



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**“ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS
FENÓLICOS DEL FRIJOL EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS
OXIDANTE EN *Caenorhabditis elegans*”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A:

QFB. ALEJANDRA YITZEL GUZMÁN HERNÁNDEZ

ASESOR:

D.C. JOSUÉ ALTAMIRANO HERNÁNDEZ

Morelia, Michoacán, Mayo, 2019.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS
UMSNH

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Sintética y Química Aplicada del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del D.C. Josué Altamirano Hernández y con el apoyo de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

A. ÍNDICE GENERAL

	Pág.
B. ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
C. ÍNDICE DE TABLAS.....	7
D. NOMENCLATURA.....	8
Abreviaturas	8
Griegos.....	10
μ: micro (1×10^{-6}).....	10
α: alfa.....	10
E. RESUMEN	11
F. ABSTRACT.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. ANTECEDENTES.....	14
2.1 Generalidades del frijol	14
2.2 Domesticación del frijol	15
2.3 Composición química del frijol	16
2.4 El frijol como alimento funcional	18
2.5 Compuestos bioactivos en el frijol e implicaciones para la salud	19
2.5.1 Compuestos fenólicos	20
2.6 Radicales libres y estrés oxidante.....	23
2.7 <i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo.....	25
2.8 La glucosa como agente oxidante para inducir la producción de ROS en <i>C. elegans</i>	27
2.9 Estrategias de defensa frente al estrés en <i>C. elegans</i>	27
2.9.1 Moléculas de bajo peso molecular.....	29
2.9.2 Proteínas y enzimas antioxidantes.....	29
2.9.3 Factores de transcripción implicados en el estrés oxidante.....	31
2.10 Capacidad antioxidante del frijol	35
III. JUSTIFICACIÓN	37
IV. HIPÓTESIS.....	38

V. OBJETIVO GENERAL.....	38
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
6.1. Muestras de frijol.....	39
6.2. Cepas de <i>C. elegans</i> y condiciones de cultivo.....	39
6.3. Preparación y extracción metanólica de muestras	40
6.4. Cuantificación de compuestos fenólicos.....	40
6.5. Evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	41
6.5.1. Método DPPH	41
6.5.2. Método ABTS	42
6.5.3. Método FRAP	42
6.6 Sincronización de <i>C. elegans</i>	42
6.7. Ensayos de resistencia a estrés oxidante y longevidad en <i>C. elegans</i>	43
6.8. Obtención de lisados de nematodos.....	44
6.9 Cuantificación de fenoles totales en <i>Caenorhabditis elegans</i>	44
6.10 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno intracelular.....	44
6.11 Cuantificación de proteínas totales.....	45
6.12 Determinación de la actividad enzimática de catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD)	45
6.13 Determinación del glutatión total, Glutatión reducido (GSH) y Glutatión oxidado (GSSG).....	46
6.14 Determinación de biomarcadores de estrés oxidante.....	47
6.14.1 Peroxidación lipídica.....	47
6.14.2 Carbonilación de proteínas.....	47
6.15 Ensayos de la expresión en cepas reporteras	48
6.16 Análisis estadístico.....	48
VII. RESULTADOS.....	49
7.1 Contenido de compuestos fenólicos en el frijol pinto de la variedad criolla y comercial.....	49
7.4 Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	50
7.3 Contenido de fenoles totales en <i>Caenorhabditis elegans</i>	51
7.4 Efecto del extracto del frijol sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)	52
7.5 Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo y comercial sobre la longevidad de <i>C. elegans</i>	53

7.6	El extracto del frijol pinto criollo aumentan la longevidad y la resistencia al estrés oxidante de mutantes en genes que modulan la vía de señalización de la insulina /IGF-1.....	55
7.7	Los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo aumentan la actividad del factor de transcripción DAF-16/FOXO de respuesta a estrés oxidante.....	57
7.8	Los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo aumentan la actividad del fator transcripcional SKN-1/NRF-2 en respuesta al estrés oxidante.....	60
7.9	Los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre los niveles de glutatión.	61
7.10	Los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo modulan las enzimas antioxidantes	62
7.11	Una dieta rica en antioxidantes presentes en el frijol pinto criollo disminuye la oxidación de lípidos y proteínas.....	70
VIII.	DISCUSIÓN.....	73
IX.	CONCLUSIÓN.....	84
X.	PERSPECTIVAS.....	84
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
XII.	ANEXO.....	98
A.	MEDIOS DE CULTIVO Y BUFFER UTILIZADOS.....	98
B.	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE ACUERDO AL NÚMERO DE NEMÁTODOS (Método de Bradford).....	100
C.	EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN <i>C. elegans</i>.....	101

B. ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Partes de la semilla del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	15
Figura 2. Compuestos químicos en semillas de frijol.....	18
Figura 3. Principales clases de compuestos fenólicos presentes en el frijol.....	23
Figura 4. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> a 25° C.. ..	26
Figura 5. Vía de señalización de la insulina en <i>C. elegans</i> . Esquema simplificado de la IIS-IGF-1.	33
Figura 6. Contenido de fenoles totales en semillas de dos variedades de frijol.	50
Figura 7. Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	51
Figura 8. Contenido de fenoles totales en <i>C. elegans</i>	52
Figura 9. Efecto de la adición de glucosa y extracto metanólico del frijol en la producción de ROS en <i>C. elegans</i>	53
Figura 10. Efecto del extracto metanólico del frijol en la longevidad y la resistencia al estrés oxidante en <i>C. elegans</i>	54
Figura 11. Efecto del extracto metanólico del frijol en la longevidad y la resistencia al estrés oxidante en la mutante <i>daf-2</i>	56
Figura 12. Efecto del extracto metanólico del frijol en la longevidad y la resistencia al estrés oxidante en la mutante <i>age-1</i>	57
Figura 13. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre DAF-16..	58
Figura 14. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre la traslocación de DAF-16.....	59
Figura 15. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre la traslocación de SKN-1.....	60
Figura 16. Efecto del extracto del frijol pinto criollo en los niveles de glutatión..	62
Figura 17. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre la actividad de SOD.....	64
Figura 18. La expresión de <i>sod-1::YFP</i> es mayor cuando los animales se cultivaron con el extracto del frijol pinto criollo.....	65
Figura 19. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo en la mutante <i>sod-12345</i> de <i>C. elegans</i>	66
Figura 20. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre la actividad de CAT.	67
Figura 21. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre la expresión de catalasa.....	68
Figura 22. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre la expresión de GST-4..	69
Figura 23. Efecto del extracto del frijol en la peroxidación de lípidos.	70
Figura 24. Efecto del extracto del frijol en la carbonilación de proteínas.	71
Figura 25. Exposición a compuestos fenólicos del extracto del frijol pinto criollo en la mutante <i>cep-1/P53</i>	72
Figura 26. Modelo propuesto de la acción antioxidante de los polifenoles del extracto metanólico de <i>Phaseolus vulgaris</i> en <i>Caenorhabditis elegans</i>	83
Figura B 1. Curva de calibración para cuantificación de proteína total en <i>C. elegans</i>	100
Figura B 2. Concentración de proteína total en <i>C. elegans</i>	101
Figura C 1. Porcentaje de supervivencia de acuerdo a la concentración de glucosa.	101
Figura C 2. Porcentaje de supervivencia de acuerdo a la concentración de H ₂ O ₂	101

C. ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla A 1. Nematode Growth Medium (NGM)	98
Tabla A 2. Buffer M9.....	98
Tabla A 3. Buffer de fosfatos (PBS)	99
Tabla A 4. Luria-Bertani (LB).....	99

D. NOMENCLATURA

Abreviaturas

ABTS: 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGE: AGEing alteration/ Alteración del Envejecimiento

ARE: Antioxidant Response Element/ Elemento de respuesta antioxidante

ATP: Adenosín trifosfato

BHA: Butilhidroxianisol

BHT: Butilhidroxitolueno

BSA: Bovine Serum Albumin/ Albúmina de suero bovino

CAT: Catalasa

DAF: DAuer Anormal Formation/ Formación anormal de DAuer

DCFH-DA: Diclorofluoresceína-Diacetato

DOC: Desoxicolato de sodio

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

DTNB: 5,5'-ditiobis(2'-ácido nitrobenzoico)

EAG: Equivalentes de Ácido Gálico

FAO: Organización de Alimentos y Agricultura

FOXO: forkhead box, sub-grupo O

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power/ Poder Antioxidante Reductor de Hierro

FudR: Fluorodesoxiuridina

GFP: Green Fluorescent Protein/ Proteína verde fluorescente

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

GST: Glutación-S-transferasa

HPLC-DAD: High-Performance Liquid Chromatography whit a Diode-Array Detector/ Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos

HSP: Heat Shock Proteins / Proteina de shock térmico

IGF: Insulinic-like Growth Factor/ Factor de crecimiento insulínico

MDA: Malondialdehído

NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NGM: Nematode Growth Medium/ Medio de crecimiento de nematodos

NRF: Nuclear factor erythroid 2-Related Factor /Factor nuclear eritroide

OH[•] : Radical hidroxilo

O₂^{•-} : Radical superóxido

pH: Potencial de hidrogeniones

PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase/ Fosfatidil inositol-3-OH quinasa

Prxs: Peroxirredoxinas

PUFA: Poly-Unsaturated Fatty Acids/ Ácidos grasos poliinsaturados

P53: Proteína supresora de tumores

ARN: Ácido ribonucleico

RNS: Reactive Nitrogen Species/ Especies Reactivas del Nitrógeno

ROS: Reactive Oxygen Species/ Especies Reactivas de Oxígeno

RSS: Reactive Sulfur Species/ Especies Reactivas del Azufre

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate/ Dodecilsulfato sódico

SKN: SKiNhead

SOD: Superóxido dismutasa

SOD/CuZn: Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc

SOD/Mn: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso

TBA: Thiobarbituric acid/ Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Species reactive to thiobarbituric acid/ Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TCA: Trichloroacetic acid/ Ácido Tricloroacético

TPTZ: 2,4,6-Tri(2-pyridil)-s-triazina

UAF: Unidades Arbitrarias de Fluorescencia

UV: Ultravioleta

WST: Sal de tetrazolio

YFP: Yellow Fluorescent Protein/ Proteína amarilla fluorescente

8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

Griegos

μ: micro (1×10^{-6})

α: alfa

β: beta

E. RESUMEN

El consumo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) se ha asociado con importantes actividades biológicas en la prevención y tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas, debido a su alto contenido de polifenoles que le confieren un importante efecto antioxidante, pero no se ha abordado la participación de estos compuestos como antioxidantes indirectos, incluyendo la regulación por incremento de las enzimas antioxidantes y la modulación de la señalización celular y la expresión génica. En este estudio se realizó la extracción metanólica de las variedades de semillas pintas comerciales y criollas. La actividad antioxidante *in vitro* se determinó mediante las técnicas DPPH-, ABTS + y FRAP. Para las pruebas *in vivo*, se utilizó la cepa silvestre, así como cepas mutantes y reporteras de *Caenorhabditis elegans* empleado como modelo experimental, los cuales se sometieron a estrés oxidante mediante la adición glucosa en el medio. Los resultados mostraron que el extracto del frijol pinto criollo, además de mostrar una buena actividad antioxidante en la prueba de reducción de Hierro (FRAP), hubo un incremento en la esperanza de vida de *C. elegans* (N2) y una resistencia a estrés con glucosa. También, se analizó la participación de reguladores clave del estrés oxidante y longevidad como las proteínas SKN-1/NRF2, DAF-16/FOXO, CEP-1/P53, DAF-2/IGF-1, AGE-1/PI3K, en donde los fenoles pueden ejercer su acción antioxidante, prolongando la vida útil en nematodos alimentados con el extracto del frijol. Además, se investigó el incremento en la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GST en las condiciones estudiadas, observando un aumento en la actividad de estas enzimas en presencia del extracto del frijol. Adicionalmente, se encontró una disminución en la oxidación de lípidos y proteínas al adicionarse el extracto del frijol en el medio, ejerciendo un papel fundamental en la disminución de la peroxidación de lípidos y carbonilación de proteínas cuando se induce un estrés oxidante con glucosa.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, compuestos fenólicos, antioxidante, *Caenorhabditis elegans*, estrés oxidante.

