ^b
DAG + S + Conc. frijol	13.82 ± 1.03 ^b	74.62 ± 0.88 ^a
DAG + S + Frijol cocido	10.34 ± 0.28 ^b	78.55 ± 0.87 ^a

8.2.4. Conclusiones parciales

- Se presentaron diferencias significativas de ganancia de peso y composición corporal entre el grupo con dieta Control Cas y el grupo DAG Cas + S.
- El consumo de frijol entero y concentrado de proteína de frijol, proporcionó menor ganancia de peso.
- El consumo de frijol entero presentó un menor porcentaje de grasa final y mayor porcentaje de masa magra final respecto al grupo control Cas y con dieta de concentrado de frijol.
- Las dietas DAG+S+ Conc. frijol y DAG+S+ frijol entero mostraron ganancias de peso y composición corporal similares a los valores obtenidos por el grupo control Cas (sin grasa adicionada), por lo que el concentrado de frijol y el frijol entero lograron conservar el peso y composición corporal adecuados en los animales, a pesar de administrarse en una dieta alta en grasa.

8.3. Calorimetría

8.3.1. Coeficiente respiratorio (RER)

Se determinó el RER (Coeficiente Respiratorio) de todos los grupos experimentales en la semana siete de consumo de las dietas. En la figura 16 se graficaron los valores de RER en intervalos de 22 min mostrados por el equipo OxyMax durante la etapa de ayuno y la etapa postprandio. En la figura 17 y tabla 18, se muestra el promedio de estos resultados.

Los datos obtenidos del intervalo 0 al 20 corresponden a la etapa de ayuno. Durante esta etapa, solamente se muestra diferencia significativa entre el grupo control (RER: 0.779) y el grupo que consumió la dieta DAG cas +S (0.757). Los valores de RER (Tabla 18) cercanos



a 0.7, indican la oxidación de lípidos, en el caso de ayuno de todos los grupos experimentales.

Los intervalos sombreados en gris (intervalo 20-55 fig. 16) corresponden a los resultados obtenidos durante la noche, en esta etapa cuando los animales tuvieron libre acceso al alimento. Todas las dietas control mostraron un aumento en el RER ($RER \approx 1$), esto significa que las ratas correspondientes fueron capaces de intercambiar entre la oxidación de lípidos a la oxidación de carbohidratos, al consumir alimento.

El grupo con dieta DAG Cas+ S no mostró aumento en el RER durante el periodo postprandio, es decir que este grupo presentó inflexibilidad metabólica, lo cual indica que las ratas no fueron capaces de realizar el cambio hacia la oxidación de carbohidratos al tener el sustrato disponible durante el consumo de alimento. Su incapacidad para almacenar energía y para transformar los lípidos a glucosa, de acuerdo a los datos de volumen de O_2 consumido, se acompaña con una disminución de la capacidad oxidativa de la mitocondria (ver adelante en sección 7.3.2) y un aumento de la grasa intramuscular (Fig. 14), lo que a su vez podría causar una estimulación de las vías de inflamación, lo que finalmente conlleva un riesgo metabólico aumentado.

Sin embargo el grupo DAG+S+ Conc. frijol presentó durante la etapa post-prandio un RER promedio de 0.813. Esto indica un uso mixto de sustratos, por lo que, a pesar de tener una dieta con alto contenido de grasa, los animales experimentales de este grupo no muestran inflexibilidad metabólica.

El grupo con dieta DAG+S + frijol entero mostró durante la etapa post-prandio un RER promedio de 0.860, lo cual indica igualmente un uso mixto de sustrato; sin embargo el RER comienza a subir en un intervalo tardío (después del intervalo 30), siendo esta dieta la que permite contrarrestar en mayor proporción el efecto de un alto consumo de grasa.

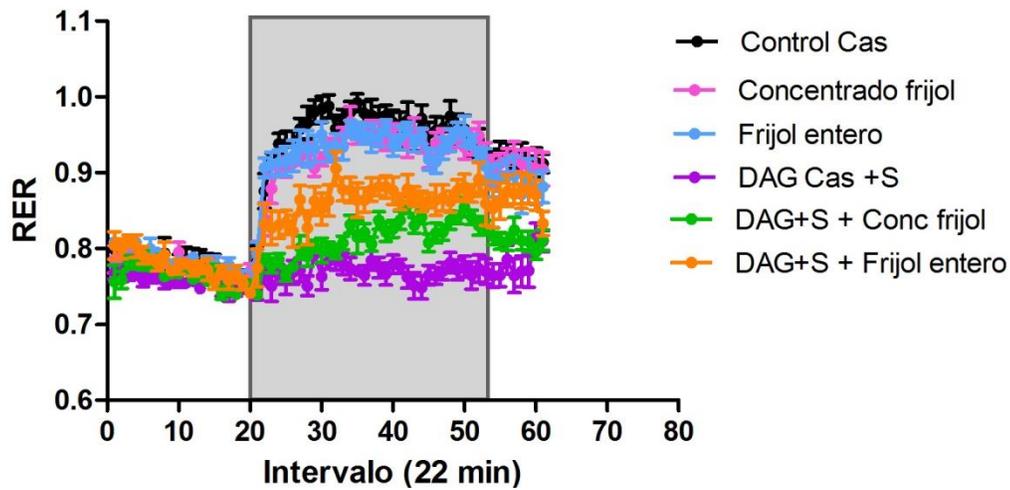


Figura 16.- RER (Coeficiente respiratorio) de los grupos con dietas AIN modificadas y dietas alta en grasa, determinados a la semana 7 de dietas experimentales. Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. $p < 0.0001$ Los datos fueron analizados mediante ANOVA ($p < 0.05$)

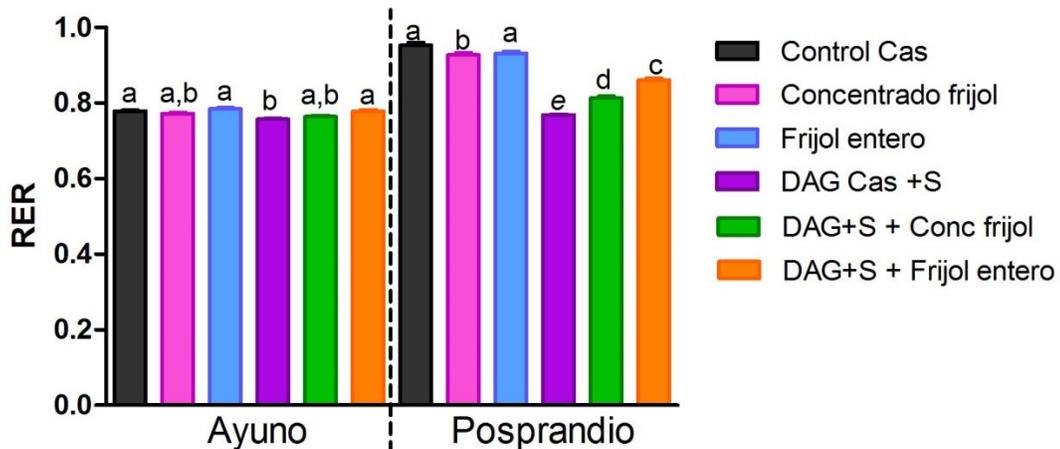


Figura 17.- RER promedio en la etapa de ayuno y postprandio. Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. Ayuno y Posprandio: $p < 0.0001$, las letras significan diferencias entre los grupos $a > b > c > d > e$. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía ($p < 0.05$) y prueba post-hoc de Turkey.



Tabla 18.- Valores de RER promedio en etapa de ayuno y postprandio

Grupo	RER Promedio Ayuno	RER Promedio Postprandio
Control Cas	0.779 ± 0.003 ^a	0.953 ± 0.007 ^a
Concentrado frijol	0.772 ± 0.003 ^{a,b}	0.927 ± 0.006 ^b
Frijol entero	0.784 ± 0.003 ^a	0.932 ± 0.005 ^a
DAG Cas +S	0.757 ± 0.002 ^b	0.768 ± 0.002 ^e
DAG + S + Conc. frijol	0.764 ± 0.003 ^{a,b}	0.813 ± 0.005 ^d
DAG + S + Frijol entero	0.778 ± 0.004 ^a	0.861 ± 0.004 ^c

8.3.2. Volumen de Oxígeno (VO₂)

En la figura 18 se muestran los valores de Volumen de Oxígeno (en intervalos de 22 min), los datos del intervalo 0 al 20 corresponden a la etapa de ayuno y los sombreados en gris (20-55) corresponden a los resultados obtenidos durante la noche (con alimento de libre acceso).

En la figura 19 se muestran los valores promedio de VO₂ en las etapas de ayuno y postprandio, en la cual se observa una diferencia entre el grupo DAG Cas +S vs. el resto de los grupos. De acuerdo al resultado obtenido se sugiere que el grupo con dieta DAG Cas +S es menos funcional metabólicamente, es decir, es incapaz de oxidar de manera adecuada los sustratos para la obtención de energía y disminuye la capacidad oxidativa de la mitocondria.

La figura 20 muestra los resultados promedio de los valores obtenidos del VO₂ durante las 24 horas de experimento. No se encontró diferencia significativa entre las dietas control, concentrado y de frijol entero. Sin embargo, sí se encontró diferencia significativa entre el VO₂ consumido del grupo DAG Cas +S y los grupos DAG+S + Conc. frijol, DAG+S+ frijol entero; esto significa que al consumir las dietas altas en grasa complementadas con frijol es posible conservar la funcionalidad metabólica y oxidación adecuada para la obtención de energía, es decir. que mantuvieron su gasto energético.

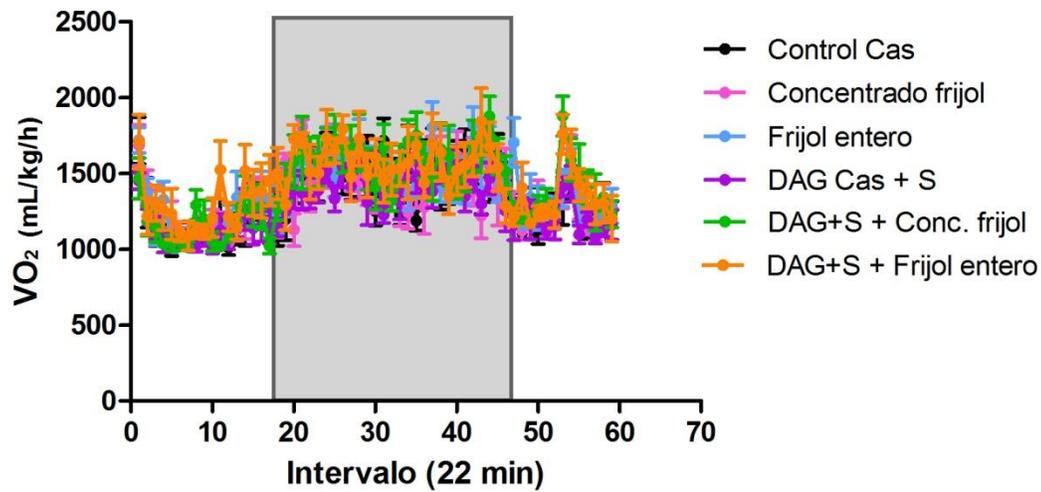


Figura 18.- Valores de VO_2 en ayuno y postprandio

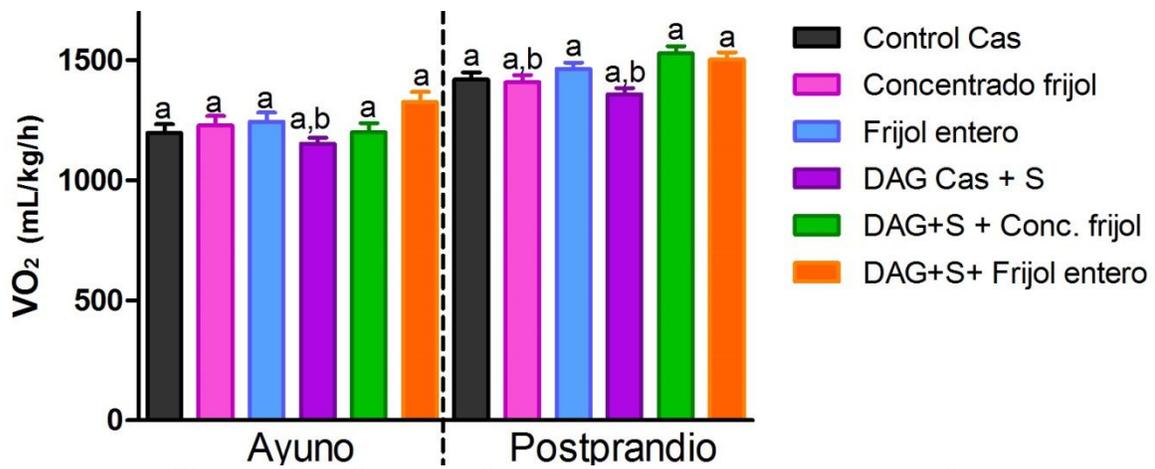


Figura 19.- VO_2 promedio en la etapa de ayuno y postprandio.

Figura 19.- Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. Ayuno y Postprandio: $p < 0.0001$, las letras significan diferencias entre los grupos $a > b$. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía ($p < 0.05$) y prueba post-hoc de Turkey.

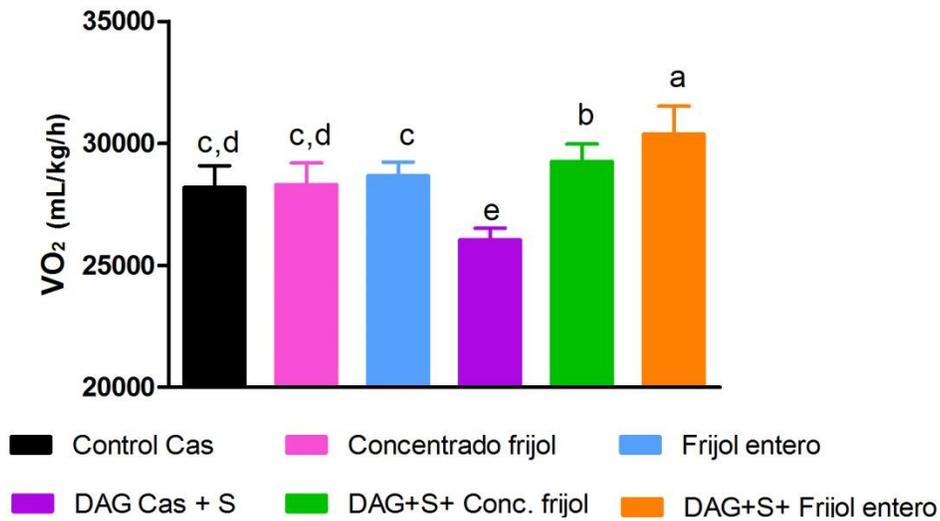


Figura 20.- VO₂ promedio en las 24 horas de estudio

Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. Ayuno y Postprandio: $p < 0.0168$, las letras significan diferencias entre los grupos $a > b > c > d > e$. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía ($p < 0.05$) y prueba post-hoc de Turkey.

8.3.3. Conclusiones parciales

- El grupo con las dietas control, concentrado y frijol entero mostraron capacidad de cambio de utilización de sustrato (flexibilidad metabólica).
- El grupo con dieta DAG Cas + S mostró inflexibilidad metabólica. Los grupos DAG+S + Conc. frijol y DAG+S + Frijol entero presentaron un uso de sustrato mixto, lo que indica que, a pesar de la grasa en altas cantidades, los animales aún no presentan inflexibilidad metabólica.
- El frijol entero logró contrarrestar en mayor proporción los efectos de una dieta alta en grasa de acuerdo al VO₂, es decir lograron mantener la eficiencia de O₂ consumido, capacidad oxidativa de la mitocondria y oxidación para la obtención de energía, lo que se refleja en el valor de RER obtenido y en el gasto energético.

8.4. Curva de tolerancia a la glucosa

Se obtuvieron las gráficas de la CTGO por grupo y se determinó el área bajo la curva. En la figura 21 se presentan los resultados obtenidos.

El grupo control Cas muestra una CTGO típica, donde se incrementan los niveles de glucosa en suero entre los 15 y 30 minutos después de la administración, y disminuyen de manera gradual hasta regresar a los niveles basales. Por el contrario, el grupo con dieta DAG Cas+S, muestra un incremento en la glucosa, y no logró regresar a los niveles basales aún después de 120 min posteriores a la administración, mostrando una intolerancia a la glucosa.

Por el contrario, los grupos con dietas DAG+S+ Conc. frijol y DAG+S+ frijol entero mostraron CTG muy similares a las obtenidas por los grupos de concentrado frijol y frijol entero bajos en grasa.

En la gráfica del área bajo la curva (ABC) de la Figura 24 y la tabla 19, se observa que el ABC del grupo alimentado con frijol entero muestra una disminución del 31% respecto a la obtenida por el grupo de control caseína, siendo así significativamente diferente tanto del grupo control Cas como del grupo de Concentrado de frijol.

En cuanto a las dietas altas en grasa, los grupos con dieta DAG+S + Conc. frijol y DAG+S+ frijol obtuvieron un área bajo la curva muy similar a las dietas control, siendo ambas \approx 50% menores a la ABC obtenida por el grupo DAG Cas +S.

Por lo anterior, se puede decir que el consumo de frijol en la dieta tiene un efecto positivo al mejorar la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina.

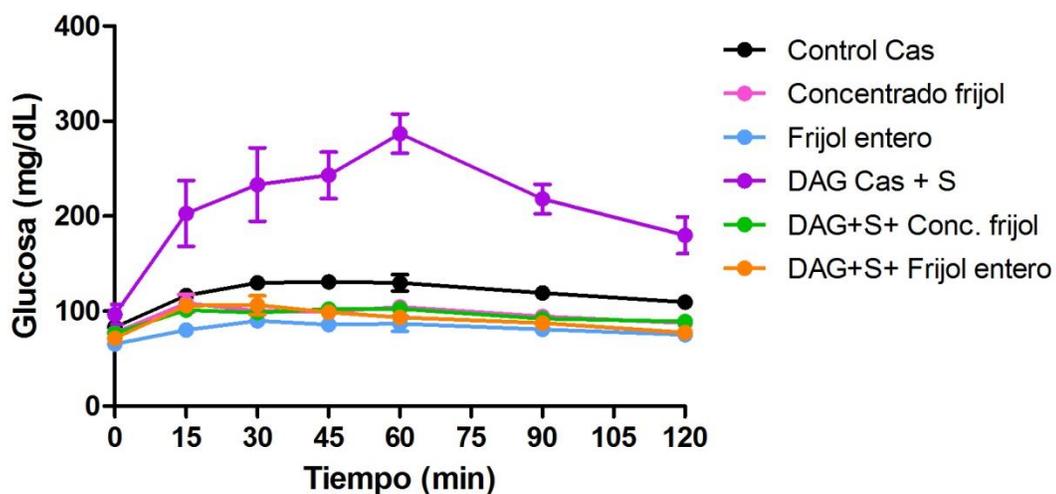


Figura 21.- Curva de tolerancia a la glucosa de todos los grupos experimentales.

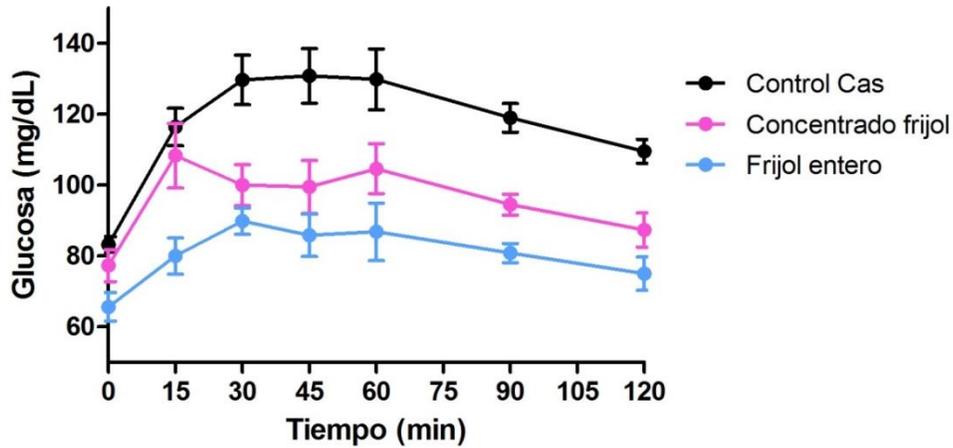


Figura 22.- Curva de tolerancia a la glucosa del grupo control, concentrado y frijol entero.

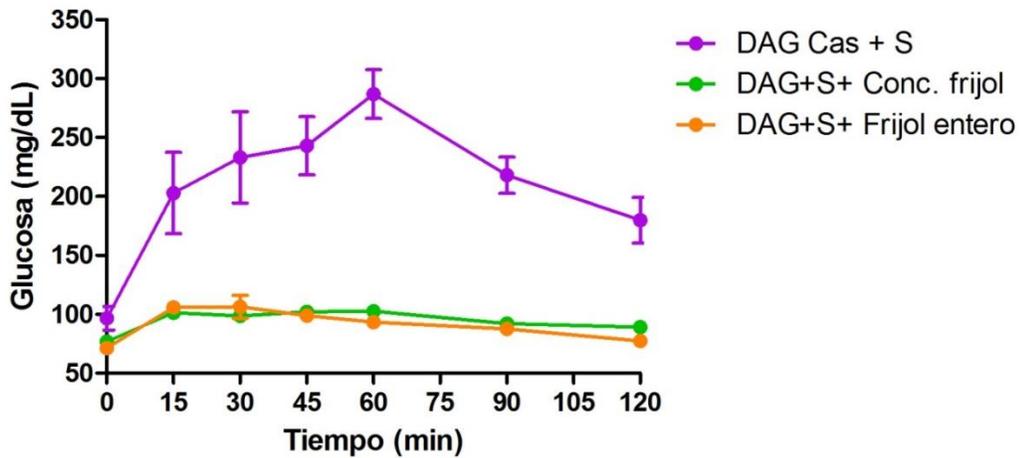


Figura 23.- Curva de tolerancia a la glucosa de todos los grupos con DAG.

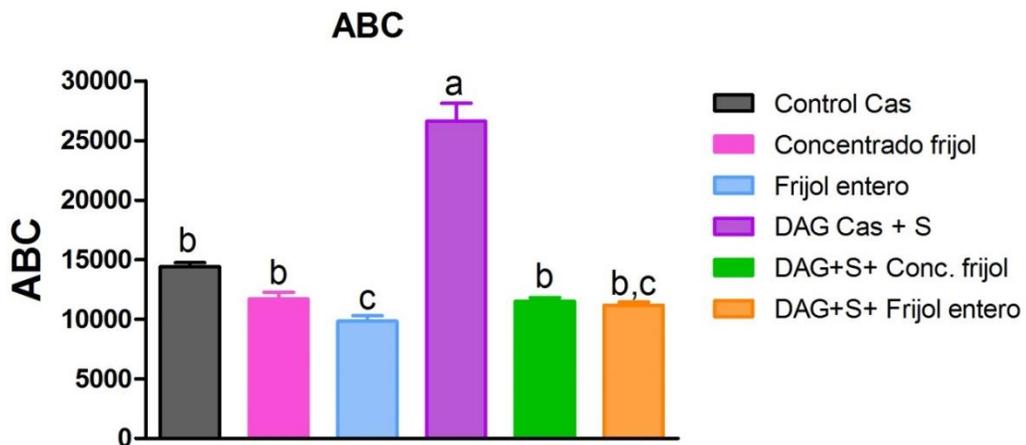


Figura 24.- Área bajo la curva de las CTGO de los diferentes grupos experimentales. Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM, $p < 0.0001$, las letras significan diferencias entre los grupos $a > b > c$. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía ($p < 0.05$) y prueba post-hoc de Turkey.



Tabla 19.- Comparativo (%) área bajo la curva de los distintos grupos, respecto a la dieta control y dieta DAG + S

Grupo	% ABC respecto a Control Cas	% ABC respecto a DAG Cas + S
Control Cas	-	↓ 45.81
Concentrado frijol	↓ 18.85	↓ 56.03
Frijol entero	↓ 31.80	↓ 63.04
DAG Cas +S	↑ 84.54	-
DAG + S + Conc. frijol	↓ 20.06	↓ 56.68
DAG + S + Frijol cocido	↓ 22.62	↓ 58.07

8.4.1. Conclusiones parciales

- El ABC obtenida por el grupo con dieta DAG Cas +S fue 84.5% mayor respecto al grupo control Cas, esto muestra las consecuencias causadas por el modelo de OID, como la intolerancia a la glucosa.
- El consumo de concentrado de proteína de frijol en la dieta tiene un efecto positivo al mejorar la tolerancia a la glucosa y la disminución de la resistencia a la insulina, cuando la dieta es alta en grasa. En dietas balanceadas consumir el concentrado de proteína de frijol mantiene un estado metabólico normal.
- El consumo de frijol en la dieta tiene un efecto positivo al mejorar la tolerancia a la glucosa, tanto en dietas balanceadas, e incluso acompañado del consumo de una dieta alta en grasa.

8.5. Parámetros bioquímicos en suero de los diferentes grupos experimentales

Se determinaron los parámetros bioquímicos de glucosa, colesterol, triglicéridos, prot. C reactiva, creatinina y urea a partir del suero de los grupos en ayuno y en reto metabólico. En la figura 25 se muestran los valores obtenidos de glucosa, colesterol y triglicéridos y en la figura 26 se muestran los valores de Prot. C reactiva, urea y creatinina.

Se determinaron los parámetros bioquímicos de glucosa, colesterol, triglicéridos, proteína C reactiva, creatinina y urea, a partir del suero de los grupos en ayuno y en reto metabólico.



En la figura 25 se muestran los valores obtenidos de glucosa, colesterol y triglicéridos y en la figura 26 se muestran los valores de Prot. C reactiva, urea y creatinina.

8.5.1. Glucosa

En ayuno (tabla 20), los valores de glucosa de la dieta control Cas, concentrado de frijol y frijol entero no muestran diferencias significativas. El grupo con dieta DAG Cas+ S muestra diferencia significativa respecto a los grupos DAG+S+ Conc. frijol y DAG+S+ frijol entero; esto indica que los grupos de ratas que consumieron DAG pero acompañados de frijol no mostraron un aumento en glucosa en sangre.

En las ratas sometidas al reto metabólico (tabla 21), se encontraron diferencias significativas entre los grupos con DAG: al recibir el estímulo, el grupo DAG Cas +S mostró un aumento significativo en la concentración de glucosa en sangre respecto a los grupos con dietas DAG+S+ Conc. frijol y DAG+S+ frijol entero.

8.5.2. Colesterol

En ayuno (tabla 20), el grupo que consumió la dieta de frijol entero mostró una concentración de colesterol significativamente menor respecto a los demás grupos de dietas control. Los grupos DAG+S+ Conc. frijol y DAG+S+ frijol entero, mostraron menor concentración de colesterol respecto al grupo DAG Cas, es decir que las dietas altas en grasa con frijol y/o concentrado lograron contrarrestar el aumento de colesterol.

En el reto metabólico (tabla 21), el grupo con la dieta de frijol entero mostró menor concentración de colesterol respecto al resto de las dietas.

8.5.3. Triglicéridos

En ayuno y reto metabólico (Figura 25, tabla 20 y 21), el grupo de frijol entero mostró una concentración significativamente menor vs. el grupo control. El grupo de la dieta DAG+ frijol entero mostró diferencia significativa respecto al resto de los grupos con dietas altas en grasas.

8.5.4. Proteína C reactiva, creatinina y urea

Los resultados de proteína C reactiva, creatinina y urea en suero no se muestran diferencias significativas entre los grupos en ayuno ni en reto metabólico (Figura 26, tabla 20 y 21).

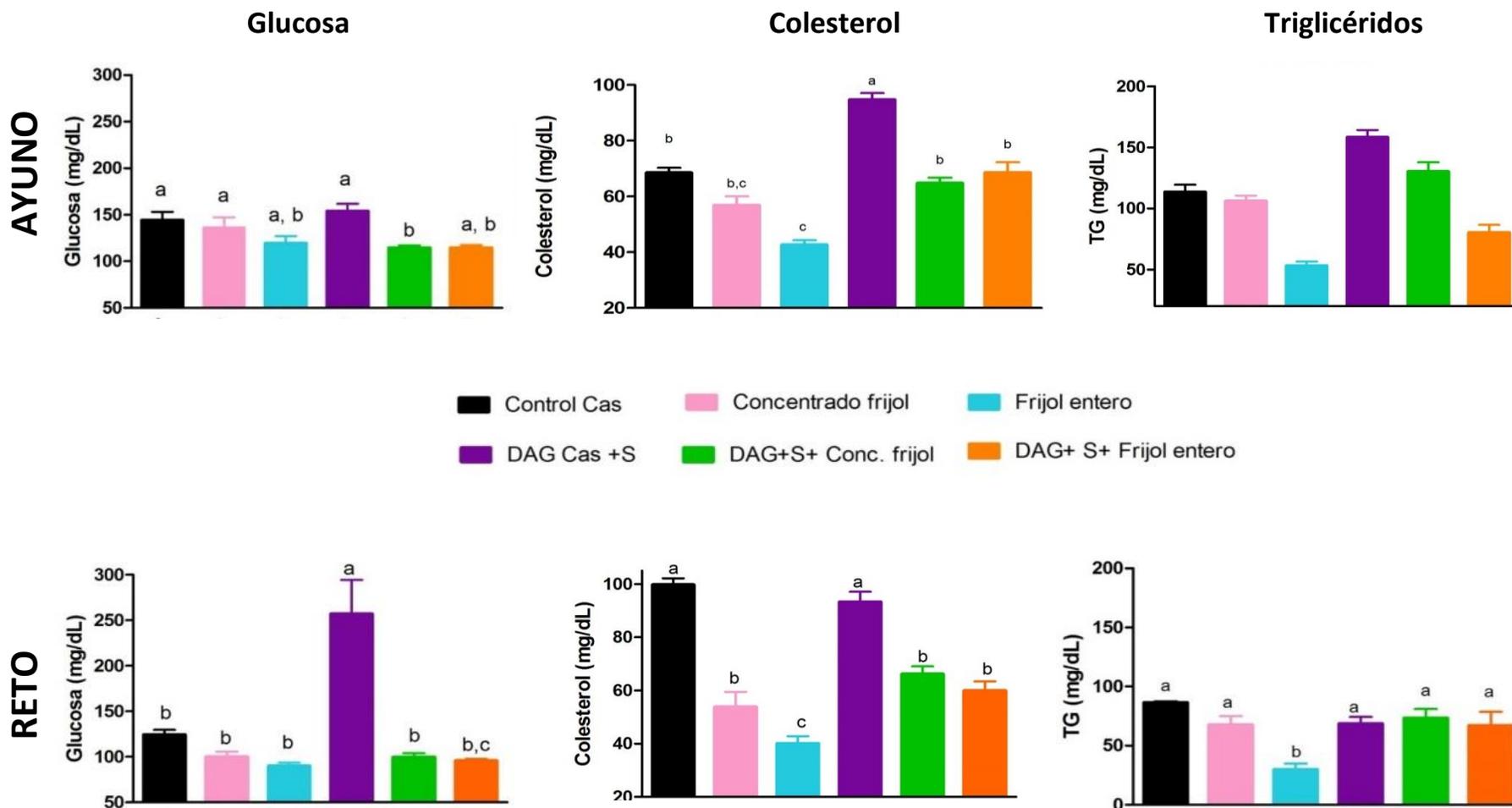


Figura 25.- Glucosa, colesterol y TG en ratas sacrificadas en ayuno y las tratadas con reto metabólico. En la parte superior se muestran los gráficos referentes al ayuno y la parte inferior los referentes al reto metabólico.

Ayuno ANOVA 1 vía: Glucosa $p=0.0033$, Colesterol $p=0.0131$, Triglicéridos $p=0.107$

Reto metabólico ANOVA 1 vía: Glucosa $p<0.0001$, Colesterol $p=0.0055$, Triglicéridos $p=0.0157$

Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM, $p<0.0001$, las letras significan diferencias entre los grupos $a>b>c$. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía ($p<0.05$) y prueba post-hoc de Turkey.