F. ABSTRACT

The consumption of beans (*Phaseolus vulgaris* L) has been associated with important biological activities in the prevention and treatment of chronic-degenerative diseases, due to its high content of polyphenols that give it an important antioxidant effect, but the participation of these has not been addressed compounds as indirect antioxidants, including the up-regulation of antioxidant enzymes and the modulation of cell signaling and gene expression. In this study, the methanolic extraction of the varieties of commercial and criollo pinto was carried out. Antioxidant activity in vitro was determined using the DPPH-, ABTS + and FRAP techniques. For the in vivo tests, the wild strain was used, as well as mutant and reporter strains of *Caenorhabditis elegans* used as an experimental model, which were subjected to oxidative stress by the addition glucose in the medium. The results showed that the pinto criollo bean extract, in addition to showing a good antioxidant activity in the iron reduction test (FRAP), there is an increase in the life expectancy of *C. elegans* (N2) and a resistance to stress with H₂O₂ and high concentrations of glucose. Also, the participation of key regulators of oxidative stress and longevity were analyzed, such as the proteins SKN-1 / NRF2, DAF-16 / FOXO, CEP-1 / P53, DAF-2 / IGF, AGE-1 / PI3K, where Polyphenols can exert their antioxidant action, prolonging the useful life in nematodes fed with the bean extract. In addition, the increase in the activity of antioxidant enzymes such as SOD, CAT and GST in the studied conditions was investigated, observing an increase in the activity of these enzymes in the presence of the bean extract. Additionally, a decrease in the oxidation of lipids and proteins was found when the bean extract was added to the medium, playing a fundamental role in the decrease of lipid peroxidation and protein carbonylation when oxidative stress is induced with glucose.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, phenolic compounds, antioxidant, *Caenorhabditis elegans*, oxidative stress.

I. INTRODUCCIÓN

El frijol común es una semilla comestible económicamente importante y su consumo ha sido una parte integral de la dieta en todo el mundo, principalmente en México (Cardador-Martínez y col., 2002). Se destaca como fuente de proteínas, almidón y fibra dietética. Además, la composición del frijol también incluye compuestos fenólicos, tocoferoles, ácidos grasos insaturados, péptidos, entre otros constituyentes. La composición química del frijol está asociada con importantes actividades biológicas reportadas en la literatura, incluidos los efectos antioxidantes, antimicrobianos, antihiper glucémicos, anticancerígenos, atenuación del estrés, ansiedad y depresión (Basso-Los y col., 2018; Mudryj y col., 2014).

Los alimentos funcionales son productos alimenticios de origen animal o vegetal que se consumen en la dieta diaria que no solo proporcionan nutrientes, sino que poseen compuestos bioactivos los cuales son componentes de los alimentos que influyen en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos ejerciendo efectos beneficios para la salud, encontrando entre estos a la fibra, ácido fólico, oligosacáridos, lectinas, inhibidores de tripsina, y compuestos fenólicos (Drago y col., 2006; Guzmán-Maldonado y col., 2002) por lo que el frijol se considera uno de ellos. Sin embargo, los alimentos actualmente consumidos se analizan intensamente para descubrir sus beneficios fisiológicos, ya que pueden disminuir el riesgo de enfermedades crónicas. Los efectos de los antioxidantes en la salud que se atribuyen en muchos estudios se basan principalmente en estudios *in vitro*, que no necesariamente reflejan los mecanismos fisiológicos *in vivo*.

En *Phaseolus vulgaris*, existen diversos estudios que comprueban su capacidad antioxidante *in vivo*. Algunos estudios clínicos han demostrado un efecto benéfico del consumo del frijol en el índice glucémico y un papel protector contra la diabetes tipo 2 debido a su alto contenido de polifenoles, que le confiere un importante efecto antioxidante (Mudryj y col., 2014; Messina y col., 2014), sin embargo, no existen reportes de la acción que ejerce el frijol como antioxidante indirecto, lo cuál potenciaría su uso para fines preventivos-terapéuticos.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del frijol

México es reconocido como el centro de origen y domesticación del frijol común. Dentro del grupo de las leguminosas que poseen semillas comestibles, el frijol común corresponde a una de las más importantes. Taxonómicamente, el frijol corresponde a la especie del género *Phaseolus*. Su nombre completo es *Phaseolus vulgaris* L., asignada por Linneo en 1753, a la tribu *Phaseoleae*, subfamilia *Papilionoideae*, familia *Leguminosae* y al orden *Fabales* (Ulloa y col., 2011). Las plantas de frijol son hierbas rastreras y trepadoras con hojas de tres foliolos. El color de sus flores tiene tonalidades rosas, lilas y violetas. Sus semillas, lo que conocemos como frijol propiamente, tiene forma de riñón y crecen en una vaina comestible como legumbre (ejotes, del náhuatl *exotl*); presentan un ciclo anual, su crecimiento es arbustivo y se adapta a distintos climas desde cálidos a húmedos. Esta leguminosa es un grano seco, separado de la vaina. Las principales partes del grano del frijol, son el cotiledón (89%), la testa (10%) y el eje embrionario (1%) (Figura 1). El cotiledón aporta las principales sustancias de reserva como lo son proteínas y carbohidratos. La testa es una barrera de protección para el embrión y contiene altas concentraciones de compuestos polifenólicos (Dueñas y col., 2006). Dentro de los tipos de frijol, actualmente las poblaciones silvestres son usadas incipientemente por los humanos; muchas de ellas son tolerantes a ambientes inductores de estrés y sus características nutricionales y de calidad pueden ser excepcionales, por ello representan un recurso desaprovechado (Peña-Valdivia y col., 2013).

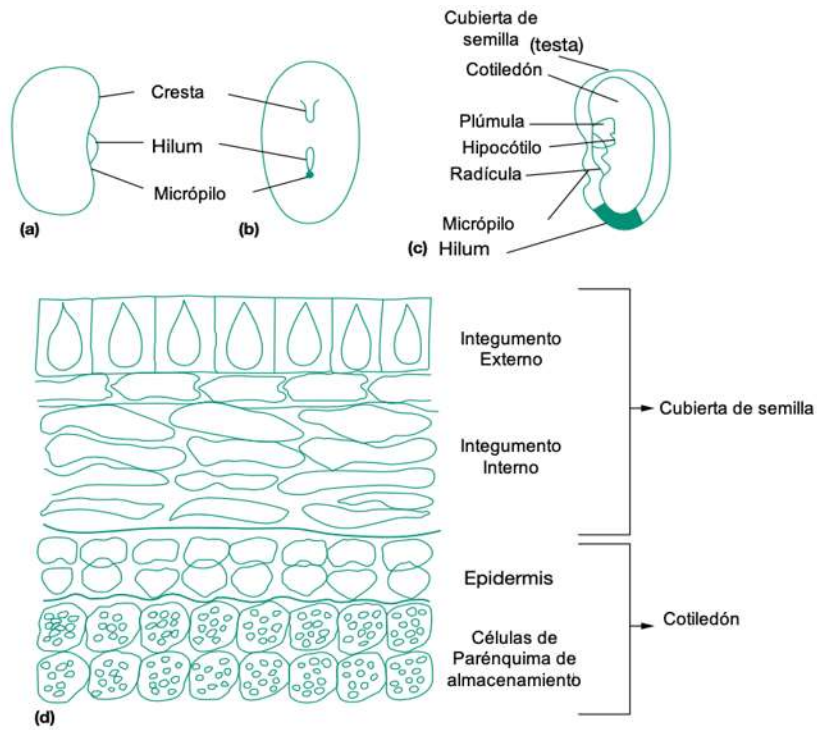


Figura 1. Partes de la semilla del frijol (*Phaseolus vulgaris*). (a) Vista lateral externa, (b) Vista externa de la cara o el borde (vista desde el lado del hilum), (c) sección transversal (se quitó un cotiledón) y (d) sección transversal detallada a través de la semilla. (Sathe y col., 2003).

2.2 Domesticación del frijol

La domesticación de plantas es un proceso resultante de la combinación de la evolución natural y la selección empírica practicada por el hombre, mediante la cual se derivan los cultivos domesticados a partir de sus progenitores silvestres. La domesticación del frijol redujo la diversidad genética de la población en comparación con su ancestro, debido al pequeño número de individuos que fundaron las poblaciones domesticadas (Ladizinsky, 1998) y la posterior selección con base en características particulares que redujeron aún más la diversidad genética de loci específicos y regiones genómicas circundantes (Papa y col., 2006). Aunado a esto, surgió el frijol cultivado dentro del cual se encuentra el frijol criollo y comercial, los cuales son utilizados para el consumo humano. El frijol

criollo surge de manera natural como resultado del proceso evolutivo de domesticación e históricamente ha sido sembrado por los campesinos en forma local en casi todos los estados de la República Mexicana, representando una amplia variedad en la morfología y color de las semillas. Sin embargo, el frijol comercial es producto del mejoramiento genético a través de selecciones dirigidas por el hombre para obtener las características de su interés, siendo generadas por programas de mejoramiento genético mediante la cruce de materiales criollos relacionados genéticamente (Acosta y col., 2007; Harlan, 1987). El género *Phaseolus* contiene 50 especies de crecimiento silvestre distribuidas solo en América, pero solo cinco especies han sido domesticadas para su consumo: *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus lunatus* L., *Phaseolus coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray, y *Phaseolus polyanthus* Greenman, con distintas adaptaciones y sistemas reproductivos (Gepts., 2001). Se cultivan en muchos lugares del mundo y es uno de los principales componentes de la dieta humana por lo que han recibido una atención considerable ya que contienen compuestos polifenólicos que pueden influir en su calidad nutricional.