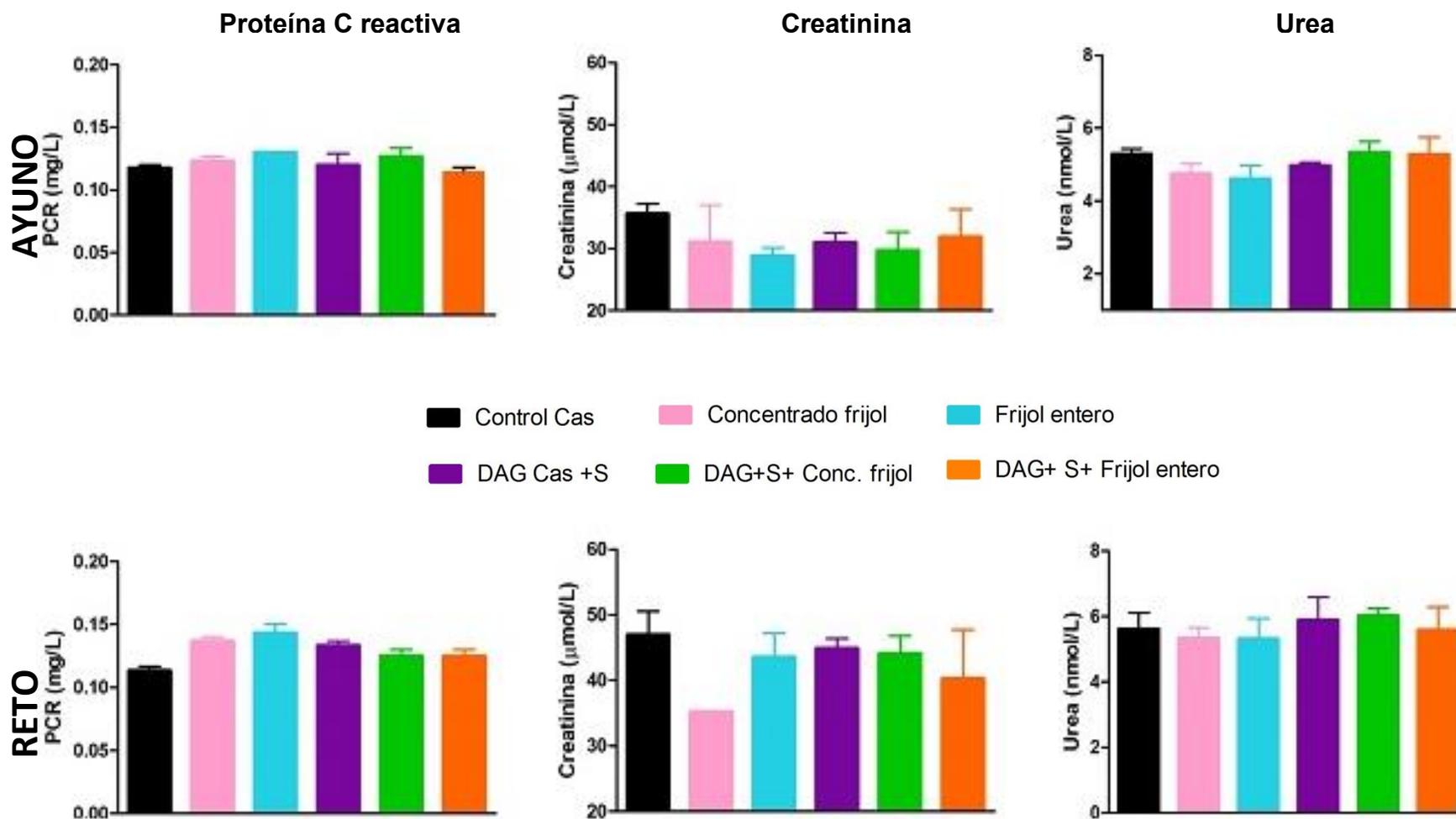


Figura 26.- Proteína C reactiva, creatinina y urea en ratas sacrificadas en ayuno y las tratadas previamente con reto metabólico. En la parte superior se muestran los gráficos referentes al ayuno y la parte inferior los referentes al reto metabólico.

Ayuno ANOVA 1 vía: Proteína C =0.568, creatinina p=0.684, urea p= 0.348

Reto metabólico ANOVA 1 vía: Proteína C =0.568, creatinina p=0.399, urea p= 0.930

Los resultados se expresaron en promedio ± SEM, los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía (p<0.05), no hubo diferencias significativas.



Tabla 20.- Parámetros bioquímicos obtenidos en ratas en ayuno.

Parámetro AYUNO	Control Cas	Concentrado frijol	Frijol entero	DAG Cas + S	DAG+S + Conc. frijol	DAG+S + Frijol entero
Glucosa (mg/dL)	144.1 ± 9.15 ^a	136.1 ± 11.03 ^a	119.2 ± 7.85 ^{a,b}	153.9 ± 7.90 ^a	114.4 ± 2.79 ^b	114.5 ± 3.09 ^{a,b}
Colesterol (mg/dL)	68.53 ± 1.78 ^b	56.81 ± 3.20 ^{b,c}	42.63 ± 1.69 ^c	94.72 ± 2.36 ^a	64.76 ± 2.02 ^b	68.54 ± 3.78 ^b
Triglicéridos (mg/dL)	113.4 ± 6.05	106.1 ± 4.49	53.12 ± 3.45	158.2 ± 5.99	130.2 ± 7.59	80.20 ± 6.30
Proteína C reactiva (mg/L)	0.118 ± 0.003 ^a	0.123 ± 0.003 ^a	0.130 ± 0.0 ^a	0.120 ± 0.009 ^a	0.127 ± 0.007 ^a	0.115 ± 0.002 ^a
Creatinina (mmol/L)	35.63 ± 1.62 ^a	31.07 ± 5.96 ^a	28.80 ± 1.35 ^a	31.0 ± 1.53 ^a	29.70 ± 2.98 ^a	31.93 ± 4.46 ^a
Urea (nmol/L)	5.28 ± 0.15 ^a	4.74 ± 0.27 ^a	4.60 ± 0.37 ^a	4.97 ± 0.08 ^a	5.33 ± 0.29 ^a	5.28 ± 0.47 ^a

Tabla 21.- Parámetros bioquímicos obtenidos en ratas sacrificadas después de reto metabólico.

Parámetro RETO METABÓLICO	Control Cas	Concentrado frijol	Frijol entero	DAG Cas + S	DAG+S + Conc. frijol	DAG+S + Frijol entero
Glucosa (mg/dL)	124.3 ± 5.29 ^b	100.0 ± 5.75 ^b	89.83 ± 3.68 ^b	257 ± 37.50 ^a	99.67 ± 4.36 ^b	95.80 ± 2.05 ^{b,c}
Colesterol (mg/dL)	99.75 ± 2.45 ^a	53.85 ± 5.64 ^b	40.12 ± 2.72 ^c	93.27 ± 3.80 ^a	66.14 ± 2.94 ^b	59.92 ± 3.50 ^b
Triglicéridos (mg/dL)	86.39 ± 1.11 ^a	67.66 ± 7.24 ^a	29.76 ± 5.10 ^b	68.50 ± 5.71 ^a	73.31 ± 7.60 ^a	66.94 ± 11.61 ^a
Proteína C reactiva (mg/L)	0.113 ± 0.003 ^a	0.136 ± 0.003 ^a	0.143 ± 0.007 ^a	0.133 ± 0.003 ^a	0.125 ± 0.005 ^a	0.125 ± 0.005 ^a
Creatinina (mmol/L)	46.95 ± 3.65 ^a	35.25 ± 0.05 ^a	43.55 ± 3.64 ^a	44.90 ± 1.50 ^a	44.10 ± 2.70 ^a	40.25 ± 7.45 ^a
Urea (nmol/L)	5.61 ± 0.51 ^a	5.32 ± 0.34 ^a	5.31 ± 0.63 ^a	5.89 ± 0.71 ^a	6.02 ± 0.24 ^a	5.59 ± 0.69 ^a



8.5.5. Conclusiones parciales

- El modelo de OID, generó alteraciones en las concentraciones de algunos parámetros bioquímicos.
- El consumo de frijol negro y concentrado de proteína de frijol, permiten mantener los niveles de glucosa y colesterol a niveles normales, incluso acompañado a una dieta alta en grasa y/o enfrentarse a un reto metabólico.
- El consumo de frijol negro permitió mantener bajos los valores de glucosa, colesterol y TG, tanto en ayuno y reto metabólico, como con el consumo de una dieta balanceada.

8.6. Determinación de insulina, adiponectina, leptina y LPS.

8.6.1 Determinación de Insulina en suero

En la figura 27, se muestran los resultados de insulina obtenidos tanto en ayuno y reto metabólico.

En ayuno (tabla 22) las dietas control, concentrado y frijol deshidratado no muestran diferencia significativa en los niveles de insulina.

Sin embargo en las dietas altas en grasa: las dietas DAG +S+ Conc. frijol y DAG+S+ frijol entero se muestran diferencias significativas respecto a la dieta DAG Cas+S, en las dietas con frijol, incluyendo las dietas altas en grasa.

Los resultados obtenidos en el reto metabólico (tabla 22), indican que la dieta consumida durante las 10 semanas influye en la respuesta al enfrentarse a un reto de alta concentración de glucosa.

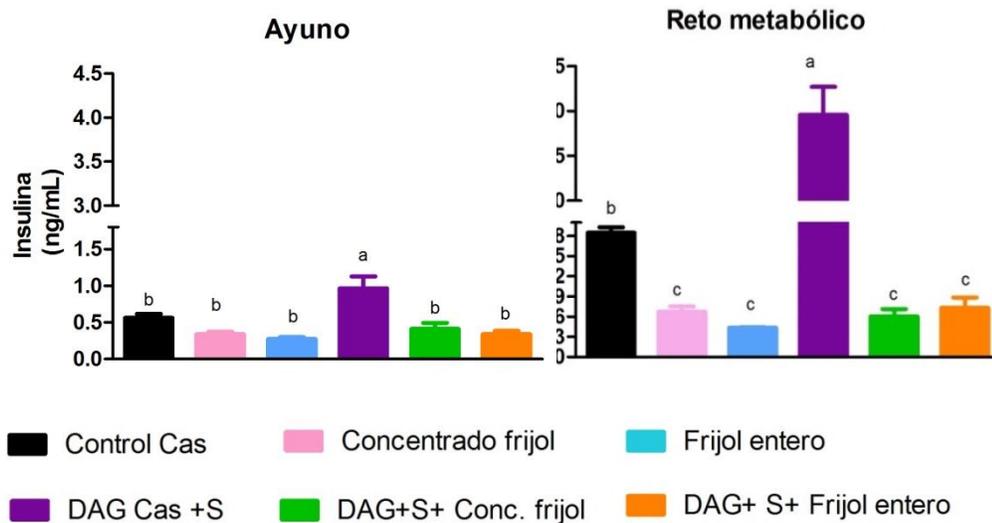


Figura 27.- Niveles de insulina en ayuno y tras enfrentarse al reto metabólico. Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. Ayuno y reto metabólico: $p < 0.0001$, las letras significan diferencias entre los grupos $a > b > c$. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía ($p < 0.05$) y prueba post-hoc de Turkey.

Tabla 22.- Valores de insulina en ayuno y reto metabólico de todos los grupos.

Grupo	INSULINA (ng/mL)	
	AYUNO	RETO METABÓLICO
Control Cas	0.564 \pm 0.056 ^b	1.845 \pm 0.086 ^b
Concentrado frijol	0.339 \pm 0.034 ^b	0.671 \pm 0.081 ^c
Frijol entero	0.275 \pm 0.024 ^b	0.436 \pm 0.009 ^c
DAG Cas + S	0.964 \pm 0.163 ^a	3.958 \pm 0.314 ^a
DAG+S+ Conc. frijol	0.410 \pm 0.084 ^b	0.600 \pm 0.113 ^c
DAG+S+ Frijol entero	0.339 \pm 0.047 ^b	0.728 \pm 0.156 ^c

8.6.2. Determinación del índice HOMA

En la tabla 23 y figura 28, se muestran los valores de índice HOMA obtenidos por todos los grupos experimentales.

Se encontró diferencia significativa del grupo DAG Cas+ S con el resto de los grupos. Mostrando que, a pesar de tener una dieta alta en grasa, si se encuentra suplementada con frijol o concentrado de proteína de frijol, se logra mantener un nivel adecuado de sensibilidad a la insulina. De acuerdo a la literatura, se sugiere que el almidón resistente, fibra, compuestos fenólicos y antocianinas presentes



en el frijol ayudan a conservar la sensibilidad a la insulina. Se ha reportado (Tetsuya, et al., 2011) que antocianinas como la cianidina 3- glucosido presente en el frijol negro mejora la sensibilidad a la insulina, debido a que interfiere en la regulación de la expresión del gen GLUT4. De acuerdo a Belwal et al., el efecto de las antocianinas en la sensibilidad a la insulina se debe al aumento de translocaciones de GLUT-4, la activación de AMPK y enzimas lipolíticas, así como la inhibición de enzimas como FAS y relacionadas con la actividad lipogénica.

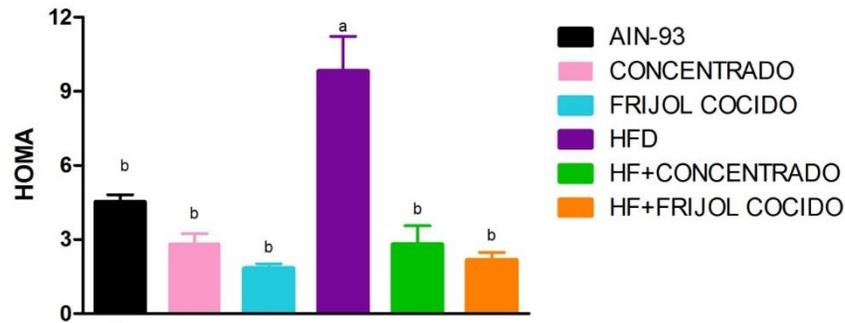


Figura 28.- Índice HOMA

Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. $p < 0.0001$, las letras significan diferencias entre los grupos $a > b$. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía ($p < 0.05$) y prueba post-hoc de Turkey.

Tabla 23.- Valores de índice HOMA

Grupo	HOMA
Control Cas	4.51 \pm 0.30 ^b
Concentrado frijol	2.82 \pm 0.42 ^b
Frijol entero	1.84 \pm 0.19 ^b
DAG Cas +S	9.82 \pm 1.41 ^a
DAG + S + Conc. frijol	2.80 \pm 0.75 ^b
DAG + S + Frijol cocido	2.18 \pm 0.31 ^b



8.6.2. Determinación de leptina y adiponectina

La leptina es una hormona producida por los adipocitos; al haber mayor cantidad de grasa la leptina es liberada al torrente sanguíneo como señal hacia el cerebro, informándole sobre el tamaño del tejido adiposo y actuando como factor de saciedad.

Tanto en el ayuno como en el reto metabólico (figura 29), se mostró una diferencia altamente significativa de la concentración de leptina en los animales que consumieron la dieta DAG Cas +S, en comparación con cualquiera de los otros grupos. Esto era de esperarse dado que estos animales presentaron un mayor porcentaje de grasa corporal. Este mismo grupo de animales sometido al reto metabólico mostró un aumento considerable respecto al ayuno, lo cual sugiere una posible resistencia a la leptina.

Al comparar el grupo DAG Cas +S vs. los grupos DAG+S + Conc. frijol y DAG+S + Frijol entero, se encontró que estos últimos muestran menor concentración de leptina, siendo significativa la diferencia entre los 3 grupos (Fig. 29).

En cuanto a la adiponectina, no se mostró diferencia significativa en el ayuno. Sin embargo en los grupos sometidos al reto metabólico se observó que los grupos con menor peso corporal presentaron mayor concentración de adiponectina en suero (DAG+S+ Conc. frijol y DAG+S+ frijol entero).

Los valores de adiponectina y leptina presentados por los grupos DAG+S+ Conc. frijol y DAG+S+ frijol entero están relacionados, además de con el peso corporal, con la sensibilidad a la insulina, tolerancia a la glucosa (CTGO) y TG en sangre.

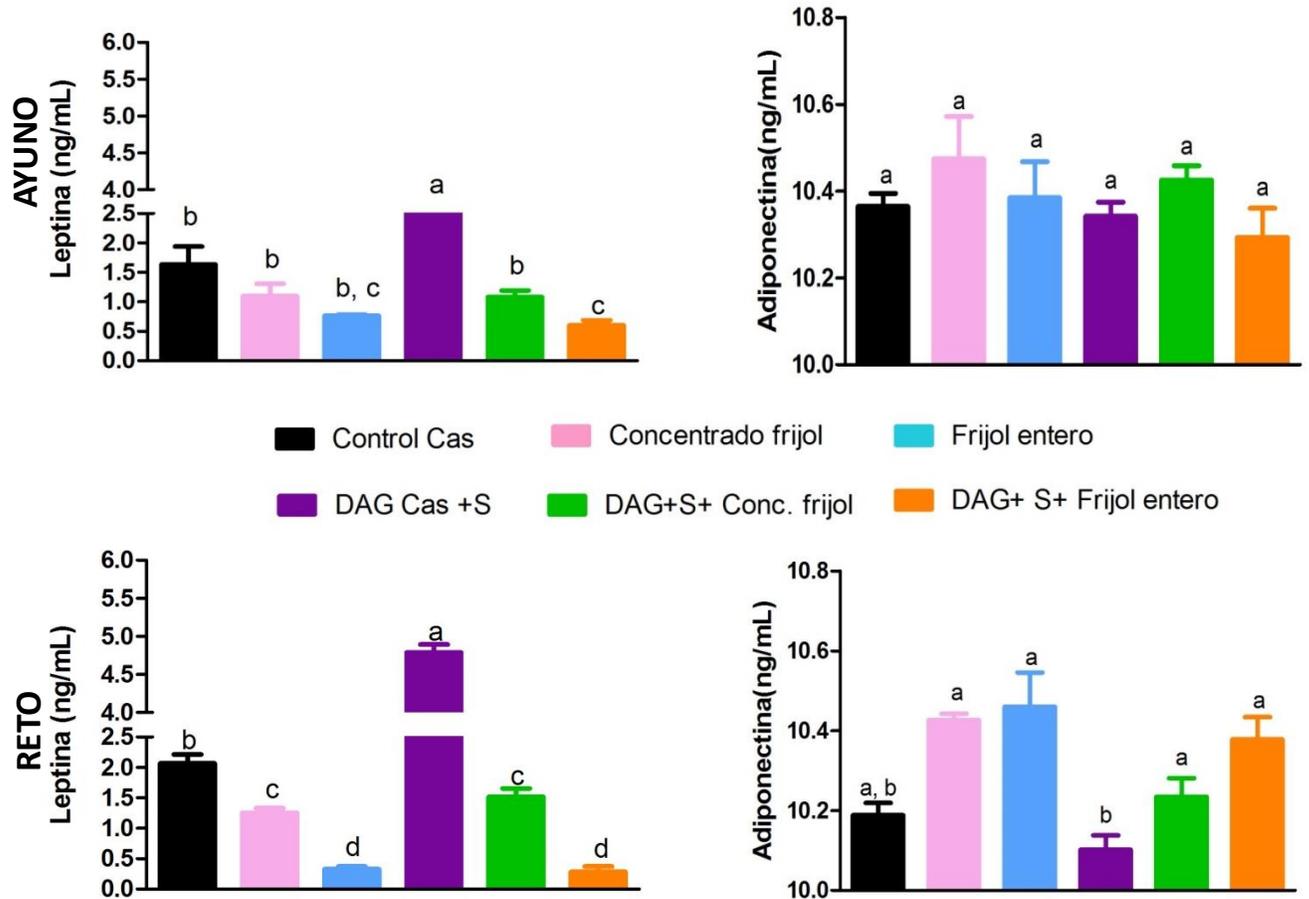


Figura 29.- Gráfico de leptina y adiponectina obtenidos en ayuno y tras un reto metabólico. Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM.

Leptina Ayuno y reto metabólico: $p < 0.0001$, adiponectina Ayuno: $p = 0.5719$, adiponectina reto metabólico: $p = 0.0002$ Las letras significan diferencias entre los grupos $a > b > c > d$. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía ($p < 0.05$) y prueba post-hoc de Turkey.



Tabla 24.- Valores de leptina y adiponectina en ayuno y reto metabólico.

Grupo	LEPTINA (ng/mL)		ADIPONECTINA (ng/mL)	
	AYUNO	RETO METABÓLICO	AYUNO	RETO METABÓLICO
Control Cas	1.634 ± 0.305 ^b	2.065 ± 0.150 ^b	10.36 ± 0.030 ^a	10.19 ± 0.031 ^{a,b}
Concentrado frijol	1.097 ± 0.210 ^b	1.256 ± 0.074 ^c	10.47 ± 0.098 ^a	10.43 ± 0.016 ^a
Frijol entero	0.765 ± 0.018 ^{b,c}	0.328 ± 0.042 ^d	10.38 ± 0.084 ^a	10.46 ± 0.086 ^a
DAG Cas +S	2.562 ± 0.110 ^a	4.788 ± 0.104 ^a	10.34 ± 0.033 ^a	10.10 ± 0.036 ^b
DAG + S + Conc. frijol	1.085 ± 0.106 ^b	1.517 ± 0.137 ^c	10.43 ± 0.033 ^a	10.23 ± 0.047 ^a
DAG + S + Frijol entero	0.600 ± 0.085 ^c	0.283 ± 0.090 ^d	10.29 ± 0.067 ^a	10.38 ± 0.056 ^a

8.6.3. Determinación de Lipopolisacárido (LPS)

Se ha reportado que la concentración de LPS se ve aumentada al consumir dietas con alto contenido de grasa. En ayuno (figura 30 y tabla 25), se observó diferencia significativa entre los valores obtenidos por el grupo de la dieta control Cas y la dieta DAG Cas +S; el aumento en la concentración de LPS en ayuno sugiere endotoxemia metabólica, la cual provoca un estado pro-inflamatorio relacionado con aumento de la resistencia a la insulina, diabetes y obesidad.

Respecto a los grupos que consumieron DAG, se observó que las dietas DAG+S+ Conc. frijol y DAG+S+ frijol entero mantienen el contenido de LPS a valores muy similares a las dietas control, evitando así la endotoxemia y las consecuencias metabólicas relacionadas.

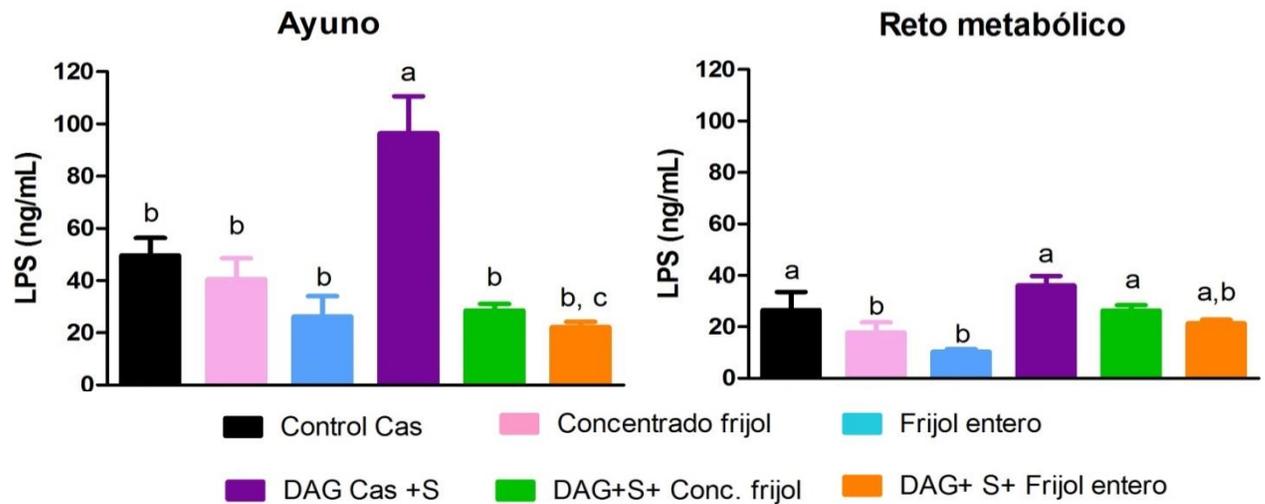


Figura 30.- Gráfico de LPS obtenidos en grupos en ayuno y en reto metabólico. Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. LPS ayuno: $p < 0.0001$, LPS reto metabólico: $p = 0.0041$, Las letras significan diferencias entre los grupos $a > b > c$. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía ($p < 0.05$) y prueba post-hoc de Turkey.

Tabla 25.- Valores de LPS en suero de todos los grupos experimentales.

Grupo	Lipopolisacárido (ng/mL)	
	AYUNO	RETO METABÓLICO
Control Cas	49.64 \pm 6.705 ^b	26.50 \pm 7.091 ^a
Concentrado frijol	40.55 \pm 7.978 ^b	17.81 \pm 3.923 ^b
Frijol entero	26.25 \pm 7.756 ^b	10.36 \pm 1.020 ^b
DAG Cas +S	96.46 \pm 14.13 ^a	36.03 \pm 3.739 ^a
DAG + S + Conc. frijol	28.52 \pm 2.574 ^b	26.40 \pm 2.017 ^a
DAG + S + Frijol entero	22.17 \pm 2.109 ^{b,c}	21.32 \pm 1.433 ^{a,b}

8.6.4. Conclusiones parciales

- El grupo DAG Cas+ S sometido al reto metabólico mostró un aumento considerable de la concentración de leptina respecto a los niveles de ayuno, lo cual sugiere una posible resistencia a esta hormona.

- Una dieta acompañada de frijol entero o concentrado de proteína de frijol permiten tener valores más bajos de leptina, a pesar de tener un contenido alto en grasa o un reto metabólico, sugiriendo así una mejora en la sensibilidad a la leptina.
- Una dieta acompañada de frijol entero o concentrado de proteína de frijol permiten tener valores más altos de adiponectina, a pesar de consumir una dieta alta en grasa o someterse a un reto metabólico.
- El grupo con DAG Cas +S presentó niveles altos de LPS en ayuno, sugiriendo así un estado de endotoxemia metabólica.
- El consumo de frijol y concentrado de frijol en la dieta permite tener menores concentraciones de LPS en suero, previniendo así la aparición de un estado de endotoxemia metabólica y su consecuente estado pro inflamatorio.

8.7. Extracción de RNA a partir de hígado

Se obtuvieron muestras de RNA de buena calidad, respecto a los valores de relación de 260/280. (Los datos se muestran en el anexo VII, Tabla 27). Además se muestra el espectro de absorción (Figura 31). Se verificó la integridad del RNA de toda las muestras mediante un gel de electroforesis capilar (Qiaxcel, Qiagen) (Figura 32).

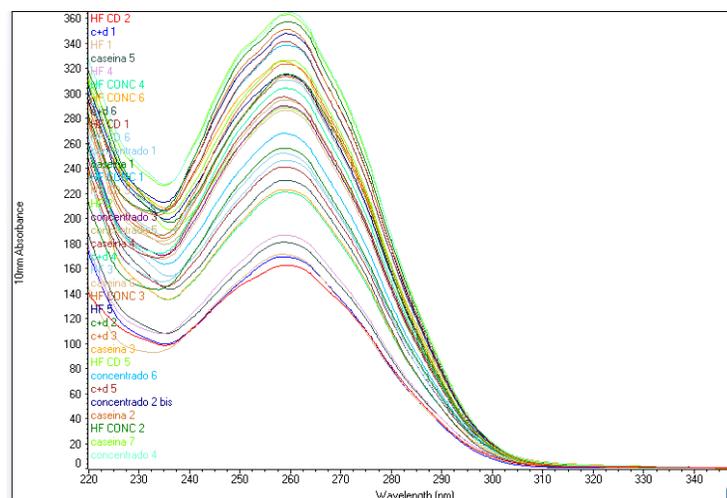


Figura 31.- Espectro de absorción de las muestras de RNA

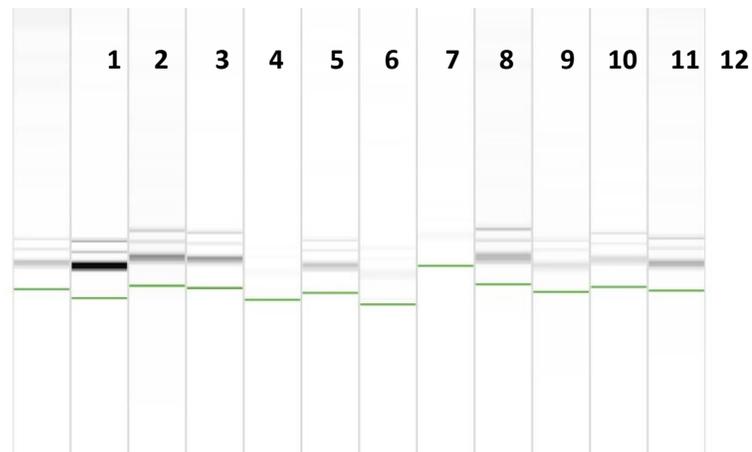


Figura 32.- Gel de electroforesis capilar (equipo Qiaxcel, Qiagen) para las muestras de RNA de hígado. Muestras de izquierda a derecha: 1: muestra control Cas 1, 2: concentrado frijol 2, 3: frijol entero 5, 4: DAG Cas+S 5, 5: vacío, 6: DAG+S + frijol entero 1, 7: DAG+S + frijol entero 2, 8: DAG Cas +S 7, 9: DAG+S+ Frijol entero 3, 10: Frijol entero 6, 11: DAG+S+ Conc. frijol 1 y 12: control Cas 4.

8.8. Rangos dinámicos para ciclofilina, HPRT, FAS y SREBP1

Se sintetizó el cDNA a partir de las muestras de RNA de hígado, posteriormente se realizaron rangos dinámicos por qPCR. En las figuras 33 y 34 se muestran las curvas y eficiencia de amplificación. La eficiencia de amplificación para los genes evaluados es \approx 100%, de acuerdo a los resultados obtenidos se eligió la concentración de 31.25 ng/ μ L para evaluar la expresión de genes en todas las muestras. En las figuras 33 y 34 se muestran las curvas de disociación, en todas se muestra solamente un pico lo cual indica que se obtuvo un solo producto de amplificación (producto esperado en cada reacción).