2.3 Composición química del frijol

El frijol se incluye en el grupo de semillas de legumbres almidonadas, que son fuentes importantes de proteínas, dependiendo del tipo de frijol, los rangos de contenido de proteína varían entre el 14% y el 33% y está enriquecido en aminoácidos como la lisina (6.4–7.6 g / 100 g de proteína) y la fenilalanina más tirosina (5.3–8.2 g / 100 g de proteína) (Ulloa y col., 2011). Por lo tanto, cumple con todos los requisitos mínimos recomendados por la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO) o la Organización Mundial de la Salud. Además, los compuestos fenólicos, tocoferoles, péptidos, aminoácidos, fibra dietética, almidón resistente, ácidos grasos insaturados, minerales (Ca, 3 g / kg; Fe, 40 mg / kg; Zn, 35 mg / kg) (Chávez- Mendoza y col., 2017) entre otros, son compuestos importantes presentes en los frijoles y pueden proporcionar actividades biológicas importantes (Hall y col., 2017; Pedrosa y col., 2015).

El frijol contiene dos o tres veces más fibra por cada 100 g de porción comestible que otros productos de primera necesidad. Su consumo en los países desarrollados, sin embargo, ha sido reemplazado por otros alimentos (cereales, carnes, productos lácteos) y la ingesta de fibra dietética se redujo significativamente (Chen y col., 2016). El almidón del frijol común, la fibra dietética y sus productos de fermentación están asociados con la protección del tracto digestivo humano, principalmente del colon (Dueñas y col., 2016; Chen y col., 2015).

El frijol no es una semilla oleaginosa, sin embargo, tiene una alta proporción de ácidos grasos insaturados, como los ácidos linolénico y linoleico, siendo los principales ácidos grasos (62-83% del total de ácidos grasos), seguidos por los ácidos palmítico y oleico (Chen y col., 2015). La alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (PUFA) en el frijol presenta una relación deseable baja en omega-6 / omega-3, teniendo posibles beneficios para la salud.

Los principales compuestos químicos de las semillas de frijol se ilustran en la figura 2.

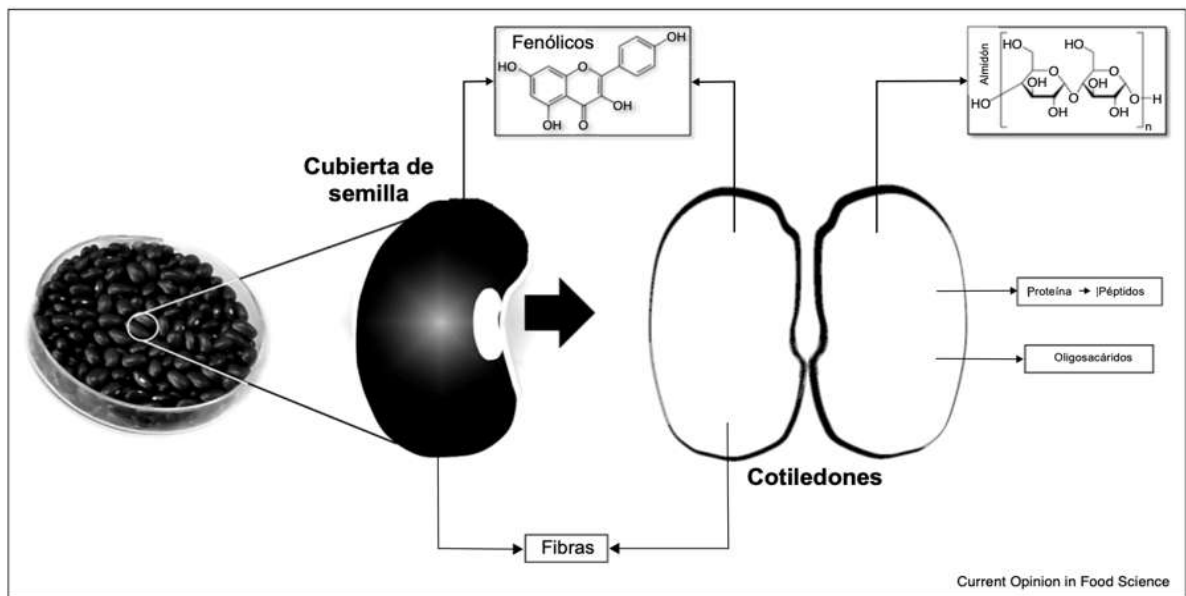


Figura 2. Compuestos químicos en semillas de frijol. La testa contiene altas concentraciones de compuestos polifenólicos, mientras que el cotiledón aporta sustancias como proteínas, fibras y carbohidratos (Basso-Los y col., 2018).

2.4 El frijol como alimento funcional

Hasta cierto punto, todos los alimentos son funcionales ya que proporcionan sabor, olor y valor nutricional. Drago y col, en el 2006 los definen como "productos alimenticios de origen animal o vegetal que se consumen en la dieta diaria que no solo proporcionan nutrientes, sino que poseen compuestos bioactivos". Sin embargo, los alimentos actualmente consumidos se analizan intensamente para descubrir sus beneficios fisiológicos, ya que pueden disminuir el riesgo de enfermedades crónicas.

La evidencia epidemiológica muestra consistentemente que una dieta rica en alimentos vegetales (incluyendo frutas, verduras, legumbres y cereales) está fuertemente asociada con la reducción en el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, como cáncer, diabetes, obesidad y enfermedades cardiovasculares (Chen y Kong., 2005; Adams y Standridge., 2006; Fernández y col., 2006).

El efecto protector de los alimentos vegetales se ha relacionado con la presencia de fitoquímicos, compuestos bioactivos no nutritivos (Liu., 2003). Los fitoquímicos más estudiados son los compuestos fenólicos y carotenoides. Los compuestos polifenólicos, incluidos los flavonoides, están presentes en una amplia gama de plantas, como las leguminosas.

Muchos estudios han asociado el consumo de frijol con la reducción del riesgo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares, la disminución del nivel de colesterol sérico y la hiperglucemia, y la prevención del cáncer de colon, mama y próstata (Hall y col., 2017; Jenkins y col., 2012; Messina., 2014; Dueñas y col., 2015; Reverri y col., 2017; Mojica y col., 2017; Singh y col., 2017).

2.5 Compuestos bioactivos en el frijol e implicaciones para la salud

Además de ser una fuente importante de proteínas, carbohidratos, fibra y minerales, los frijoles se han identificado como ricos en compuestos fitoquímicos que brindan importantes beneficios para la salud. Ejemplos de tales compuestos son ácidos fenólicos, flavonoides, flavan-3-oles, taninos condensados y antocianinas.

El frijol común contiene trazas de saponinas, estas sustancias se caracterizan por poseer una estructura que contiene una aglicona esteroidea o un triterpenoide que incluye una o más cadenas de azúcar (Ramírez-Jiménez y col., 2015). Específicamente la saponina B1 funciona como un antídoto para la intoxicación aguda causada por el plomo. Además, algunos estudios epidemiológicos han demostrado una correlación negativa con la aparición de cálculos renales (Shi y col., 2004).

Los oligosacáridos son importantes compuestos bioactivos contenidos en los frijoles. Se consideran prebióticos porque se hidrolizan en el colon y son fermentados por bacterias intestinales, produciendo moléculas como el butirato, el cual se ha reportado, induce la apoptosis, inhibe la proliferación y conduce a un fenotipo celular altamente diferenciado (Chávez-Mendoza y Sánchez., 2017).

Así mismo, estudios *in vivo* e *in vitro* han sugerido que incluso los péptidos encontrados en el frijol pueden inhibir algunas enzimas relacionadas con enfermedades crónicas (Mojica y col., 2015; Oseguera y col., 2016).

Por todo esto, el frijol por ser rico en compuestos fitoquímicos se ha considerado un alimento que brinda importantes beneficios para la salud.

2.5.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos del frijol han sido motivo de estudio recientemente, son metabolitos que poseen diferente estructura y función, y poseen un anillo aromático que generalmente contiene uno o más grupos hidroxilo (Sivaci y Duman., 2014). En función de su estructura química, son un grupo muy diverso que abarca desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina (Ávalos y Pérez-Urria., 2009).

Estos compuestos, se originan en los alimentos en una de las principales clases de metabolitos secundarios en las plantas. Son esenciales para el crecimiento y la reproducción de las plantas, actúan como protectores frente a las radiaciones ultravioleta y forman los pigmentos naturales de las plantas (p.ej., antocianinas, flavonas y flavonoles). Intervienen como reguladores de interacciones planta-microorganismos. También están implicados en procesos defensivos de las plantas como es el caso de los taninos o las furanocumarinas (isoflavonoides). Algunos fenoles también juegan un importante papel en la tolerancia al estrés (Ávalos y col., 2009).

Los compuestos fenólicos que se encuentran comúnmente en el frijol incluyen flavonoides, antocianinas, flavonoles, iso-flavonas, flavanonas, proantocianidinas y taninos, así como una amplia gama de ácidos fenólicos (Ngoh y Gan., 2016). Giusti y col., (2017) determinaron mediante HPLC-DAD los niveles de compuestos fenólicos en catorce variedades de *P. vulgaris* (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de compuestos fenólicos en la semilla del frijol.

Compuesto	Contenido [mg/kg]
Ácido gálico	3.1-7.1
Ácido clorogénico	24-239.2
Catequina	10-614.3
Epicatequina	17.7-279.2
Kaempferol-3-glucósido	24.5-1486.3
Ácido ferúlico	1.7-21.5
Ácido siríngeo	3.7-12.6

(Giusti y col., 2017)

Entre todos los frijoles evaluados solo en frijoles negros, se encontraron antocianinas en su composición (delfinidina 3,5-diglucósido y cianidina-3-glucósido) los cuales presentaron un contenido de 649,5 mg / kg. Estos compuestos están presentes en los granos comestibles en forma libre, extraídos principalmente por mezclas de agua con disolvente hidrófilo (por ejemplo, metanol al 80%). Estos pueden estar de forma conjugada insoluble, unidos a oligosacáridos y péptidos solubles (pueden liberarse por hidrólisis alcalina) y a formas insolubles que se esterifican a los polisacáridos de la pared celular (Chen y col., 2015). Sin embargo, cabe destacar que en las semillas de las leguminosas existen tres partes principales: cotiledón, cubierta de la semilla y embrión. Por ejemplo, la cubierta de la semilla del frijol con el cotiledón, el contenido fenólico total está entre 19.1 y 48.3 mg / 100 g (Luthria y Pastor-Corrales, 2006).