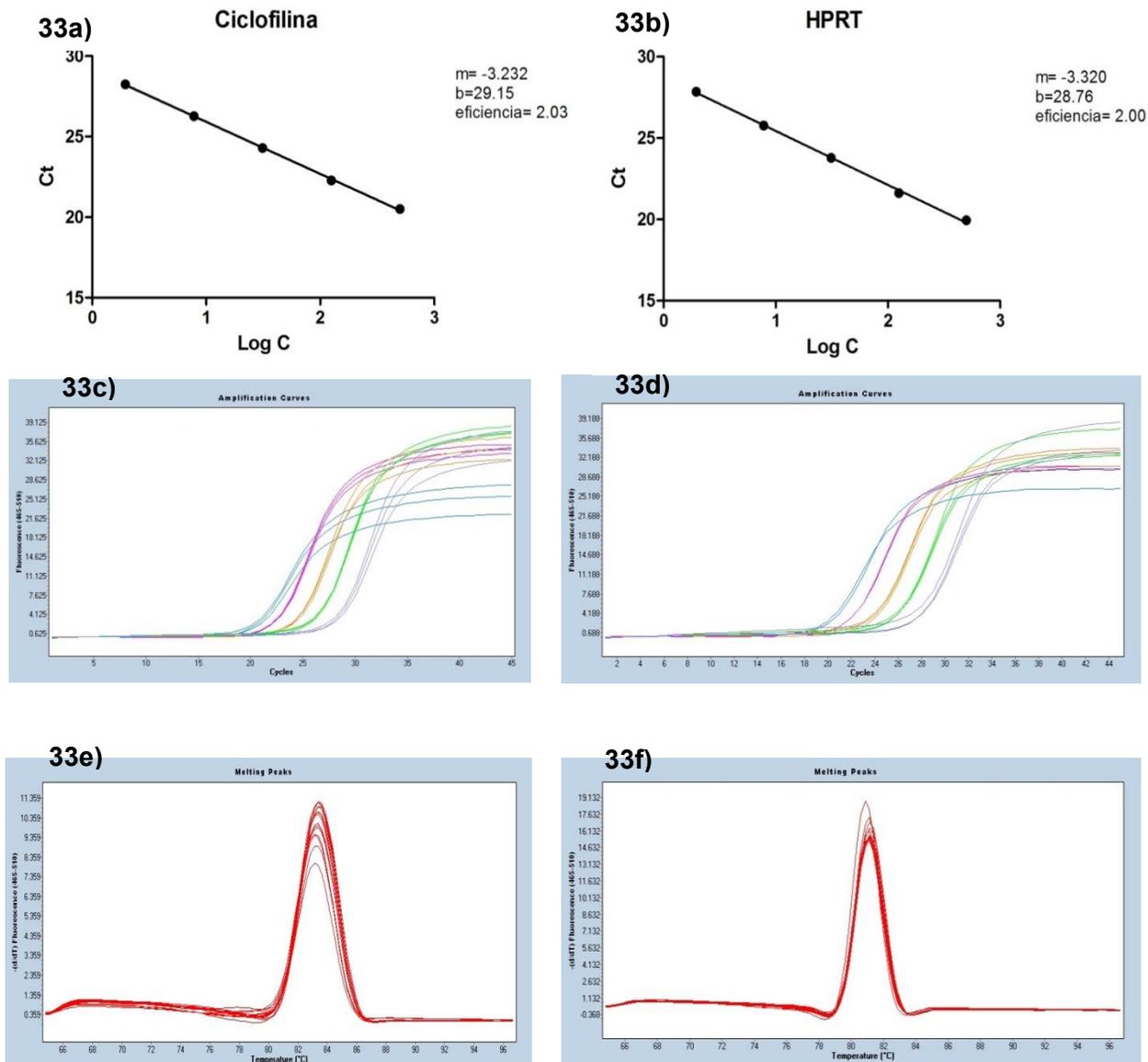
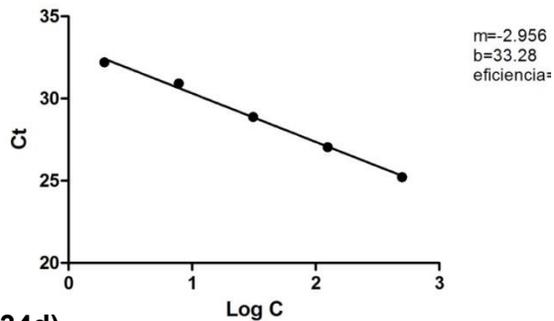


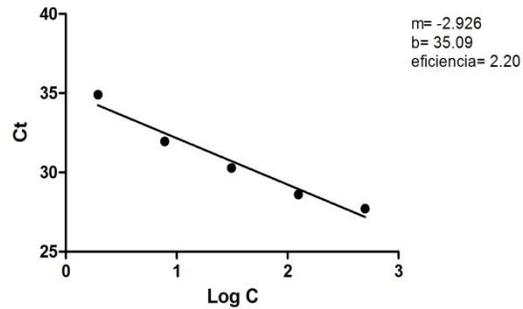
Figura 33.- Rangos dinámicos y curva de disociación de cebadores para HPRT y ciclofilina.

33a. Rangos dinámicos para ciclofilina. 33b. Rangos dinámicos para HPRT. 33c. Gráfico de amplificación de ciclofilina. 33d. Gráfico de amplificación de HPRT. 33e. Curva de disociación para ciclofilina. 33f. Curva de disociación para HPRT.

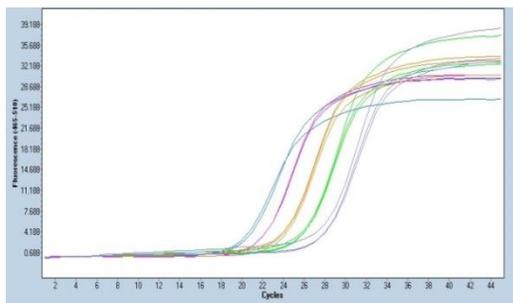
34b) Rangos dinámicos SREBP-1



34c) Rangos dinámicos FAS



34d)



34e)

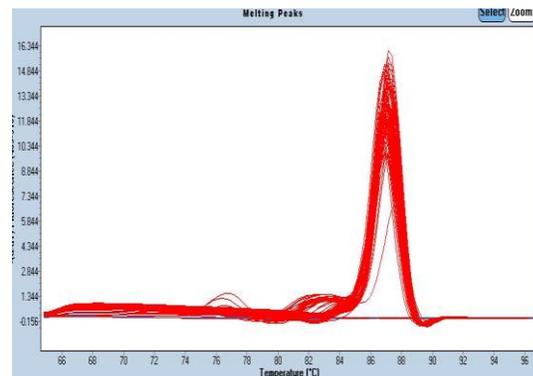
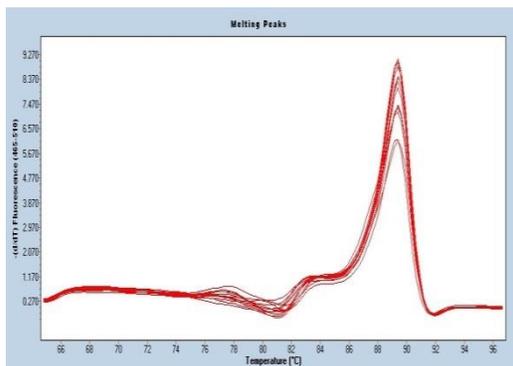
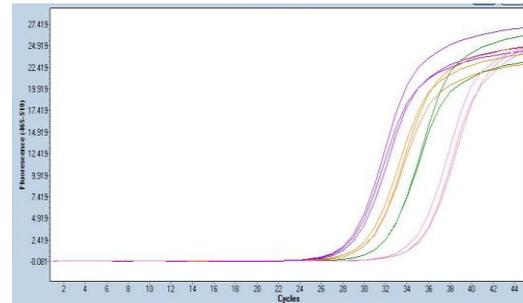


Figura 34.- Rangos dinámicos y curva de disociación de cebadores para SREBP1 y FAS. 34a. Rangos dinámicos para SREBP1. 34b. Rangos dinámicos para FAS. 34c. Gráfico de amplificación de SREBP1. 34d. Gráfico de amplificación de FAS. 34e. Curva de disociación para SREBP1. 34f. Curva de disociación para FAS.

8.9. Expresión relativa de SREBP1 y FAS

Se evaluó la expresión relativa de estos genes relacionados con la lipogénesis.

En los grupos de las dietas control durante el ayuno no existe diferencia significativa en la expresión de FAS. Sin embargo todos los grupos son significativamente diferentes respecto



al grupo con DAG Cas+ S, esto significa que el consumo de concentrado de proteína de frijol y frijol entero es capaz de contrarrestar el efecto de una dieta alta en grasa sobre la expresión de FAS y consecuentemente sobre la lipogénesis. Los resultados de expresión de FAS durante el reto metabólico solo existe diferencia significativa entre el grupo control vs. el resto de los grupos, esto posiblemente debido a que el tiempo transcurrido (30 min) después del reto metabólico no es suficiente para que sea detectable el efecto en la transcripción de mRNA. Los resultados obtenidos en ayuno muestran entonces el estado metabólico puntual. En cuanto al ayuno, la expresión de SREBP1 en el grupo que consumió la dieta con concentrado de frijol es significativamente menor respecto a la dieta control y la dieta de frijol entero. En los grupos que consumieron dietas altas en grasa, la expresión de SREBP1 muestra diferencias significativas entre el grupo DAG Cas+S y los grupos DAG+S+ Conc. frijol, y DAG + frijol entero, siendo menor la expresión en el grupo DAG+S+ Conc. frijol. La diferencia significativa de los grupos DAG suplementados con alguna fuente de frijol vs. el grupo control DAG significa que principalmente el concentrado de proteína de frijol logra contrarrestar el efecto en lipogénesis de una dieta alta en grasa.

En cuanto a los resultados de expresión de SREBP1 en reto metabólico, solo se encontró diferencia significativa entre el grupo control vs. el resto de los grupos. No se mostró diferencia alguna dentro de los grupos DAG.

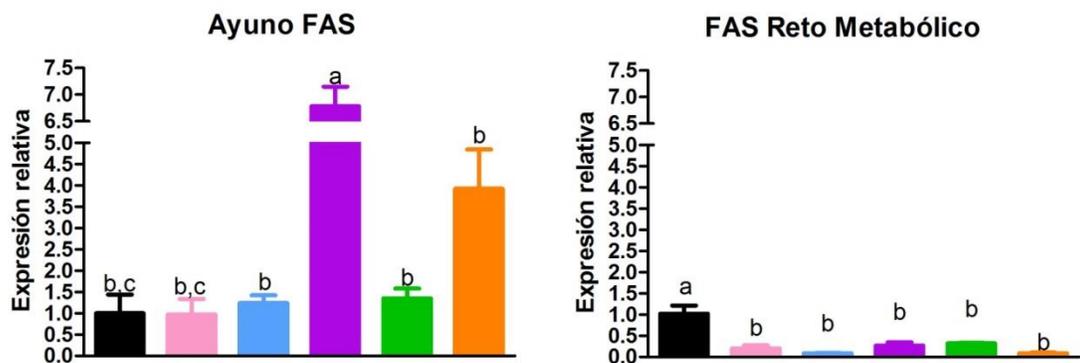
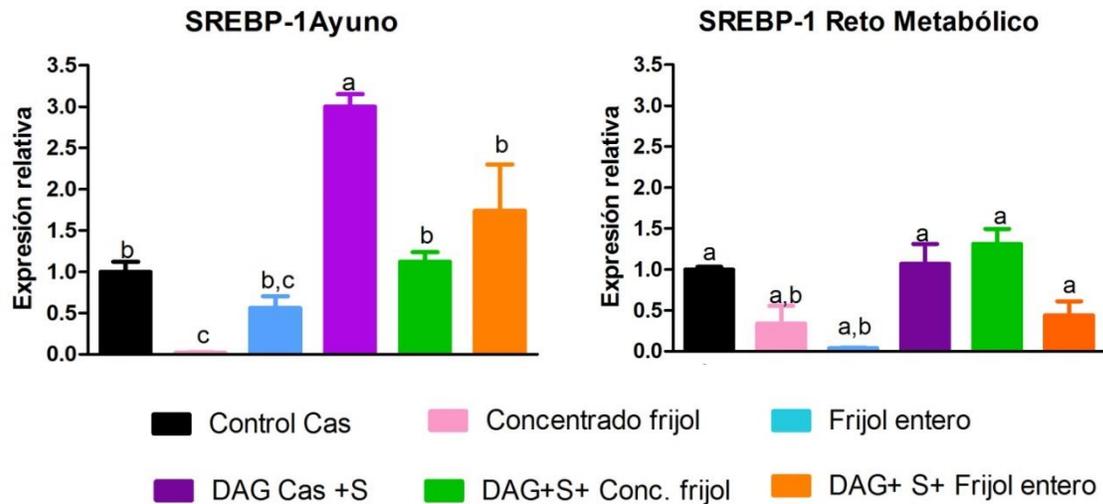


Figura 35.- Expresión relativa de SREBP1 y FAS. Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. SREBP Ayuno: $p < 0.0001$, SREBP reto: $p = 0.0022$, FAS Ayuno: $p = 0.0002$, SREBP reto: $p = 0.0006$. Las letras significan diferencias entre los grupos $a > b > c$. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía ($p < 0.05$) y prueba post-hoc de Turkey.

8.10. Conclusiones parciales

- Los grupos con DAG+S+ Conc. frijol y DAG+S+ frijol entero (ayuno) disminuyeron la expresión de SREBP1 y FAS respecto al grupo control DAG+S.
- En ayuno: el consumo de concentrado y frijol deshidratado disminuyó la lipogénesis mediada por SREBP1, tanto en dietas control y altas en grasa.
- El consumo de concentrado y frijol deshidratado disminuyó la lipogénesis mediada por FAS en dietas altas en grasa.

8.11. Caracterización de las poblaciones microbianas en el intestino de ratas experimentales

8.11.1. Calidad y cuantificación de ADN a partir de heces

En la tabla 26, se muestra la concentración de ADN de las muestras leídas en un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) y el Qubit (Thermo Fisher, USA). La figura 36 corresponde al espectro de absorción obtenido en el Nanodrop. Todas las muestras de ADN obtenidas son de buena calidad, y se obtuvieron en concentraciones aceptables.

Para el análisis de microbiota por qPCR, se consideraron las concentraciones obtenidas en el Qubit, debido a que es una medición fluorimétrica la cual permite diferenciar entre dsDNA o RNA, y con mayor sensibilidad de cuantificación. La determinación espectrofotométrica (Nanodrop) por absorbancia a 260 nm es incapaz de distinguir entre DNA, dsDNA, RNA o nucleótidos libres, dando generalmente una sobreestimación de la cantidad de muestra. Se verificó la integridad del ADN realizando un gel de electroforesis capilar Qiaxcel (Qiagen) (Figura 37).

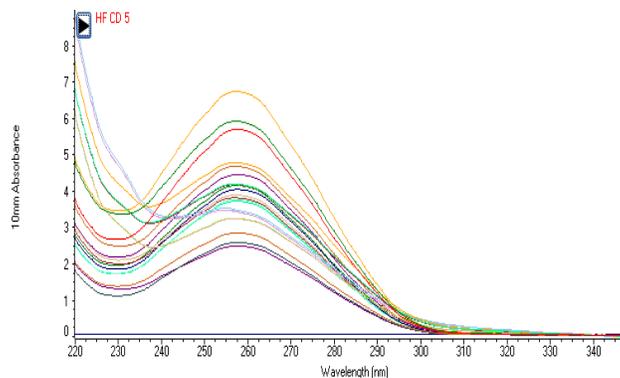


Figura 36.- Espectro de absorción de las muestras de ADN.

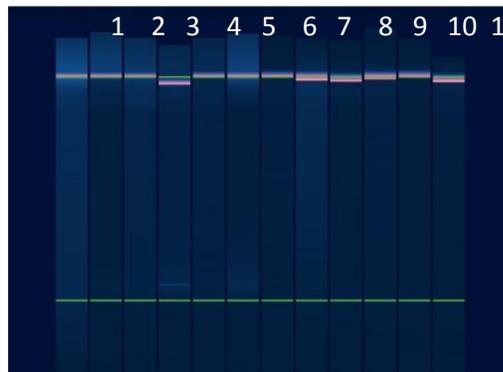


Figura 37.- Gel de electroforesis capilar para muestras de ADN (Qiaxcel, Qiagen). Muestras de izquierda a derecha, 1: muestra control Cas 1, 2: control Cas 2, 3: concentrado de frijol 2, 4: concentrado de frijol 4, 5: frijol entero 3, 6: frijol entero 5, 7: DAG Cas+S 2, 8: DAG Cas+S 5, 9: DAG+S+ Conc. frijol 1, 10: DAG+S+ Conc. frijol 2, 11: DAG+S + frijol entero 1, 12: DAG+S+ Frijol entero 3.



Tabla 26.- Concentraciones obtenidas de las muestras de ADN.

Muestra	Nanodrop 2000		Qubit
	Concentración (ng/μl)	260/280	Concentración (ng/μl)
Control Cas 1	96.9	2.08	28.65
Control Cas 2	142.6	2.02	44.05
Control Cas 3	104.3	2.03	38.3
Control Cas 4	132	2.09	42.9
Control Cas 5	79.8	2.08	30.5
Control Cas 6	221.9	2.06	57.5
Control Cas 7	147.8	2.05	43.5
Concentrado frijol 1	290	2.11	57
Concentrado frijol 2	53.8	1.97	39.5
Concentrado frijol 3	176.1	2.02	74.7
Concentrado frijol 4	261	2.09	58.5
Concentrado frijol 5	335.8	1.98	90.6
Concentrado frijol 6	261.6	2.07	60
Frijol entero 1	318.9	2.03	92.7
Frijol entero 2	529.7	2.03	111
Frijol entero 3	457.4	2.02	105
Frijol entero 4	271.8	2	90.4
Frijol entero 5	457.6	2.05	106
Frijol entero 6	292.2	2.08	90.1
DAG Cas +S 1	139.6	1.96	41.65
DAG Cas +S 2	235.5	2.08	58.5
DAG Cas +S 3	126.6	2.12	40.25
DAG Cas +S 4	159	2.06	45.3
DAG Cas +S 5	136.2	2.03	36.8
DAG Cas +S 6	199.4	2.09	50.5
DAG Cas +S 7	121.7	2.06	37.3
DAG + S + Conc. frijol 1	185.5	2.09	52
DAG + S + Conc. frijol 2	219.9	2.08	56.5
DAG + S + Conc. frijol 3	205.1	1.9	56
DAG + S + Conc. frijol 4	204.4	2.09	49.85
DAG + S + Conc. frijol 6	230.2	2.05	52.5
DAG+S+ Frijol entero 1	183.1	2.09	42.95
DAG+S+ Frijol entero 2	333.1	2.05	59.7
DAG+S+ Frijol entero 3	187.4	2.07	46.75
DAG+S+ Frijol entero 5	281.2	2.09	55.5
DAG+S+ Frijol entero 6	191.2	2.08	50.1



8.11.2. Caracterización por qPCR

Se determinó la abundancia relativa de las diferentes *phyla* y algunos microorganismos de interés mediante el método de Paffal y metodología de qPCR usando la técnica de Sybr Green. De acuerdo a los valores de abundancia relativa, se observó una disbiosis en el grupo obeso (grupo DAG Cas+ S), ya que mostró menor abundancia de *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia*, y mayor abundancia de *Firmicutes* respecto al grupo control; lo anterior concuerda con lo ya reportado en la literatura (Guo et al., 2008).

En los grupos de concentrado y frijol entero, y sus respectivos grupos DAG, la abundancia de *Bacteroidetes* que presentaron es menor respecto al grupo Control Cas (caseína).

La abundancia de *Firmicutes* de los grupos DAG+S+ Conc. frijol y DAG+S+ Frijol entero, es significativamente menor que la obtenida por el grupo DAG Cas +S. Esta menor proporción de *Firmicutes* está relacionada con la menor ganancia de peso en los grupos de DAG suplementados con concentrado y/o frijol entero, a pesar del consumo de una dieta alta en grasa y con sacarosa en agua de bebida, y tener un consumo calórico de alimento similar.

La abundancia relativa de *Actinobacteria*, es significativamente menor la de los grupos con dieta de frijol entero y DAG+S+ Conc. frijol.

La mayor abundancia relativa de *Verrucomicrobia* se encontró en los grupos con dieta de frijol entero y DAG+S+ Conc. frijol, mientras que en el grupo DAG Cas +S se encontró menor abundancia de este phylum.

El aumento de abundancia de *Prevotella spp.* de acuerdo a la literatura (Shin et al., 2014) se ha relacionado con la obesidad, en el grupo DAG Cas +S se observó un aumento significativo respecto al control. Los grupos DAG+S + Conc. frijol y DAG+S + Frijol entero no mostraron diferencias significativas vs. los grupos control de concentrado de proteína de frijol y de frijol entero, lo cual concuerda con el estado metabólico presentado por ambos grupos.

La abundancia relativa de *Akkermansia spp.* es significativamente diferente en todos los grupos experimentales, siendo en todos los grupos menor la abundancia respecto al grupo control Cas.

La abundancia de *Bifidobacterium spp.* es diferente significativamente entre el grupo control Cas y los grupos con DAG Cas+ S. Se obtuvo menor abundancia al consumir una dieta alta en grasa lo cual era de esperarse de acuerdo a reportes previos (Nava et al., 2012; Zhang et al., 2010). Sin embargo el grupo de concentrado de frijol mostró menor abundancia

respecto al control y la dieta de frijol entero. Los grupos con DAG + concentrado de proteína de frijol y frijol entero, a pesar de que su tipo de fibra dietética pudiera diferir por contener una cierta proporción de AR, presentaron una abundancia relativa similar de bifidobacterias al grupo DAG Cas+S.

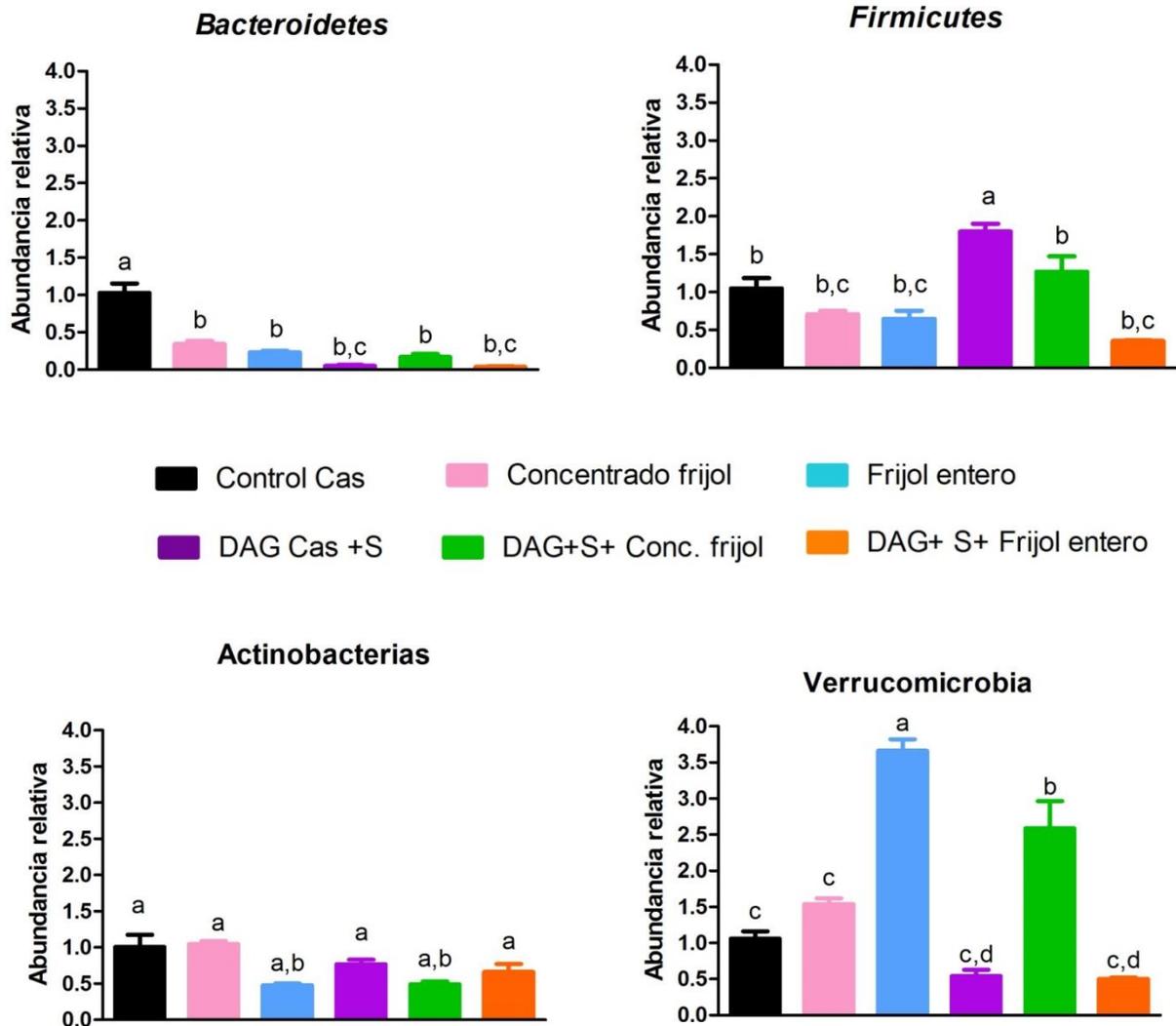


Figura 38.- Abundancia relativa de las diferentes *Phyla*.

Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. Bacteroidetes, Firmicutes y Verrucomicrobia : $p < 0.0001$, Actinobacterias: $p = 0.0003$ Las letras significan diferencias entre los grupos $a > b > c$. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía ($p < 0.05$) y prueba post-hoc de Turkey.

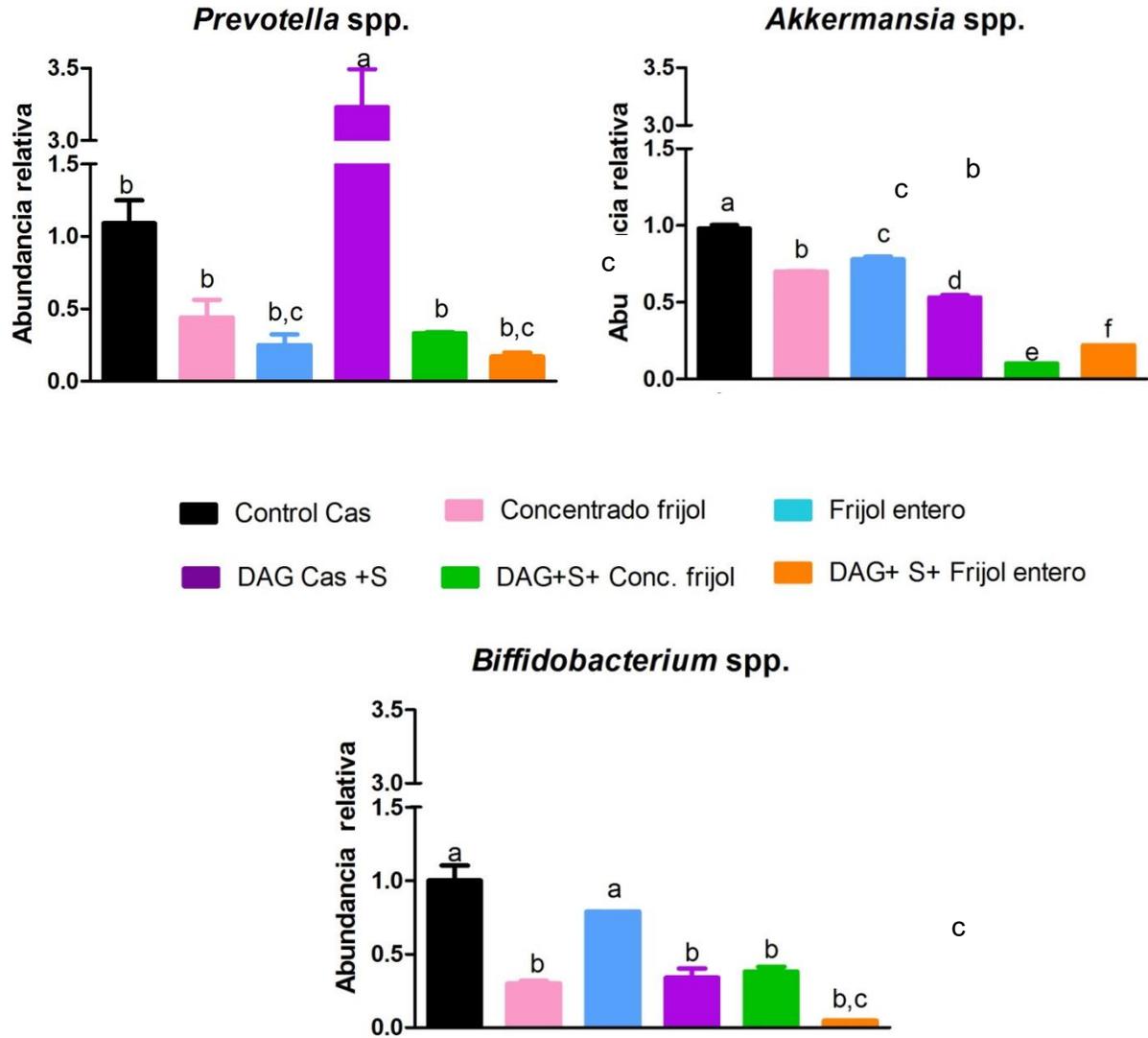


Figura 39.- Abundancia relativa de *Prevotella spp.*, *Akkermansia spp.* y *Bifidobacterium spp.* Los resultados se expresaron en promedio \pm SEM. $p < 0.0001$, Las letras significan diferencias entre los grupos $a > b > c$. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía ($p < 0.05$) y prueba post-hoc de Turkey.

8.11.3. Conclusiones parciales

- La disbiosis en el grupo obeso (DAG Cas + S) se demuestra por una menor abundancia de *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia*, y una mayor abundancia de *Firmicutes* respecto al grupo control.
- Las dietas de concentrado de proteína de frijol y frijol entero modificaron la abundancia relativa de *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacterias* y *Verrucomicrobia*.



9. DISCUSIÓN FINAL

Se presentaron diferencias significativas entre el grupo con dieta Control Cas y el grupo DAG Cas + S, en: ganancia de peso, composición corporal, flexibilidad metabólica, parámetros bioquímicos en suero, curva de tolerancia a la glucosa, insulina, leptina, adiponectina, genes relacionados en lipogénesis y abundancia relativa de la microbiota. Estas diferencias muestran los cambios en el estado metabólico generados por un modelo de obesidad inducido por dieta, acompañados de ganancia de grasa, pérdida de músculo, aumento de LPS, resistencia a la insulina y leptina.

La obesidad promueve la activación de distintas respuestas celulares entre las que se incluyen el estrés oxidativo, el estrés de retículo endoplasmático y la inflamación (Olefsky et al., 2010), además de contribuir al desarrollo de diabetes y resistencia a la insulina. Se ha reportado que el consumo de una dieta alta en grasa promueve un cambio en la microbiota intestinal, a su vez aumenta la permeabilidad intestinal y absorción de LPS, lo cual se relaciona con un incremento y aparición de endotoxemia metabólica, consecuente inflamación y la aparición de desórdenes metabólicos como los presentados por el grupo DAG Cas+S. Además se presentó resistencia a la leptina, por lo que se ve afectada la regulación del apetito, del metabolismo basal de lípidos y glúcidos.

El aumento, en el ayuno, de la expresión de SREBP en el grupo DAG Cas+S, es debido a que SREBP es regulado por la concentración de insulina en sangre. Además se observó un aumento de lipogénesis, regulado por la mayor expresión de FAS.

En este estudio, el consumo de frijol negro y concentrado de proteína de frijol, permitieron mantener los niveles de glucosa e insulina a niveles normales en los animales alimentados. Además al acompañar una DAG con proteínas de frijol o frijol entero cocido, permitieron contrarrestar los efectos adversos. En cuanto a la ganancia de peso, porcentaje de grasa y pérdida del porcentaje de masa magra final en los grupos DAG+S+ Conc. frijol y DAG+S+ Frijol entero resultaron menores en comparación con el grupo DAG Cas + S, e incluso igual a los obtenidos por los grupos con dieta balanceada (concentrado de proteína de frijol y dieta con frijol entero). Esto puede ser debido a la proporción de almidón resistente presente en el frijol, el cual se ha reportado (Darzi, et al. 2011; Tapsell, 2004) que ayuda a contrarrestar los mecanismos de hiperlipidemia mediante la disminución de la absorción de grasas, su utilización y la sensación de saciedad mediante la unión de los ácidos biliares;



además del efecto hipolipidémico de las saponinas y fitoesteroles (Ramírez et al., 2015; Champ., 2002; Campos-Vega et al., 2009).

Los valores de RER y VO_2 obtenidos por los grupos DAG+S + Conc. frijol y DAG+S + Frijol entero presentaron un uso de sustrato mixto, por lo que en esta condición aún no se presenta inflexibilidad metabólica. Además, el frijol entero con DAG logró mantener en mayor proporción la eficiencia de O_2 consumido y la capacidad oxidativa de la mitocondria para la obtención de energía.