Los compuestos fenólicos no flavonoides como el ácido hidroxibenzoico y el ácido hidroxicinámico se encuentran en el cotiledón, mientras que los flavonoides se encuentran en el recubrimiento de la semilla (Akillioglu y Karakaya.,2010). Además, Chen y colaboradores en el 2015 demostraron que los flavonoides se

encuentran principalmente en formas libres, mientras que los ácidos fenólicos en formas conjugadas y unidas. Los autores también informaron una variación en el contenido de fenólicos libres del 7 al 59%, para los conjugados del 28 al 76%, y para los enlazados del 8 al 18%, según las variedades de frijoles.

Las estructuras fenólicas a menudo tienen el potencial de interactuar fuertemente con proteínas, debido a sus anillos hidrofóbicos bencenoides y al potencial de enlace de hidrógeno de los grupos hidroxilo fenólicos. Esto les da a los compuestos fenólicos la capacidad de actuar como antioxidantes también en virtud de su capacidad para inhibir algunas enzimas involucradas en la generación de radicales, tales como diversas isoformas del citocromo P450, lipoxigenasas, ciclooxigenasa y xantina oxidasa (Parr y Bolwell.,2002; Yang y col., 2001; Croft., 1998; Cos y col.,1988). Los compuestos fenólicos también muestran un efecto sinérgico con otros antioxidantes como el ácido ascórbico, el α -caroteno y α -tocoferol (Croft., 1998) y además, el hidrógeno puede donar un electrón (e^-), logrando estabilizar al radical libre (Mojica y col., 2015).

Las principales estructuras fenólicas presentes en el frijol se muestran en la figura 3.

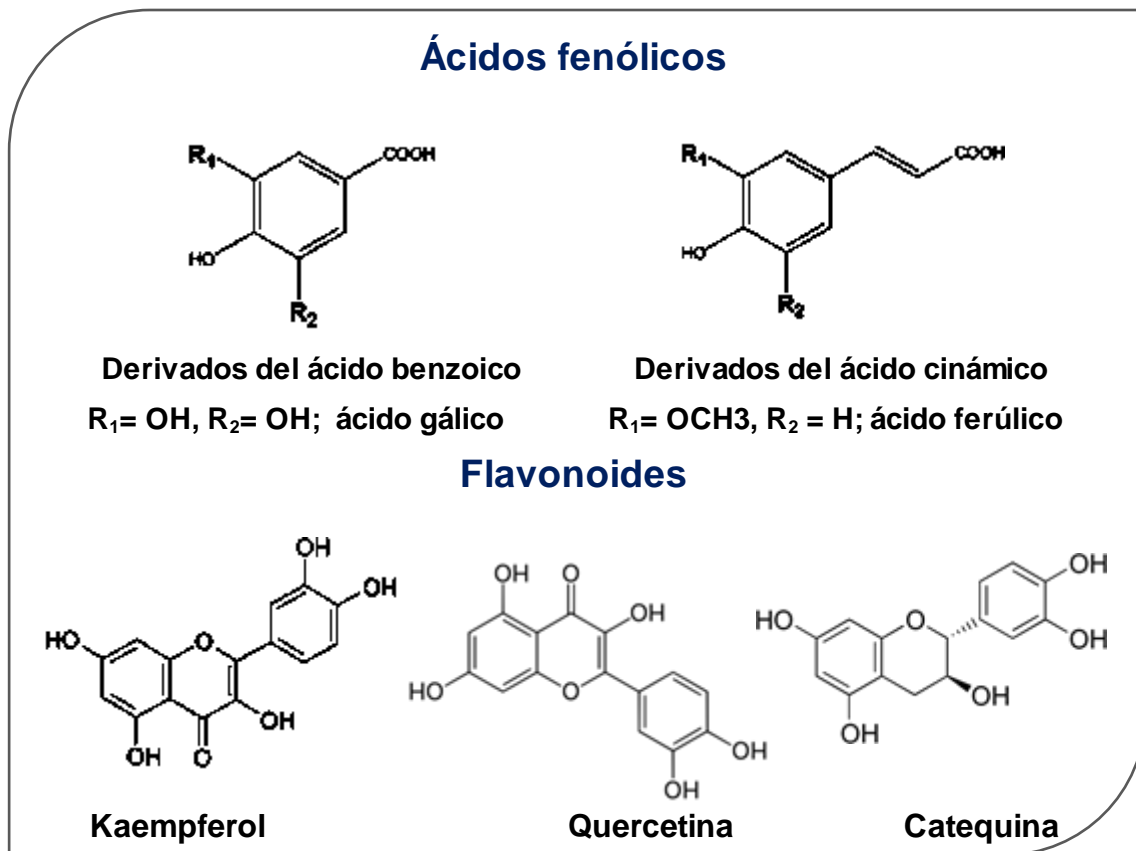


Figura 3. Principales clases de compuestos fenólicos presentes en el frijol.

(Giusti y col., 2017).

Como ya se ha mencionado anteriormente, el frijol común contiene una gran cantidad de polifenoles. Estos son compuestos bioactivos ampliamente conocidos debido a sus propiedades antioxidantes, por lo tanto, tienen un papel muy importante para disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, algunos tipos de cáncer, Alzheimer y Parkinson.

2.6 Radicales libres y estrés oxidante

Los radicales libres son átomos, moléculas o iones con electrones desapareados que son altamente inestables y activos para reacciones químicas con otras moléculas. Se derivan de tres elementos: oxígeno, nitrógeno y azufre, creando así

especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de azufre (RSS). Dentro de las diferentes ROS se encuentran el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($OH\bullet$) y anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), por mencionar algunos. Cuando el aumento del contenido intracelular de las moléculas radicales y no radicales sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula, se produce estrés oxidante, proceso que altera la funcionalidad celular y contribuye al desarrollo de enfermedades degenerativas (Avello y Suwalsky., 2006). Los principales blancos de las ROS, RNS y RSS son moléculas biológicas como lípidos, proteínas, azúcares y moléculas de ácidos nucleicos (Lü y col.,2010).

Se estima que todos los días una célula humana es atacada por el radical hidroxilo y otras especies similares, induciendo un promedio de 105 veces estrés oxidativo (Valko y col., 2004).

Como ya se mencionó, las proteínas son blancos importantes para las ROS, repercutiendo en una carbonilación, una modificación oxidativa irreversible que afecta a la función de proteínas y, a menudo se asocia con una variedad de enfermedades (Dalle-Donne y col., 2003), la medición de carbonilación de proteínas es la estrategia más comúnmente empleada para determinar daños oxidativos en *Caenorhabditis elegans* (Van Raamsdonk y Hekimi., 2010). Por otro lado, la susceptibilidad de los lípidos a la peroxidación lipídica difiere enormemente de acuerdo con su composición de ácidos grasos, tras la oxidación por ROS, se inicia

una reacción en cadena de peroxidación de lípidos. Estos productos de peroxidación lipídica sirven como marcadores de daño oxidativo (Halliwell y Chirico., 1993). Además, el daño oxidativo al ADN se asocia con un aumento de la tasa de mutagénesis y, por lo tanto, se asocia con el cáncer, el envejecimiento y diversas enfermedades neurodegenerativas (Wu y col., 2004). La lesión más frecuente para la cuantificación del daño oxidativo en el ADN es la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG).

La dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidante, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal, lo que está llevando a las industrias alimentarias a diseñar alimentos funcionales que supongan un aporte extra de antioxidantes naturales (García., 2005).

Para el estudio de la actividad antioxidante de extractos vegetales y su efecto protector ante un estrés oxidante se han utilizado diversos organismos, tales como, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Bauer y col., 2004), el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Cheng y col., 2014) y mamíferos como *Rattus norvegicus* de la cepa Wistar (Peña-Montes., 2019).

2.7 *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo

El nematodo *C. elegans* ha demostrado ser un potente organismo modelo en el estudio de varios procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, el envejecimiento y una serie de condiciones patológicas (Brenner, 1974; Kenyon y col., 1993; Rodríguez y col. 2013., Felix y Barkoulas, 2012; Antoshechkin y Sternberg, 2007). *C. elegans* ofrece varias ventajas experimentales incluyendo el bajo costo, el mantenimiento directo, la capacidad de escala y su transparencia, que permite la microscopia. Además, tienen un ciclo de vida corto (\pm 25 días a 20 ° C) (Figura 4) que le proporciona una ventaja clave en los estudios de envejecimiento. Además, se pueden distinguir muchos tipos de células diferentes en *C. elegans*, incluyendo neuronas, células musculares, intestino y células excretoras (Antoshechkin y Sternberg, 2007) que han sido bien caracterizadas. Otra característica ventajosa de este organismo es la disponibilidad de un mapa genético detallado y su genoma completamente secuenciado (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

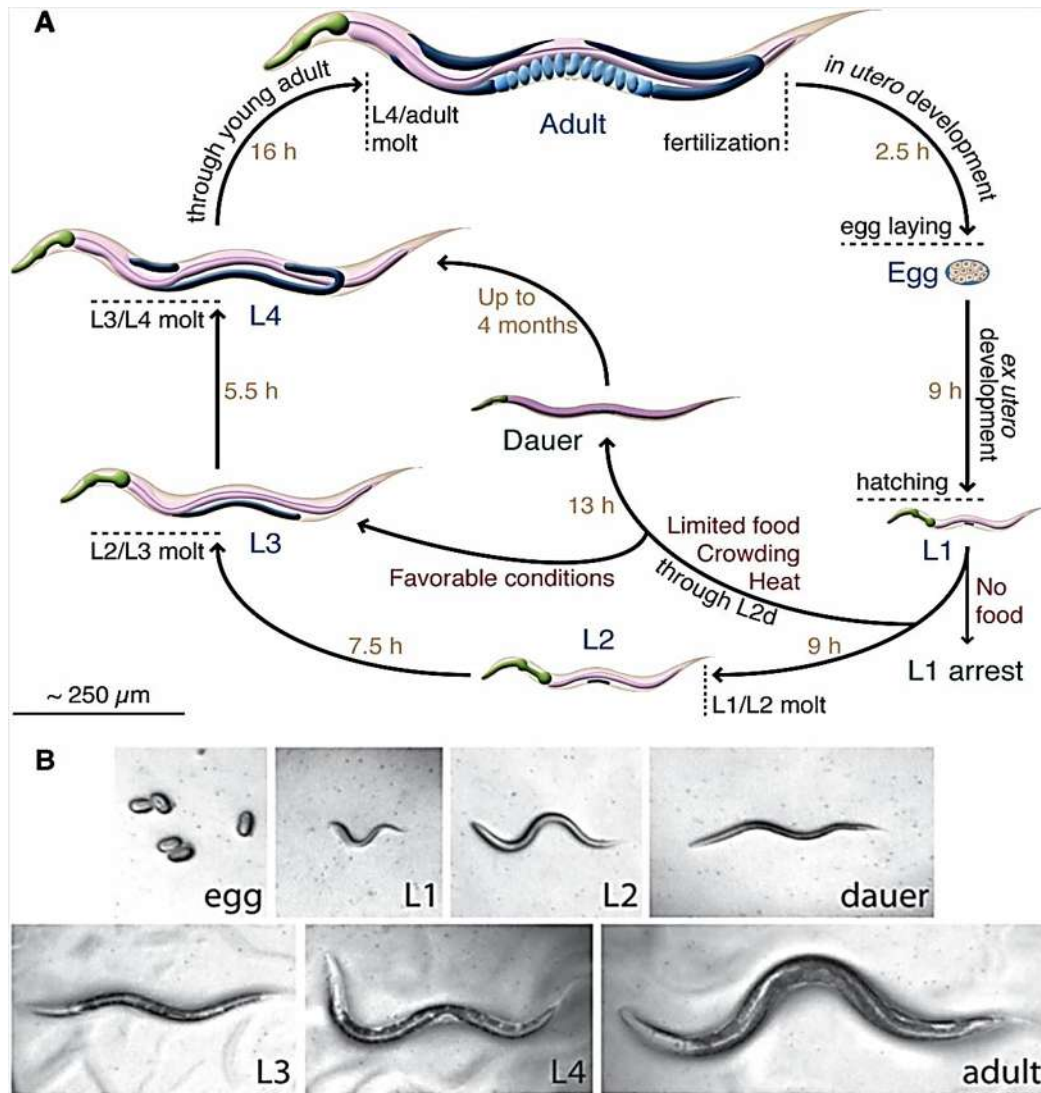


Figura 4. Ciclo de vida de *C. elegans* a 25° C. Los nematodos se dibujan aproximadamente a escala. Modificado de Altun y Hall (2012). B. Micrografías de huevos puestos, estadios larvales y adultos. Modificado de Fielenbach y Antebi (2008).