En diversos estudios se ha reportado la presencia de antocianinas en el frijol negro, en el grano entero se ha encontrado una concentración de 213 mg/ 100 g frijol y en la testa 2.37 g/ 100 g frijol. El contenido de antocianinas varía de acuerdo con las condiciones de cultivo y localidad de siembra, pero el perfil de antocianinas se conserva: delfinidina 3-glucósido, petunidina 3-glucósido y malvidina 3-glucósido (Yoshida et al., 1996). En el presente estudio no se realizó cuantificación de antocianinas, sin embargo es importante aclarar que su contenido en el concentrado de proteína de frijol es inferior al presente en el frijol entero (Salinas, 2014) esto debido a que durante el proceso de extracción de proteínas se pierden o solubilizan compuestos fenólicos de la testa y del grano entero molido (Salinas, 2014). La mayor proporción de antocianinas, fibra dietaria y almidón resistente en el frijol entero podrían estar altamente relacionados con el aumento de la sensibilidad a la insulina, tolerancia a la glucosa y la disminución de la inflamación lo cual se ve reflejado en la capacidad oxidativa (RER y VO_2) presentada por la DAG acompañada de frijol entero, en comparación con el grupo DAG+S+ Conc. frijol.

La proporción de fibra dietaria y almidón resistente presente en el frijol entero y el concentrado, fue un modulador de la diferencia en la abundancia relativa de las phyla en la microbiota intestinal comparadas con el resto de los grupos evaluados. Campos-Vega et al., reportaron como resultados de su estudio *in vitro* que el frijol común es una excelente fuente de polisacáridos los cuales pueden ser fermentados en el colon y producir SCFAs, encontrando que el acetato es el más abundante producido a partir de las variedades que evaluaron. La absorción del acetato genera una menor respuesta glicémica, esto debido a que mejora la sensibilidad a la insulina (Guarner et al., 2003).

El estado metabólico, ganancia de peso y parámetros bioquímicos observados en los grupos DAG+S + Conc. frijol y DAG+S + Frijol entero, también pueden deberse a la capacidad de las antocianidinas de inhibir la actividad de α -amilasa, maltasa y sacarasa, lo cual causa disminución de glucosa postprandial (Williamson., 2013).



El consumo de frijol y concentrado de frijol en la dieta permite tener menores concentraciones de LPS en suero, previniendo así la aparición de un estado de endotoxemia metabólica, su consecuente estado pro inflamatorio y la aparición de enfermedades metabólicas.

Los resultados, obtenidos en el reto metabólico ensayado, muestran la importancia de consumir una dieta nutritiva y balanceada, ya que a pesar de que en algunos parámetros no se ven cambios de inmediato, sí influye en la capacidad y estado metabólico, con la posibilidad de acarrear problemas metabólicos futuros. De acuerdo a los resultados obtenidos, el consumo de concentrado de proteína de frijol y/o de frijol entero permite mantener un buen estado metabólico, permite contrarrestar los efectos de una dieta alta en grasa, incluso al enfrentarse a un reto metabólico.

En diversos estudios se han investigado las características y compuestos bioactivos del frijol, sin embargo, esta investigación es la primera en realizar un estudio in vivo del frijol en un modelo de obesidad inducida por dieta en ratas.

10. CONCLUSIONES

- Se generó un modelo de OID (Obesidad inducida por dieta) en ratas Wistar macho.
- El modelo de obesidad, generó alteraciones en las concentraciones de parámetros bioquímicos (glucosa, insulina, colesterol, leptina, LPS y adiponectina).
- Durante la obesidad se desarrolló inflexibilidad metabólica e intolerancia a la glucosa.
- El consumo de una dieta de concentrado de frijol y frijol cocido entero permite contrarrestar los efectos de una dieta alta en grasa.
- El consumo de una dieta suplementada con concentrado de proteína de frijol y/o frijol entero permite mejorar la sensibilidad a la insulina, a pesar de consumir una dieta alta en grasa.
- El consumo de una dieta de concentrado de frijol y frijol cocido entero permiten contrarrestar los efectos de una dieta alta en grasa, incluso al enfrentarse a un reto metabólico.
- El consumo de frijol negro y concentrado de proteína de frijol, permite mantener los niveles de glucosa e insulina a niveles normales.
- Los grupos con dieta DAG + concentrado y DAG + frijol entero (ayuno) disminuyeron la expresión de SREBP1 y FAS respecto al grupo DAG, sugiriendo con ésto la disminución de la lipogénesis mediada por SREBP1 y FAS.
- Además en los grupos con dietas de frijol, se modificó la microbiota intestinal.



- Los resultados obtenidos sugieren que el consumo cotidiano de frijol negro regula la respuesta metabólica postprandial, lo que contribuye a la salud metabólica y contrarresta en cierto grado las consecuencias de la obesidad.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Avivi-Green, C., Polak, S., Madar, Z. & Schwartz B. (2002). Different molecular events account for butyrate-induced apoptosis in two human colon cancer cell lines. *J Nutr* 132:1812–8.
- Bacchetti, D., Aldred, N., Clare, AS. & Burgess J. (2011). Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J Microbiol Methods.*, 86 (3): 351-356.
- Bajzer, M. & Seeley, R. (2006). Obesity and gut flora. *Nature.*, 44: 21-28.
- Bassan, N; et al. (2002). Modelo biológico para la detección de antígenos alimentarios. *ALAN.*, 52 (3): 249 – 256.
- Biosystems, A. *Applied Biosystems StepOne Real- time PCR system*. Obtenido de http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_053238.pdf
- Campos-Vega, *et al.* (2009). Chemical composition and in vitro polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Toxicology and Chemical Food Safety.*, 74 (7): T59-T65.
- Cani, P., *et al.* (2007). Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes.*, 56: 1762-1772.
- Champ, MM. (2002). Non-nutrient bioactive substances of pulses. *Br J Nutr.*, 88 (3): 281-285.
- Choi, K. & Kim, Y. (210). Molecular mechanism of insulin resistance 2. in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med*; 25:119-29
- Clark, S., Jung, S. & Lamsai, B. (2014). *Food Processing: Principles and Applications*, 2^a ed., Wiley, USA.
- CONAPO (Consejo Nacional de Población). “Proyecciones de la población de México 2010-2050” [en línea]: <http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Proyecciones> [Consulta 2 de marzo de 2014].



- Collado, C., Derrien, M., Isolauri, E., Vos, W. & Salminen, S. (2007). Intestinal Integrity and *Akkermansia muciniphila*, a Mucin-Degrading Member of the Intestinal Microbiota Present in Infants, Adults, and the Elderly., *Applied and environmental microbiology*. 73(23): 7767-7770.
- Darzi, J., Frost, G. & Robertson, M.D. (2011). Do SCFA have a role in appetite regulation?. *Proceedings of the Nutrition Society.*, 70: 119–128.
- De la Fuente, M., Lopez-Pedrous, M., Alonso, J., Santalla, M., de Ron, A., Alvarez, G., et al. (2011). In-depth characterization of the phaseolin protein diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Food Technology and Biotechnology.*, 50: 315–325.
- Dick, K. & Field, K. (2004). Rapid Estimation of Numbers of Fecal *Bacteroidetes* by Use of a Quantitative PCR Assay for 16S rRNA Genes. *Applied and environmental microbiology.*, 70 (9):5695-5697.
- Dorak, T. (2006). *Real-time PCR*. UK: Taylor & Francis group, 3-29, 45-47.
- Dorak, T. (2006). Real time PCR. T & F group, UK, pp: 139-142.
- Eckel, R. & Grundy S. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet.*, 365:1415-28.
- Foster-Powell, K.; Sha Holt and JC Brand-Miller. (2002). "International table of glycemic index and glycemic load values: 2002", *Am J Clin Nutr*, 76, pp. 5–56.
- Federación Internacional de Diabetes. (FID, 2013). Atlas de la Diabetes, 6ª ed, pp. 12-24. Consultado el día 2 de mayo de 2015. Disponible en: http://www.idf.org/sites/default/files/SP_6E_Atlas_Full.pdf
- Federación Internacional de Diabetes. (FID, 2014). Póster de actualización 2014 del Atlas de la Diabetes, 6ª ed, pp. 1-2. Consultado el día 2 de mayo de 2015. Disponible en:
- Financiera Rural (2011). Monografía del frijol. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. Dirección Ejecutiva se Análisis Sectorial, México, Agosto 2011.
- Furet, J. P., O. Firmesse, M. Gourmelon, C. Bridonneau, J. Tap, S. Mondot, J. Dore, and G. Corthier. 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol.Ecol.* 68:351-362
- Gálvez, A. & Salinas, G. (2015). El papel del frijol en la salud nutrimental de la población mexicana. *Revista Digital Universitaria*, 16 (2).
- Guarner, F. & Malagelada, J. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet.*, 361:512-19.



- Guo, X., Xia, X., Tang, R., Zhou, J. & Wang, K. (2008). Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology.*, 47 : 367–373
- Gutierrez, J.; J. Rivera-Dommarco; T. Shamah-Levy; S. Villalpando-Hernández; A. Franco; L. Cuevas-Nasu, *et al.*, *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales*, Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2012.
- Hartstra, A., Bouter K., Bäckhed, F. & Nieuwdorp, M. (2015). Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 38: 159-165
- Harris, K., Kassis, A., Major, G. & Chou, C. (2012). Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? *J Obes* 2012: ID 879151. Disponible en línea: <http://10.1155/2012/879151>
- Hangen, L. & Bennink, MR. (2002). Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris* L.) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutr Cancer.*, 44 (1): 60-65
- Hernández, P. (2009). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína carbohidrato [en línea]. UNAM.
- Hijova, E. & Chmelarova, A. (2007). Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl Lek Listy.* 108: 354-358
- Inaguma, T., Han, J. & Isoda, H. (2011). Improvement of insulin resistance by Cyanidin 3-glucoside, anthocyanin from black beans through the up-regulation of GLUT4 gene expression. *BMC Proceedings.*, 5 (Suppl 8):21
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2016). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016.
- Kaplan, L. (1984). Glucose. Kaplan A et al. *Clin Chem The C.V.* Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1032-1036.
- Kelley, D., Goodpaster, B. & Storlien, L. (2002). Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr* : 22:325-46.
- Kelley, D. (2002). Skeletal muscle triglyceride. An aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci*: 967:135-45.
- Kim, S. & Novak, R. (2007). The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol Ther.*, 113:88-120.
- Lanza, E., Hartman, T. J., Albert, P. S., Shields, R., Slattery, M., Caan, B., et al. (2006). High dry bean intake and reduced risk of advanced colorectal adenoma recurrence among participants in the polyp prevention trial. *Journal of Nutrition*, 136, 1896–1903.



- Latham. (2002). Nutrición humana en el mundo en desarrollo. FAO: Alimentación y nutrición N29. Roma.
- Lima, S. (2018). Tratamiento térmico en la producción de un concentrado de proteína de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Desactivación de inhibidores de tripsina. Tesis profesional en proceso. México: Facultad de Química, UNAM.
- Lis, H. & Sharon, N. (1998). Lectins: carbohydrates-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.*, 637-674.
- Lozupone, C., Stombaugh, J., Gordon, J., Jansson, J. & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature.*, 489: 220-230.
- Luna-Vital, D.A., et al.. (2015). Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International.*, 76 (1):39-50
- Morton G. (2007). Hypothalamic leptin regulation of energy homeostasis and glucose metabolism. *Physio.*, 583: 437-443.
- Márquez, M. (2016). El SNAT2, mTORC1, GCN2 e insulina como posibles sensores del tipo de proteína dietaria. Tesis de doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Salinas, G. (2014). Caracterización funcional de un aislado de proteínas de frijo negro (*Phaseolus vulgaris*) variedad INIFAP-8025 y su aplicación en formulaciones de alimentos. Tesis profesional. México: Facultad de Química, UNAM.
- Muzquiz, M., Pedrosa MM., Varela E., Guillamon, E., Goyoaga, C., Cuadrado C. & Burbano C. (2006). Factores no-nutritivos en Fuentes Proteicas de Origen Vegetal. Su Implicación en Nutrición y Salud. *Braz. J. Food Technol. III JIPCA*: 87-98
- Nava, G.M.; Carbonero, F.; Ou, J.; Benefiel, A.C.; O'Keefe, S.J.; Gaskins, H.R. (2012). Hydrogenotrophic microbiota distinguish native Africans from African and European Americans. *Environ. Microbiol. Rep.* 4: 307-315.
- Nistala, R. & Stump, C. (2006). Skeletal muscle insulin resistance is fundamental to the cardiometabolic syndrome. *J Cardiometab Syndr*: 1: 47-52.
- Olefsky, J. & Glass, C. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.*, 72:219-46.
- Olivares, V., Torre, I., Velázquez, L., Aleman, G., López, P., Torres, N., Tovar, AR. & Díaz, A. (2015). Fasting and postprandial regulation of the intracellular localization of adiponectin and of adipokines secretion by dietary fat in rats. *Nutrition & Diabetes.*, 5: 1-10.
- Oliver, P., Carmari, A., Díaz-Rua, R. & Palou, A. (2012). Cold exposure down-regulates adiponutrin/PNPLA3 mRNA expression and affects its nutritional regulation in adipose tissues of lean and obese Zucker rats. *British Journal of Nutrition.*, 107: 1283-1295.



OMS (Organización Mundial de la salud, 2014a). Diabetes, Nota descriptiva N° 312. Consultada el 10 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>

OMS (Organización Mundial de la salud, 2015a). Obesidad y sobrepeso; Nota descriptiva N 311. Consultada el 10 de mayo 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>

OMS (Organización Mundial de la salud, 2015b). 10 Datos sobre la obesidad. Consultada el 10 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/>

Permutt, M., Wasson, J. & Cox, N. (2005). Genetic epidemiology of diabetes. *J. Clin. Invest.* 115. 1431-1439.

Puddu, A., Sanguineti, R., Montecucco, F. & Viviani GL. (2014). Evidence for the gut microbiota short-chain fatty acids as key pathophysiological molecules improving diabetes. *Mediators Inflamm.* 2014: ID 1162021. Disponible en línea: [http:// dx.doi.org /10.1155/2014/162021](http://dx.doi.org/10.1155/2014/162021)

Pujolà, M., Farreras, A.,& Casañas, F. (2007). Protein and starch content of raw, soaked and cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry.*, 102: 1034–1041.

Quiñones, A. (2010). Obtención de un concentrado de proteína de frijol negro, caracterización fisicoquímica y efecto en la concentración de insulina y expresión génica de SREBP-1. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Químicas, Facultad de Química, UNAM.

Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38:996–1047.

Ramirez, A. Reynoso, R. Loarca, G. (2015). Potential role of bioactive compounds of *Phaseolus vulgaris* L. on lipid-lowering mechanisms. *Food Research International.* Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.002>

Randle, P. (1998). Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diab Metabol Rev:* 14:263-83.

Rawe, K.; D. Jayasinghe; F. Mason; A. Davis *et alt.*, “A life free from hunger. Tackling child malnutrition (Report)”, *Save the Children Foundation*, UK, 2012 pp. 1-116.

Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in fecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol* 97: 1166-1177.

Rodríguez Licea, G.; J. García-Salazar; S. Rebollar-Rebollar & A. Cruz-Contreras, “Preferencias del consumidor de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México: factores y



- características que influyen en la decisión de compra diferenciada por tipo y variedad”, *Paradigma económico*, 2010, 2(1), pp. 121-145.
- Ros, M & Medina, G. (2005). Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina. *Endocrinología y Nutrición.*, 365:1415-1428.
- Salinas, G. (2014). Caracterización funcional de un aislado de proteínas de frijo negro (*Phaseolus vulgaris*) variedad INIFAP-8025 y su aplicación en formulaciones de alimentos. Tesis profesional. México: Facultad de Química, UNAM.
- Sánchez, M. (2016). Efecto del nopal en un modelo animal de obesidad inducido por dieta y el impacto en la composición de la microbiota. Tesis de Maestría. México: INCMNSZ.
- Shoaie S, Karlsson F, Mardinoglu A, Nookaew I, Bordel S, Nielsen J. Understanding the interactions between bacteria in the human gut through metabolic modeling. *Sci Rep* 2013; 3: 2532.
- SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera; 2012). Cierre de la producción agrícola por cultivo y por estado. SAGARPA. Consultado el 10 de marzo de 2015. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx>
- Stryer, L., Berg, J. & Tymoczko, M. (2003) “Bioquímica”, 5ª ed. Editorial Reverté. España. pp. 77-116.
- Sugiuchi, H. & Uji, Y. (1995). Direct Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol in Serum with Polyethylene Glycol-Modified Enzymes and Sulfated α -Cyclodextrin. *Clin Chem*; 41:717-723.
- Tapsell, L.C. (2004). Diet and metabolic syndrome: Where does resistant starch fit in. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*; 87: 756–760.
- Tremaroli, V. & Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature.*, 489: 242-249.
- Miranda, M., Tovar, A., Palacios, B., & Torres y Torres, N. (2007). La AMPK como un sensor de energía celular y su función en el organismo.
- Williamson, G. (2013). Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Mol. Nutr. Food Res.* 57: 48–57.
- Winham, D.M., & Hutchins, A.M. (2007). Baked bean consumption reduces serum cholesterol in hypercholesterolemic adults. *Nutrition Research*, 27(7), 380–386.
- Wolfe R. (1998). Metabolic interactions between glucose and fatty acids in human. *Am J Clin Nutr* :67:519-26.



World Health Organization. (1994). Prevention of diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group. Geneva: World Health Organization; 844.

World Health Organization. (2010). Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva. Consultado el 01 de mayo de 2015. Disponible en: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf

Yabe, D., Komuro, R., Liang, G., Goldstein, J. & Brown, M. (2003). Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: Implications for fatty acid synthesis. PNAS., 100 (6): 3155-3160.

Yang, R. & Barouch, L. (2007). Leptin signaling and obesity cardiovascular consequences. Circulation research., 101:545-559.

Yoshida, K., Y. Sato., R, Okuno., K, Kameda., M, Isobe., & T, Kondo. (1996). Structural analysis and measurements of anthocyanins from coloured seed coats of *Vigna*, *Phaseolus* and *Glycine* legumes. Biosci. Biotech. Biochem. 60(4): 589-593.

Zimmet, G., George, K. & Serrano M. (2005). Una nueva definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la Federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados. Rev Esp Cardiol: 58(12):1371-1376



12. ANEXO

ANEXO I. Determinación de insulina

Rat Insulin ELISA (Alpco. cat. 80-INSRT-E01).

Preparación de reactivos: Preparar solución 1x a partir de la solución del conjugado (11x) (diluir con buffer del conjugado) y 1x de la solución concentrada de Buffer de lavado (21x) (diluir con agua desionizada).

1. Pipetear 10 μ L de cada uno de los estándares (0.15, 0.4, 1, 3 y 5.5 ng/mL), controles, blanco de muestra y muestras en su pozo respectivo de la microplaca proporcionada por el kit. La curva estándar se analizó por triplicado y las muestras se analizaron por duplicado.
2. Agregar a cada pozo 75 μ L del conjugado (1x). Cubrir la placa con una cubierta e incubar durante 2h en agitación a 800 rpm a temperatura ambiente.
3. Decantar el sobrenadante y lavar 6 veces cada pozo con 350 μ L de buffer de lavado (1x) utilizando micropipeta multicanal, entre cada lavado se debe invertir la placa para eliminar el líquido sobrenadante y golpear firmemente sobre papel absorbente. Después del último lavado, eliminar residuos de buffer y burbujas de cada pozo.
4. Pipetear 100 μ L de solución de sustrato TMB en cada pozo.
5. Incubar las placas durante 15 min en agitación a temperatura ambiente.
6. Pipetear 100 μ L de solución de paro en cada pozo.
7. Leer la absorbancia a 450 nm en espectrofotómetro lector microplacas (xMark™ Biorad), se debe analizar inmediatamente después de agregar la solución de paro.
8. Construir la curva estándar de OD vs. Concentración. Calcular los ng/mL de cada muestra interpolando en la curva estándar obtenida.



ANEXO II. Determinación de leptina

Rat ELISA kit para Leptina (ALPCO, cat. ab100773)

Preparación de reactivos:

Preparar soluciones 1x diluyendo con agua desionizada de cada uno de los siguientes reactivos: Diluyente D, diluyente B, solución de lavado.

Preparar soluciones 1x diluyendo con el diluyente B de cada uno de los siguientes reactivos: Anticuerpo Biotinilado para la detección de leptina y de la solución de Steptavidina-HRP.

Preparar la curva estándar: Preparar el Stock estándar de 50 ng/mL agregando 400 μ L del diluyente D. A partir del stock anterior preparar diluciones seriales para obtener concentraciones de 8000, 2667, 888.9, 296.3, 98.77, 39.92, 10.97 y 0 pg/mL.

1. Pipetear 100 μ L de cada uno de los estándares, blancos y muestras en un pozo respectivo de la microplaca proporcionada por el kit. La curva estándar se analizó por triplicado y las muestras se analizaron por duplicado.
2. Cubrir la placa con una cubierta e incubar durante 2.5 h a temperatura ambiente.
3. Decantar el sobrenadante y lavar 4 veces cada pozo con 300 μ L de buffer de lavado (1x) utilizando micropipeta multicanal, entre cada lavado se debe invertir la placa para eliminar el líquido sobrenadante y golpear firmemente sobre papel absorbente. Después del último lavado, eliminar residuos de buffer y burbujas de cada pozo.
4. Pipetear 100 μ L del anticuerpo biotinilado en cada pozo. Incubar durante 1 h a temperatura ambiente mantener en agitación gentil.
5. Descartar el sobrenadante, repetir 4 lavados.
6. Agregar 100 μ L de la solución de Streptavidina HRP (1x) a cada pozo. Incubar por 45 min a temperatura ambiente mantener en agitación gentil.
7. Descartar el sobrenadante, realizar 4 lavados (repetir paso 3).
8. Agregar 100 μ L del reactivo de sustrato de TMB One Step a cada pozo. Incubar por 30 min a temperatura ambiente y oscuridad, mantener en agitación gentil.
9. Agregar 50 μ L de solución de paro en cada pozo.
10. Leer la absorbancia a 450 nm en espectrofotómetro lector microplacas (xMark™ Biorad), se debe analizar inmediatamente después de agregar la solución de paro.



11. Construir la curva estándar de OD vs. log Concentración. Calcular los ng/mL de cada muestra interpolando en la curva estándar obtenida.

ANEXO III. Determinación de adiponectina

ELISA Assay Kit for Adiponectin (ADP) (Cloud-Clone Corp., cat. SEA605Ra)

Preparación de reactivos:

Diluir los reactivos de detección A y B con los diluyentes A y B correspondientes.

Preparar solución 1x de solución de lavado diluyendo con agua desionizada.

Preparar la curva estándar: Reconstituir el estándar con 1 mL de Diluyente Estándar (400 ng/mL), realizar diluciones seriadas para obtener concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 0 ng/mL, diluir con diluyente D.

1. Pipetear 100 μ L de cada uno de los estándares, blancos y muestras en un pozo respectivo de la microplaca proporcionada por el kit. La curva estándar se analizó por triplicado y las muestras se analizaron por duplicado.
2. Cubrir la placa con una cubierta e incubar durante 2 h a 37°C.
3. Descartar el sobrenadante.
4. Agregar 100 μ L de la solución de detección A a cada pozo. Cubrir con una cubierta e incubar por 1 h a 37°C.
5. Descartar el sobrenadante y lavar 3 veces con 350 μ L de solución de lavado (1x) utilizando micropipeta multicanal, entre cada lavado se debe invertir la placa para eliminar el líquido sobrenadante y golpear firmemente sobre papel absorbente. Después del último lavado, eliminar residuos de buffer y burbujas de cada pozo.
6. Agregar 100 μ L de la solución de detección B a cada pozo. Cubrir con una cubierta e incubar por 30 min a 37°C.
7. Descartar el sobrenadante y lavar 5 veces (repetir paso 5).
8. Agregar 90 μ L de solución de sustrato a cada pozo. Cubrir con una cubierta e incubar por 20 min a 37°C en oscuridad.
9. Pipetear 50 μ L de solución de paro en cada pozo.
10. Leer la absorbancia a 450 nm en espectrofotómetro lector microplacas (xMark™ Biorad), se debe analizar inmediatamente después de agregar la solución de paro.



11. Construir la curva estándar de log Concentración vs. OD. Calcular los ng/mL de cada muestra interpolando en la curva estándar obtenida.

ANEXO IV. Determinación de LPS (Lipopolisacárido)

ELISA Assay Kit for Adiponectin (LPS) (Cloud-Clone Corp., cat. CEB526Ge)

Preparación de reactivos:

Reactivo de detección A: Reconstituir con 150 μ L de reactivo diluyente. Posteriormente diluir los reactivos de detección A y B con los diluyentes A y B correspondientes.

Preparar solución 1x de solución de lavado diluyendo con agua desionizada.

Preparar la curva estándar: Reconstituir el estándar con 0.5 mL de Diluyente Estándar (1000 ng/mL), realizar diluciones seriadas para obtener concentraciones de 333.33, 111.11, 37.04, 12.35, 0 ng/mL, diluir con diluyente D.

1. Pipetear 50 μ L de cada uno de los estándares, blancos y muestras en un pozo respectivo de la microplaca proporcionada por el kit. La curva estándar se analizó por triplicado y las muestras se analizaron por duplicado.
2. Agregar 50 μ L de la solución de detección A a cada pozo. Cubrir con una cubierta e incubar por 1 h a 37°C.
3. Descartar el sobrenadante y lavar 3 veces con 350 μ L de solución de lavado (1x) utilizando micropipeta multicanal, entre cada lavado se debe invertir la placa para eliminar el líquido sobrenadante y golpear firmemente sobre papel absorbente. Después del último lavado, eliminar residuos de buffer y burbujas de cada pozo.
4. Agregar 100 μ L de la solución de detección B a cada pozo. Cubrir con una cubierta e incubar por 30 min a 37°C.
5. Descartar el sobrenadante, repetir 5 lavados (Repetir paso 3)
6. Agregar 90 μ L de solución de sustrato a cada pozo. Cubrir con una cubierta e incubar por 20 min a 37°C en oscuridad.
7. Pipetear 50 μ L de solución de paro en cada pozo.
8. Leer la absorbancia a 450 nm en espectrofotómetro lector microplacas (xMark™ Biorad), se debe analizar inmediatamente después de agregar la solución de paro.
9. Construir la curva estándar de log Concentración vs. OD. Calcular los ng/mL de cada muestra interpolando en la curva estándar obtenida.



ANEXO V. Extracción de RNA

1. Limpiar el área de trabajo con etanol
2. Agregar 1 mL de TRIzol®(cat. 15596-018, Invitrogen) en tubo para Tissue Lyser (Qiagen).
3. Colocar un balón de acero inoxidable (Stainless Steel Beads, Qiagen) a cada tubo del punto anterior.
4. Los tejidos se encuentran en el ultracongelador, por lo que se deben sacar y colocar en nitrógeno líquido.
5. Cortar aproximadamente 250mg de tejido. Colocar el tejido en el tubo para Tissue Lyser con TRIzol preparado en el punto 1.
6. Colocar los tubos en el equipo Tissue Lyser II (cat. 85300, Qiagen) para su homogenización durante dos minutos a 300 rpm.
7. Posteriormente sacar los tubos del Tissue Lyser II, agregar 200 µL de cloroformo al 100% a cada muestra y agitar en vórtex brevemente.
8. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar a 10,000 x g, 15 min, 4°C.
10. Recuperar el sobrenadante (fase acuosa) y transferir a tubo eppendorf de 1.5 mL. Adicionar en proporción 1:1 de isopropanol al 100% .
11. Mezclar por inversión e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugar a 10,000 x g, 15 min, 4°C.
13. Decantar el sobrenadante
14. Agregar 1 mL de etanol al 75% frío. Homogenizar en vórtex hasta desprender la pastilla (sedimento).
15. Centrifugar a 10,000 x g, 15 min, 4°C.
16. Desechar el etanol por inversión y dejar secar el tubo en posición horizontal.
17. Resuspender con 100 µL de agua DEPC y homogenizar en vórtex hasta disolver completamente.
18. Calentar 5 minutos, 65°C. Homogenizar en vórtex y mantener en hielo.
19. Cuantificar el RNA en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Evaluar la integridad del RNA mediante electroforesis capilar en equipo Qiaxcel (Qiagen).
20. Conservar el RNA a -70°C.



ANEXO VI. Extracción de DNA a partir de heces fecales de rata mediante kit QIAamp DNA Mini Kit Stool (Qiagen)

1. Se pesaron 220-250 mg de heces en un tubo eppendorf de 2 mL.
2. Se agregaron 1.6 mL de buffer ASL y se homogenizó en vórtex.
3. Centrifugar a 10,000 x g, 5 min, temperatura ambiente.
4. Colocar en un tubo eppendorf de 2 mL una tableta InhibitEX.
5. Tomar 1.4 mL del sobrenadante obtenido del paso 3 y transferirlos al tubo eppendorf preparado en el paso anterior (paso 4).
6. Homogenizar completamente en vórtex. Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 10,000 x g, 3 min, temperatura ambiente.
8. Tomar 700 μ L del sobrenadante del paso anterior y transferirlos a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
9. Centrifugar a 10,000 x g, 3 min.
10. Colocar en un tubo eppendorf de 2 mL, 25 μ L de proteinasa K, agregar 600 μ L del sobrenadante del paso 9. Agregar 600 μ L de Buffer AL.
11. Incubar a 70°C por 10 min.
12. Agregar 600 μ L de etanol al 100% frio. Homogenizar en vórtex.
13. Pasar el sobrenadante a través de una de las columnas para retención de ADN mediante centrifugación (10,000 x g, 1 min).
14. Lavar con 500 μ L de buffer AW1. Centrifugar a 10,000 x g, 1 min.
15. Lavar con 500 μ L de buffer AW2. Centrifugar a 10,000 x g, 3 min.
16. Dejar secar todo el buffer residual mediante centrifugación a 10,000 x g por algunos segundos.
17. Colocar la columna en un tubo nuevo para centrifuga de 1.6 mL y agregar 200 μ L de Buffer AE 1X (medio de elución).
18. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos
19. Centrifugar 1 min a 10,000 x g, para eluir y colectar el ADN.
20. Conservar el ADN colectado a -70°C.
21. Cuantificar el DNA obtenido mediante NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Evaluar la integridad del DNA mediante electroforesis capilar en equipo Qiaxcel (Qiagen).



ANEXO VII.- Concentración de los RNA extraídos y su relación 260/280.

Tabla 27 .- Concentración de los RNA extraídos y su relación 260/280.

Muestra	Concentración (ng/ μ l)	260/280
Control Cas 1	10204.4	2.04
Control Cas 2	14019.8	1.98
Control Cas 3	12958.6	1.99
Control Cas 4	11825.1	2.02
Control Cas 5	7201	2.05
Control Cas 6	12496	2.01
Control Cas 7	14508.8	1.94
Concentrado frijol 1	10038.9	2.04
Concentrado frijol 2	15714.7	1.89
Concentrado frijol 3	11560.7	2.02
Concentrado frijol 4	14574	1.95
Concentrado frijol 5	11748.4	2.02
Concentrado frijol 6	13506.8	1.98
Frijol entero 1	6734.6	2.11
Frijol entero 2	12591.7	2
Frijol entero 3	12906.1	2.01
Frijol entero 4	12135.3	2.03
Frijol entero 5	13624.5	1.99
Frijol entero 6	9189.3	2.06
DAG Cas +S 1	6802.2	2.16
DAG Cas +S 2	11516.5	2.01
DAG Cas +S 3	12402	2.01
DAG Cas +S 4	7428	2.06
DAG Cas +S 5	12564	2.01
DAG Cas +S 6	5316.9	2.06
DAG Cas +S 7	4229.6	2.04
DAG + S + Conc. frijol 1	10673.2	2.03
DAG + S + Conc. frijol 2	14276.1	1.96
DAG + S + Conc. frijol 3	12520.5	2
DAG + S + Conc. frijol 4	8805.6	2.03
DAG + S + Conc. frijol 6	8887.6	2.03
DAG+S+ Frijol entero 1	9606	2.02
DAG+S+ Frijol entero 2	6476.2	1.99
DAG+S+ Frijol entero 3	11433.9	2.02
DAG+S+ Frijol entero 5	13037.7	2
DAG+S+ Frijol entero 6	9827.4	2.04