2.8 La glucosa como agente oxidante para inducir la producción de ROS en *C. elegans*

Se sabe que las dietas con alto contenido de glucosa generan especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen especies de oxígeno radicales y no radicales como HO•, O₂^{•-} y H₂O₂, que puede dañar los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y podría conducir a la muerte celular (Ray y col., 2012). En este contexto, se ha sugerido que el estrés oxidante es un factor relacionado con el desarrollo de varias enfermedades, como la obesidad y la diabetes (Bonomini y col., 2015; Yu y col., 2016). Es importante mencionar que debido al incremento de la entrada de glucosa, la célula tiene ahora una presión metabólica inducida por alta concentración de sustrato para alimentar en exceso a la cadena respiratoria pero sin un incremento correspondiente y proporcional en la necesidad de ATP en la célula, lo que hace que el potencial proton-motriz se acumule en exceso y la cadena respiratoria pueda generar más O₂^{•-} que en condiciones de óptimo acople entre la formación de ATP y la función de la cadena respiratoria (Calderón y col., 2003).

Además, *Caenorhabditis elegans* se ha utilizado en estudios de toxicidad inducida por glucosa (Mondoux y col., 2011; Choi y col., 2011; Schlotterer y col., 2009). Estos informes han documentado que concentraciones altas de glucosa afecta el crecimiento, la fertilidad, el envejecimiento y la esperanza de vida. No obstante, estos estudios se han realizado bajo una amplia gama de condiciones experimentales, es decir, diferentes concentraciones de glucosa utilizadas, diversos regímenes de administración y tiempos de exposición variados, lo que hace difícil comparar los resultados obtenidos.

2.9 Estrategias de defensa frente al estrés en *C. elegans*

Como se ha mencionado, las especies reactivas del oxígeno están implicadas en el daño celular. Sin embargo, existen dos grupos principales de antioxidantes para contrarrestar las ROS, se reconocen, a saber, los antioxidantes enzimáticos y los

no enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos incluyen enzimas de fase 2 (Becker y col., 2004; Ratman y col., 2006; Dinkova y col., 2008; Lassen y col., 2008) y los antioxidantes no enzimáticos se pueden dividir en dos categorías: los antioxidantes exógenos y los endógenos. Los antioxidantes exógenos son solubles en agua (por ejemplo, ácido ascórbico [vitamina C] y compuestos polifenólicos) o solubles en lípidos (por ejemplo, tocoferoles [vitamina E] y carotenoides) productos naturales que están abundantemente presentes en hierbas, especias, frutas y vegetales (Ndhlala y col., 2010, Crozier y col., 2010, Smirnoff y col., 2010), mientras que los antioxidantes endógenos se producen en nuestro cuerpo y son, por ejemplo, glutatión, coenzima Q (ubiquinol), ácido α -lipoico, ácido úrico, ferritina y tioredoxina (Dinkova y col., 2008; Meister y col., 1988).

Al igual que en los mamíferos, el nematodo *C. elegans* tiene sistemas de defensa contra el estrés bien definidos para la protección de compuestos tóxicos (Van Raamsdonk y Hekimi., 2010). Estas vías de señalización, y sus modos de regulación, comparten la conservación evolutiva con sus homólogos de mamíferos (Tissenbaum., 2015). Por lo tanto, *C. elegans* ofrece un modelo adecuado para analizar la red reguladora de genes involucrada en la expresión de genes de respuesta al estrés. En los últimos años, se ha prestado mayor atención a los factores de transcripción altamente conservados DAF-16 / FOXO y SKN-1 / Nrf2 debido a sus papeles asociados en respuesta al estrés oxidante y la extensión de la vida útil en *C. elegans* (Kenyon y col., 1993, Murphy y col., 2003, An y Blackwell 2003., Blackwell y col., 2015). Estos factores regulan la transcripción de genes de desintoxicación esenciales como *sod-3* y *gst-4* para promover la resistencia al estrés oxidante (Oliveira y col., 2009, Wang y col., 2010; Shore y Ruvkun., 2013).

2.9.1 Moléculas de bajo peso molecular

Sistema glutatión

El glutatión (GSH) es un importante antioxidante tripéptido no proteínico constituido por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina, y su concentración intracelular es un indicador de estrés oxidante. Dentro de las células, el GSH existe en dos formas diferentes: la forma de sulfhidrilo reducido (GSH) y el disulfuro de glutatión (GSSG), forma oxidada. Las especies reactivas de oxígeno son neutralizados por GSH a través de una cascada concertada de desintoxicación, estos mecanismos involucran glutatión peroxidasas (GPx), glutatión S-transferasas (GST) y glutatión reductasa (GR) (Halliwell., 1996; Rossi y col., 2002). El glutatión es fundamental en procesos de detoxificación celular y la relación entre glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) contribuye al estatus redox de la célula.

2.9.2 Proteínas y enzimas antioxidantes

Está claro que un exceso de ROS contribuye a producir daños a diferentes niveles, por lo que el organismo cuenta con mecanismos de defensa antioxidante endógenos, principalmente proteínas y enzimas, para eliminar el exceso de ROS producido (Ďuračková, 2014). Las moléculas antioxidantes son, de hecho, moléculas nucleófilas y reductoras capaces de reaccionar con oxidantes, que generalmente son electrófilos, dándoles uno o dos electrones (Espinoza-Diez, 2015).

Superóxido dismutasa (SOD)

La cadena transportadora de electrones favorece la producción principalmente de radical superóxido. La SOD cataliza la dismutación del radical superóxido a H_2O_2 que posteriormente puede ser transformado a agua por la acción de otras enzimas como catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y/o peroxirredoxinas (Prxs)

(Fridovich, 1995). En *C. elegans*, cinco genes codifican a la Superóxido dismutasa: *sod-1* a *sod-5*. SOD-1, SOD-4 y SOD-5 son SOD que exhiben actividad de unión al ión Cobre y Zinc (Cu/Zn), mientras que SOD-2 y SOD-3 son SOD que exhiben actividad de unión al ión Manganeso (Mn) (Jensen y Culotta, 2005; Yang y col., 2007; Doonan y col., 2008). SOD-1 en sí mismo contribuye con casi el 80% de la expresión total de ARNm de SOD, así como con el 80% de la actividad total de SOD en *C. elegans* (Doonan y col., 2008). El hecho de que el control de los niveles de superóxido y peróxido sean distribuidas en cinco SODs diferentes con diferentes propiedades, distribuciones subcelulares y posiblemente distribuciones tisulares hace que *C. elegans* sea un modelo particularmente bueno para explorar la variedad de roles biológicos de las SODs.

Catalasa (CAT)

El peróxido de hidrógeno se forma por la dismutación del radical superóxido y también en la reacción de algunas oxidasas. La catalasa cataliza la descomposición del H₂O₂ en agua y oxígeno. La mayoría de estas enzimas son homotetrámeros con un grupo hemo en cada subunidad. El genoma de *C. elegans* contiene una disposición en tándem de tres genes que codifican para la catalasa (*ctl-1*, *ctl-2*, y *ctl-3*). CTL-2 es una catalasa peroxisomal, y es responsable de ~80% de la actividad total de la catalasa. También tiene un pH más bajo óptimo para la actividad y mayor actividad peroxidasa que las catalasas peroxisomales de mamífero. Gran parte de las secuencias de genes *ctl-1* y *ctl-3* son 100% idénticos (Wormbase).

Glutación peroxidasa (Gpx)

Se encuentra localizada en el citosol y la mitocondria. Su importancia reside en que es considerada como el principal sistema antioxidante en niveles bajos de estrés oxidativo (Benner y col., 2011). El término glutación peroxidasa (GPx) se asocia a una familia de múltiples isoenzimas (GPx1–8) que cataliza la reducción de H₂O₂ a agua utilizando glutación como donador de electrones (Margis y col.,

2008; Sena y Chandel., 2012). En *C. elegans*, de la misma forma que en humanos, existen diversos genes que codifican para GPx (gpx 1-8) (Sakamoto y col., 2014).

2.9.3 Factores de transcripción implicados en el estrés oxidante

Ruta de la insulina y factor IGF-1

Se ha demostrado que la vía de señalización de insulina / IGF-1 regula la vida útil de muchos organismos (Barbieri y otros, 2003; Katic y Kahn, 2005; Kenyon, 2005). En esta vía de señalización, los péptidos similares a la insulina se unen a su receptor (DAF-2/IGF-1), reclutando un sustrato receptor de insulina. Esto activa el fosfatidil inositol-3-OH quinasa AGE-1 / PI3K, aumentando el nivel de fosfatidil inositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3), que a su vez activa una cascada de quinasa, formada por 3-fosfoinositido dependiente de la proteína quinasa 1 (PDK-1), proteína quinasa B (AKT-1 / -2) y quinasa-1 inducible por suero y glucocorticoides (SGK-1). Esta cascada inactiva por fosforilación el factor de transcripción DAF-16 / FOXO, lo que resulta en la translocación de DAF-16 / FOXO desde el núcleo al citosol. La proteína quinasa activada por AMP (AMPK / AAK-2) también es capaz de fosforilar DAF-16 / FOXO (Altintas y col., 2016) (Figura 5).

En condiciones normales, la reducción de la actividad de esta vía, por ejemplo, mediante la mutación del gen del receptor de insulina / IGF-1 (*daf-2*, en *C. elegans*) (Kimura y col., 1997), disminuye el proceso de envejecimiento y duplica la esperanza de vida (Kenyon y col., 1993). Este período de vida prolongado requiere la actividad del factor de transcripción FOXO/ DAF-16 y el factor de transcripción de choque térmico HSF-1 (Henderson y Johnson, 2001; Hsu y col., 2003; Kenyon y col., 1993; Lee y col., 2001; Lin y col., 1997, 2001; Morley y Morimoto, 2004; Ogg y col., 1997). Además, DAF-16 y HSF-1 contribuyen a la longevidad de los nematodos WT cultivados con bacterias en condiciones estándar de laboratorio, ya que reducir la actividad de los genes *daf-16* o *hsf-1*

acelera la tasa de envejecimiento del tejido y acorta la vida útil (Garigan y col., 2002; Herndon y col., 2002; Kenyon y col., 1993; Lin y col., 2001)

Adachi y col., 1998 demostraron que los nematodos con una mutación en el gen *age-1* tenían una menor concentración de proteínas carboniladas y que los niveles de éstas no aumentaban con la edad, en comparación con lo que ocurría en la cepa silvestre. Los mutantes *age-1* no sólo eran resistentes a estrés oxidante inducido químicamente, sino también a otras formas de estrés, como estrés térmico (Lithgow y col., 1995), radiación UV (Murakami y Johnson, 1996) y exposición a metales pesados (Barsyte y col., 2001), lo que también contribuiría a una mayor longevidad.

Si bien, no hay estudios que demuestren la participación de los compuestos fenólicos del extracto de *Phaseolus vulgaris* en esta vía de señalización, solamente las investigaciones se han enfocado en estudiar compuestos de manera individual, como los flavonoides, actuando como antioxidantes indirectos. Pietsch y colaboradores en el 2009, demostraron que el aumento en la esperanza de vida por una exposición con quercetina es independiente del factor transcripcional DAF-16/FOXO en *C. elegans*, pero si es dependiente del receptor *daf-2* y de *age-1*, contrario al efecto que se había reportado previamente, en donde la quercetina aumentó la vida útil mediado por la acción DAF-16 (Henderson y Johnson, 2001; Murphy et al., 2003).

En este mismo contexto, Büchter y col., (2013) informaron que para mejorar la vida útil en *C. elegans*, la miricetina requiere la presencia de DAF-16, ya que se observó una mayor traslocación de DAF-16 al núcleo, sobreexpresando la superóxido dismutasa mitocondrial (*sod-3*).

En *C. elegans* DAF-16 es el ortólogo a FOXO en mamíferos y se activa en respuesta a altos niveles de estrés oxidante controla la transcripción de varios genes antioxidantes y chaperones que retrasan el envejecimiento (Mukhopadhyay y col., 2006) donde activan un conjunto de genes que median el estrés oxidante.

DAF-2 es ortólogo al receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) y AGE-1 es un ortólogo de la PIK3 humana (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa).

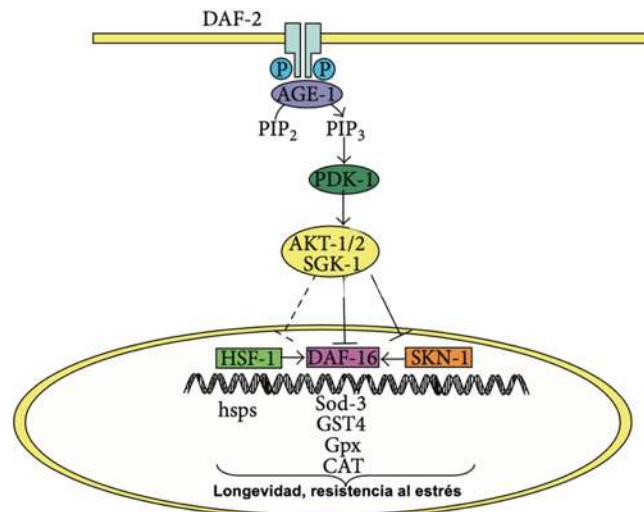


Figura 5. Vía de señalización de la insulina en *C. elegans*. Esquema simplificado de la IIS-IGF-1, (Koch y col., 2014).

Factores relacionados con el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) y el elemento de respuesta antioxidante (ARE)

Uno de los mecanismos de defensa antioxidante de la célula consiste en la inducción coordinada de genes que codifican proteínas de fase II. Todas las secuencias de este tipo de proteínas detoxificantes coinciden en la existencia de una región específica de unión denominada ARE (Antioxidant Response Element). El elemento ARE es una región amplificadora (“enhancer”) con una secuencia definida como 5'-TGACnnnGCA-3'. Los factores relacionados con el factor nuclear eritroide-2 (NF-E2) se conocen como Nrf (Nuclear Factor Erythroid 2-related factors) y se han relacionado con su respuesta a elevados niveles de estrés oxidante. En condiciones normales, la ruta de Nrf2 está suprimida mediante el

secuestro de Nrf2 en el citoplasma a través de la interacción con la proteína de unión a actina Keap1. Cuando el complejo Nrf2/Keap1 interactúa con ROS o productos de oxidación de lípidos, Keap1 sufre un cambio conformacional y libera Nrf2 (Kaspar et al., 2009; Dinkova-Kostova et al., 2002), de esta forma Nrf2 se transloca al núcleo donde puede interactuar con ARE y regular la expresión de múltiples genes (Jaiswal, 2004; Kaspar et al., 2009), promoviendo la síntesis de proteínas necesarias para la síntesis de glutatión y otros electrófilos detoxificadores (Nioi et al., 2003) (figura 6). Se ha descrito que algunos compuestos bioactivos pueden igualmente activar el complejo Nrf2/Keap1 precisamente a través de la fosforilación inducida por ERK o PI3K. En *C. elegans*, el factor de transcripción SKN-1 es el ortólogo al Nrf-2 en mamíferos y, de la misma forma, se activa en respuesta a altos niveles de estrés oxidante.

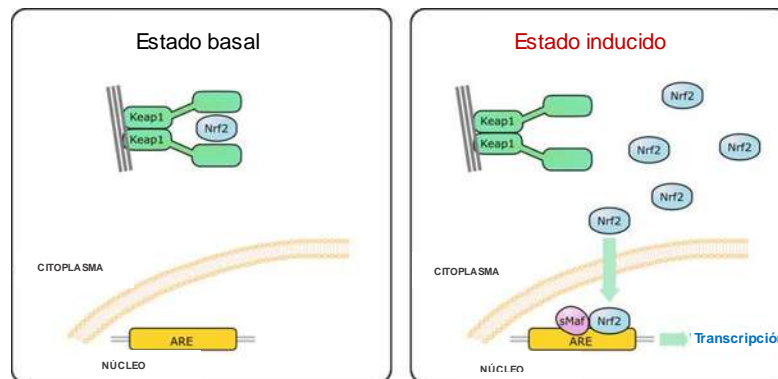


Figura 6. Vía Keap1-Nrf2. Keap1 secuestra a Nrf2 en el citoplasma uniéndose al citoesqueleto de actina. En estado de estrés oxidante se lleva a la liberación de Nrf2, lo que permite que el factor de transcripción se traslade al núcleo y active la expresión de genes citoprotectores (Baird y col., 2011).

En este contexto, el frijol no ha sido estudiado ya que los autores se enfocan específicamente a su actividad antioxidante directa, pero no se han analizado la inducción de estas vías de señalización que están involucradas en la longevidad y la resistencia al estrés oxidante.

2.10 Capacidad antioxidante del frijol

El frijol común tiene una capacidad antioxidante debido a la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides y taninos, esto se debe principalmente a la propiedad reductora de los polifenoles, ya que juegan un papel muy importante durante la neutralización o eliminación de radicales libres, así como la quelación de los metales de transición, lo que inhibe tanto la iniciación como la propagación de los procesos oxidativos. Los productos intermediarios formados como consecuencia de la actividad antioxidante fenólica son relativamente estables debido a la resonancia dentro de los anillos aromáticos contenidos en sus estructuras (Huber y col.,2016).

Halliwel.,2007 definió un antioxidante como “cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula diana”. En el mismo año Khlebnikov y col, definieron los antioxidantes como "cualquier sustancia que elimine directamente las ROS o que actúe indirectamente para regular al alza las defensas antioxidantes o para inhibir la producción de ROS". Otra propiedad que debe tener un compuesto para considerarse un antioxidante es la capacidad, después de captar el radical, de formar un nuevo radical que sea estable mediante enlaces de hidrógeno intramoleculares en la oxidación posterior (Halliwel, 1990).

Según Akillioglu y Karakaya en el 2010, la actividad antioxidante del frijol común aumenta después de la digestión. Esto puede deberse a la mayor solubilidad de los polifenoles, así como a la digestión de proteínas y almidones, favoreciendo la liberación de compuestos fenólicos debido al ambiente ácido, prevaleciendo en el estómago y la hidrólisis mediada por enzimas en el duodeno.

En la actualidad, existe un acuerdo generalizado en relación a que algunos antioxidantes sintéticos como el Butilhidroxianisol (BHA) y Butilhidroxitolueno (BHT) necesitan ser reemplazados por antioxidantes naturales debido a sus potenciales riesgos para la salud y toxicidad (Rincón., 2011).

Rubio-Landa., (2017) propuso una técnica para evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extractos de frijol en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*

sometido a estrés oxidativo, utilizando como agente oxidante el peróxido de hidrógeno y altas concentraciones de glucosa. Inicialmente se realizó un escrutinio de los extractos de variedades de frijol criollas y comerciales y se evaluaron sus actividades antioxidantes *in vitro* por distintos métodos (DPPH, ABTS y FRAP), destacando las variedades comerciales para la neutralización de los radicales DPPH y ABTS, sin embargo, para el método FRAP las variedades criollas, específicamente el Escumite, mostró la mayor capacidad antioxidante con respecto a las comerciales, esto se vio reflejado en la supervivencia de *C. elegans* en el cual se aumento la supervivencia a partir del día 20 en medio de cultivo sin glucosa lo cual indica un efecto positivo en el tiempo de vida en el nemátodo en condiciones normales de crecimiento. De manera interesante, en condiciones de estrés oxidante, la supervivencia de la población de nematodos incrementó un 40% en presencia del extracto de frijol Escumite en comparación con los nemátodos en condiciones de estrés con glucosa, el cual contenía solamente glucosa a los 20 días del ensayo. Por lo anterior, se concluyó que los compuestos fenólicos encontrados en el extracto del frijol de la variedad criolla Escumite (*P. acutifolius*) presentó la mejor actividad antioxidante *in vivo*.

Por otro lado, Aregueta y col., (2018) encontraron que el extracto del frijol negro (*P. vulgaris L*) y fracción de Flavonoides aislados del extracto tenían propiedades citotóxicas comparables a la ciclofosfamida, una molécula ampliamente utilizada para la terapia del cáncer. Además, estos extractos parecían ser específicos para las células tumorales, ya que eran casi inocuos para las células no cancerosas (células NIH-3T3 y VERO). Otra observación importante en este estudio fue que la administración de los extractos en un modelo de xenoinjerto de linfoma aumentó la supervivencia de los ratones que fueron suministrados con el extracto.

En la actualidad aún no existen reportes que demuestren el mecanismo exacto de la actividad antioxidante que hay en la sinergia de los compuestos fenólicos presentes en la semilla del frijol. Cabe mencionar que, una mezcla de antioxidantes como ocurre en los alimentos, ha sido poco estudiada (Rincón., 2011).

III. JUSTIFICACIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una semilla comestible económicamente importante, su consumo ha sido una parte integral de la dieta en todo el mundo, principalmente en México y además es considerado un alimento funcional.

Se ha demostrado que contienen una gran cantidad de sustancias bioactivas, como los polifenoles que ejercen una actividad antioxidante, inhibiendo o retardando el proceso de oxidación de biomoléculas como los lípidos, proteínas y ADN. Además se incluyen efectos antimicrobianos, antihiper glucémicos, anticancerígenos, atenuación del estrés, ansiedad y depresión. Sin embargo, esta leguminosa ha sido poco estudiada referente a su actividad antioxidante *in vivo* ya que el enfoque se encuentra principalmente en las berries que tienen un alto contenido de compuestos fenólicos incluyendo flavonoides, pero su consumo resulta ser muy limitado por sus elevados costos siendo este aproximadamente 8 veces más costoso que el frijol.

Se ha demostrado en pruebas *in vitro* que los compuestos fenólicos presentes en la semilla del frijol son los principales responsables de tener un efecto protector ante los radicales generados en el estrés oxidante, destacando las variedades pintas del frijol criollo y comercial, sin embargo, no se conocen los efectos precisos a través de los cuales intervienen en la protección *in vivo* ya que esto no ha sido esclarecido, lo cual potenciaría su uso como un alimento con fines terapéuticos y además contribuiría a la promoción de su consumo y a la recuperación de elementos tradicionales en nuestra alimentación.

IV. HIPÓTESIS

Los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo previenen del estrés oxidante a *Caenorhabditis elegans* y aumentan su longevidad a través de la modulación de la actividad o expresión de genes asociados a este fenómeno.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los compuestos fenólicos del frijol en la resistencia al estrés oxidante y la longevidad en *Caenorhabditis elegans* a través de genes asociados a este fenómeno.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Determinar el efecto de los compuestos fenólicos del frijol en la longevidad de *C. elegans* bajo estrés oxidante.
- II. Analizar los niveles de oxidación de biomoléculas en *C. elegans* bajo estrés oxidante en presencia de los compuestos fenólicos del frijol.
- III. Analizar el efecto del extracto metanólico del frijol sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en *C. elegans*.
- IV. Determinar el efecto del extracto del frijol sobre la expresión de genes marcadores del estrés oxidante.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Muestras de frijol

Se utilizaron semillas del frijol pinto criollo (*Phaseolus acotifolius*) y frijol pinto comercial (*Phaseolus vulgaris*), seleccionando las semillas que no presentaran daño en su morfología.

6.2. Cepas de *C. elegans* y condiciones de cultivo

Las cepas de *Caenorhabditis elegans* fueron adquiridas en el Centro de Genética *Caenorhabditis* (CGC) de la Universidad de Minnesota, St. Paul.

- Silvestre Bristol (N2),
- TJ356 *z1356* [*daf-16::daf-16a/b::GFP* + *rol-6 (su1006)*],
- CF1038 *daf-16 (mu86)*,
- LD1 [*skn-1 b/c::daf-16a/b::GFP+rol-6 (su1006)*],
- AM263 *rmls175* [*unc-54-p::Hsa-sod-1(WT)::YFP*],
- MQ1766 *sod-2 (ok1030) I; sod-5 (tm1146) sod-1 (tm783) II; sod-4 (gk101) III; sod-3 (tm760) X*,
- GA800 *wuls151* [*ctl-1(+)* + *ctl-2(+)* + *ctl-3(+)* + *myo-2p::GFP*],
- XY1054 *cep-1 (lg12501)*,
- CL2166 *dvl19* [(pAF15) *gst-4p::GFP::NLS*] III,
- GR1339 *daf-2 (e1370)* III,
- TJ401 *age-1 (hx546)*

Los nematodos se cultivaron en placas NGM sembradas con *E.coli* OP50 incubando a 18°C, excepto la cepa TJ401 *age-1 (hx546)* que fue incubada a 15°C. Los nematodos se sincronizaron con una solución de hipoclorito de sodio (Modificado de Shapira y col., 2008), una condición en la que solo los huevos pueden sobrevivir, los cuales se lavaron con una solución buffer M9 (NaCl,

KH₂PO₄, Na₂HPO₄, MgSO₄ 1M). Después de la sincronización, los nematodos se sembraron en una placa NGM (condición control), en placas suplementadas con glucosa, extracto del frijol o una mezcla de glucosa y extracto de frijol y se alimentaron con *E. coli* OP50 hasta que alcanzaron la etapa larvaria L4. Se añadió glucosa (Meyer) a la mezcla de agar y sales del medio NGM para obtener una concentración de glucosa de 80 mM y una concentración de compuestos fenólicos de 30 µg/mL, suplementadas además con Fluorodeoxiuridina (FUdR) 0.6 mM (Sigma F0503), comúnmente utilizado para esterilizar a *C. elegans* con el fin de mantener una población de nematodos en envejecimiento sincronizado, sin embargo, no se utilizó para las pruebas de actividad enzimática. Por otro lado, los ensayos con Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) se llevaron a cabo en microplacas de 96 pozos en M9 hasta obtener una concentración de H₂O₂ de 15 mM y de fenoles totales de 50 µg/mL.

6.3. Preparación y extracción metanólica de muestras

Para la extracción de compuestos fenólicos se molieron 10 g de cada semilla de frijol en un molino de café hasta obtener un polvo fino. Una vez molida, las muestras se extrajeron adicionando 10 mL de una solución de metanol:HCl (50:1 % v / v), posteriormente se colocaron 24 h en agitación/oscuridad a temperatura ambiente, en una plataforma multi-posición (Lab-Tech, South Korea, Seúl.), el procedimiento se repitió dos veces más con cambio de solución cada día. Después de una filtración en oscuridad con papel filtro WhatmanTM No.1 se concentró la solución metanólica en un rotavapor RV 10 digital (IKA® , Wilmington, USA) a una temperatura de 65°C. El extracto obtenido fue recuperado en 3 mL de agua destilada y almacenado a 4°C en viales color ámbar hasta su uso.

6.4. Cuantificación de compuestos fenólicos

La cuantificación de compuestos fenólicos se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (Wan y col., 2011) para placa de 96 pozos. Se incubaron 2 µL de la

muestra y 50 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.2 N (Sigma F9252) durante 4 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, añadiendo posteriormente 40 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) (7.5%) y agua destilada hasta tener un volumen final de 250 μL en cada pozo de la placa. Se incubó durante 90 minutos en oscuridad y se leyeron en un lector de microplacas UV-Vis (EPOCH, BioTek, EE.UU). El contenido de fenoles totales se calculó mediante una curva estándar de ácido trihidroxibenzoico (ácido gálico) (Sigma G7384).

6.5. Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro*

Las muestras se normalizaron a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fenoles totales para cada una de las pruebas. La actividad antioxidante se expresó en μM de equivalentes de TROLOX/ mL (μM de TROLOX/ mL). Se adaptaron los métodos para microplacas de 96 pozos, y la actividad antioxidante se calculó mediante una curva estándar de Trolox (Sigma 238813).

6.5.1. Método DPPH

Para la determinación de la capacidad antioxidante se utilizó un método colorimétrico que se basa en la reducción del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), cambiando su color de púrpura a amarillo en presencia de antioxidantes, y se usa ampliamente como un estudio preliminar (Moon y Shibamoto, 2009).

El DPPH 10 mM (Sigma 09132) se disolvió en metanol 80 % hasta una concentración final de 0.1 mM. Enseguida, se añadieron 10 μL de la muestra normalizada y se adicionaron 140 μL del radical DPPH \bullet , se incubó durante 2 minutos/oscuridad a temperatura ambiente y se leyeron en un espectrofotómetro de microplacas (EPOCH, BioTek, EE.UU) a 517 nm, de acuerdo a Brand y col., 1995.

6.5.2. Método ABTS

Este método es un ensayo colorimétrico en el que el radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) se decolora en presencia de antioxidantes (Moon and Shibamoto, 2009). Inicialmente, se realizó una dilución del radical catiónico ABTS⁺ 14 mM (Roche) con persulfato de potasio 2.6 mM (Sigma 216224) en partes iguales y se llevó a agitación durante 90 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a 739 nm y se ajustó con metanol hasta una absorbancia final de 0.8. A continuación, se añadió el extracto normalizado y la solución preparada previamente en una microplaca, se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente/oscuridad y se leyó la absorbancia a 739 nm en un lector de microplacas (EPOCH, BioTek, EE.UU), de acuerdo a Re y col., 1999.

6.5.3. Método FRAP

Este es un ensayo colorimétrico que mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el complejo azul intenso del complejo Fe (III)- Tripiridiltriazina férrica a su forma ferrosa, cambiando así su absorbancia, se realizó de acuerdo a Benzie y Strain, 1996. Se preparó una solución de acetato de sodio (C₂H₃NaO₂) 300 mM, Cloruro de hierro (FeCl₃) 20 mM, y 2,4,6-Tri(2-pyridil)-s-triazina (TPTZ) (Sigma) 10 mM en una proporción de 10:1:1, se calentó a 37°C en oscuridad durante 10 minutos. Después, se añadieron en cada pozo de la placa 10 µL de muestra normalizada y 190 µL de la solución preparada anteriormente, se incubó durante 20 minutos/oscuridad y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 593 nm en un espectrofotómetro UV-Vis para microplacas (EPOCH, BioTek, EE.UU).

6.6 Sincronización de *C. elegans*

La sincronización de *Caenorhabditis elegans* se realiza con el fin de eliminar la variación en los resultados debido a las diferencias de edad y se realizó de acuerdo con Shapira y col., (2008) con ligeras modificaciones. Los nematodos

crecieron aproximadamente 5 días a 25°C, para tener una población adulta con alta cantidad de huevos. Después se lavaron tres veces con buffer M9 y se añadió una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 10 N, se agitó rigurosamente durante 4 minutos y se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto y se lavó tres veces con buffer M9, donde posteriormente se agregó Fluorodeoxiuridina (FUdR) a una concentración de 0.6 mM para inhibir su reproducción. Finalmente, se dejaron incubar los huevos durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación, una vez eclosionados, se pasaron a placas nuevas de NGM con alimento.

6.7. Ensayos de resistencia a estrés oxidante y longevidad en

C. elegans

Los nematodos L1 sincronizados se convirtieron en adultos jóvenes en NGM, luego se sembraron 20 nematodos en las condiciones que fueron suplementadas con 0 (control), 80 mM de glucosa, 30 µg/mL de fenoles totales y la mezcla que contenía glucosa y fenoles, ambos con las mismas concentraciones dichas anteriormente. El porcentaje de sobrevivencia de los nematodos fue evaluado diariamente. Los nematodos fijados a la pared de la placa de Petri no se tomaron en cuenta. Los ensayos de esperanza de vida se realizaron por sextuplicado. La glucosa se utilizó como un agente oxidante para inducir estrés en los nematodos.

Para la inducción de estrés oxidante químicamente con Peróxido de Hidrógeno, se colocaron 20 nematodos, cuando alcanzaron la etapa adulta, en medio M9 suplementado con 0 (control) y 50 µg/mL de fenoles totales. A continuación, se incubaron a 18°C durante 48 horas/oscuridad, transcurrido ese tiempo, transcurrido ese tiempo se realizaron lavados con M9 y se agregaron concentraciones de 15 mM de H₂O₂. El porcentaje de sobrevivencia fue evaluado cada hora por un tiempo total de 6 horas. Los nematodos que no se movieron después de estímulos repetidos se consideraron muertos.

6.8. Obtención de lisados de nematodos

Los nematodos de la etapa L4 se recogieron y se lavaron tres veces con solución tampón salina de fosfatos (PBS, pH 7.4) (KH_2PO_4 , K_2HPO_4) para eliminar todas las bacterias. Después los nematodos se resuspendieron en 500 μL de PBS y fueron sonicados en hielo con un sonicador 250 de la marca Branson con micropunta (en 6 ciclos de 10 seg, amplitud=60, pulso=3), se centrifugaron a 10,000 rpm a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue recolectado y una alícuota fue utilizada para la cuantificación de proteína por el método de Biuret.

6.9 Cuantificación de fenoles totales en *Caenorhabditis elegans*

Cuando los nematodos alcanzaron su etapa larvaria L4, se expusieron durante 48 horas a los tratamientos con una concentración de compuestos fenólicos de 15, 20, 30 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después de realizar la lisis de cada una de las concentraciones, la suspensión de nematodos se añadió a una microplaca de 96 pozos y se siguió el procedimiento para la cuantificación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu (Wan y col., 2011), descrito previamente en el apartado 6.4. Para calcular los fenoles totales intracelulares se realizó la cuantificación de proteínas para normalizar los valores obtenidos.

6.10 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno intracelular

Las especies reactivas de oxígeno se determinaron mediante el método de la diclorofluoresceína-diacetato ($\text{H}_2\text{-FC-DA}$), colorante no fluorescente permeable a la membrana. Después de la exposición en los tratamientos durante 48 horas a 20°C, los nematodos se lavaron con buffer M9 (NaCl , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 1M) tres veces para eliminar la bacteria, después se adicionaron 50 μL de la suspensión de nematodos y se dejó equilibrar a temperatura ambiente. Inmediatamente, se añadió la $\text{H}_2\text{-FC-DA}$ (mM) y PBS (KH_2PO_4 , K_2HPO_4)

incubando durante 15 minutos a 20°C en hielo y se midió la fluorescencia basal en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 18 a 520 nm. Posteriormente, se mantuvieron en un agitador a 20°C durante 60 minutos y se midió nuevamente la fluorescencia.

6.11 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Biuret, este método se basa que, en presencia de péptidos, un ión cobre (II) forma complejos de coordinación de color morado en una solución alcalina. Inicialmente, se agregaron 20 µL de muestra , 200µL de Desoxicolato de sodio (DOC) 1% y 2 mL de reactivo de Biuret, agitando rigurosamente entre la adición de cada reactivo. Después, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se leyeron en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 18 a una longitud de 540 nm. El contenido de proteínas totales se calculó contra una curva estándar de Albumina Sérica Bovina (BSA).

6.12 Determinación de la actividad enzimática de catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD)

Para los ensayos de actividad enzimática se utilizaron los sobrenadantes de cada tratamiento, los nematodos en condiciones con glucosa y fenoles totales del frijol se mantuvieron a 20°C durante 72 horas.

Para la cuantificación de la actividad de SOD fue medida usando el kit comercial para la determinación de SOD (Sigma Aldrich,19160), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante con algunas modificaciones. Se resuspendieron 0.1 mg/mL⁻¹ de proteína en 200 µL de solución de trabajo WST y se adicionaron 20 µL de la solución de trabajo enzimática. A continuación, se incubaron a 37°C durante 20 minutos y se leyeron en un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo scientific, Finlandia, UE). La actividad de la superóxido dismutasa se

expresa como unidades de SOD y se calculó contra una curva estándar de SOD (Sigma 9054-89-1).

La actividad de Catalasa (CAT), fue determinada por polarografía midiendo la conversión de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a oxígeno molecular (O_2) con un electrodo de oxígeno de tipo-Clark acoplado a un monitor de oxígeno biológico (Zigman y col., 1998), lo que permite medir la tasa de producción de oxígeno. En una cámara de vidrio sellada con agitación constante se colocó Buffer/EDTA y 660 μ L de Peróxido de Hidrógeno 3% como sustrato durante 1 minuto, de inmediato, se añadieron 0.3 mg/mL de proteína de cada condición y tuvo reacción durante 2 minutos más. Al finalizar, se agregó azida de sodio 1 M (N_3Na) para inhibir la actividad de CAT. La actividad de catalasa se expresa como unidades de CAT y se calculó contra una curva estándar de Catalasa (Sigma 9001-05-2).

6.13 Determinación del glutatión total, Glutatión reducido (GSH) y Glutatión oxidado (GSSG)

La evaluación de los niveles de glutatión se realizó de acuerdo a Rahman y col., 2006. Se utilizó el reactivo de Ellman DTNB (ácido 5', 5-ditiobis-2-nitrobenzoico), que reacciona con GSH para formar un producto con un máximo de absorción a 412 nm. Se realizó una curva de calibración con GSH para cada experimento.

Se tomaron 100 μ L del sobrenadante de la suspensión de nematodos y se resuspendieron en una solución de ácido sulfosalicílico 0.6%, Tritón-X 0.1% en 0.1 M de buffer de fosfato EDTA 5 mM, pH 7.5, se sonicó tres veces en hielo y se llevó a una temperatura de -86 °C, posteriormente, las muestras se centrifugaron a 8,000 Xg durante 10 min y se tomaron 100 μ L de sobrenadante en 700 μ L de buffer de fosfato, después, se mezclaron volúmenes iguales de DTNB (Sigma D-8130) y Glutatión reductasa (GR) (Sigma G-3664) agregando 120 μ l de esta mezcla. Se incubo durante 30 segundos para la conversión de GSSG a GSH, se añadieron 60 μ l de β -NADPH (Sigma N-7505) y se realizó la medición de la absorbancia a 412 nm durante 5 minutos en un espectrofotómetro UV/Vis Lambda 18 de la marca Perkin-Elmer. Para evaluar el Glutation oxidado (GSSG) se

agregaron 2 μ l de 2-vinilpiridina 1:10 para derivatizar el Glutati3n reducido (GSH), permitiendo que la reacci3n tuviera lugar durante 1 hora a temperatura ambiente/oscuridad. Transcurrido este tiempo, se a1nadi3 trietanolamina 1:6 durante 10 minutos para neutralizar midiendo la absorbancia como se describi3 anteriormente.

6.14 Determinaci3n de biomarcadores de estr3s oxidante

Para la determinaci3n de peroxidaci3n lipídica y carbonilaci3n de proteínas los nematodos que fueron suministrados con glucosa y fenoles totales del frijol se mantuvieron a 20°C durante 11 días.

6.14.1 Peroxidaci3n lipídica

La peroxidaci3n lipídica se cuantific3 en nematodos adultos mediante el ensayo de malondialdehído (MDA), que se determin3 mediante el m3todo del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Buege y Aust., 1978). Después de lisar los nematodos y determinar el contenido de proteína, a 0.5 mg/mL⁻¹ se le a1nadi3 BHT (0.01%) con la finalidad de prevenir la formaci3n no específica de crom3foros. Brevemente, se incubaron en TBA (0.375%) disueltas en ácido tricloroac3tico TCA (15%) y HCl (0.25 M), calentándolas a ebullici3n durante 30 minutos, se mantuvo en hielo durante 15 minutos, seguido de una centrifugaci3n a 1500 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes se leyeron a 532 nm en un espectrof3tmetro UV/Vis Perkin-Elmer Lambda 18. Se utiliz3 el coeficiente de extinci3n molar 156 mM⁻¹ cm⁻¹ para calcular las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

6.14.2 Carbonilaci3n de proteínas

El contenido de proteínas carboniladas fue cuantificada mediante la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Se incubaron 0.1 mg/mL⁻¹ de proteína en DNPH (10mM) en HCl (2M) durante 10 minutos. A continuaci3n, se centrifugaron a 6,200 rpm durante 10 minutos y el precipitado se lav3 tres veces con acetato de etil-etanol (1:1), se resuspendió en SDS al 10% y se leyeron a 360 nm en un

espectrofotómetro Shimadzu UV/Vis UV-2550. Las muestras fueron derivatizadas con HCl (2M). Se utilizó el coeficiente de extinción molar $0.022 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para calcular el contenido de proteínas carboniladas.

6.15 Ensayos de la expresión en cepas reporteras

Aproximadamente 10 nematodos adultos sincronizados que expresaban el gen *daf-16::GFP*, *skn1::GFP*, *sod-1::YFP*, *ctl123::GFP* y *gst-4::GFP* se sembraron en placas de 60 mm de medio NGM suplementado con glucosa 80 mM, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fenoles totales del extracto del frijol y la mezcla de ambos, se incubaron a 20°C durante 48 horas. Después, los animales se anestesiaron con azida de sodio (N_3Na) 10 mM, se montaron en almohadillas de agarosa al 2% y se observaron en un microscopio confocal Fluo-View FV1000-PME de la marca Olympus. La cuantificación de la fluorescencia de GFP y YFP se realizó utilizando el software Image J.

6.16 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de Student. Todos los cálculos se realizaron utilizando Microsoft Office Excel 2019 versión 16.2. Los experimentos se realizaron por triplicado y los ensayos de esperanza de vida por sextuplicado. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los datos experimentales se muestran como el promedio \pm s.d. de al menos tres experimentos independientes. Los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 7.0.

VII. RESULTADOS

7.1 Contenido de compuestos fenólicos en el frijol pinto de la variedad criolla y comercial

La semilla del frijol pinto de la variedad criolla posee una mayor cantidad de fenoles totales que la semilla del frijol pinto de la variedad comercial, los valores variaron de 3.4 mg de equivalentes de ácido gálico/g (EAG/g) y 1.91 mgEAG/g respectivamente, mostrando una diferencia significativa (Figura 7).

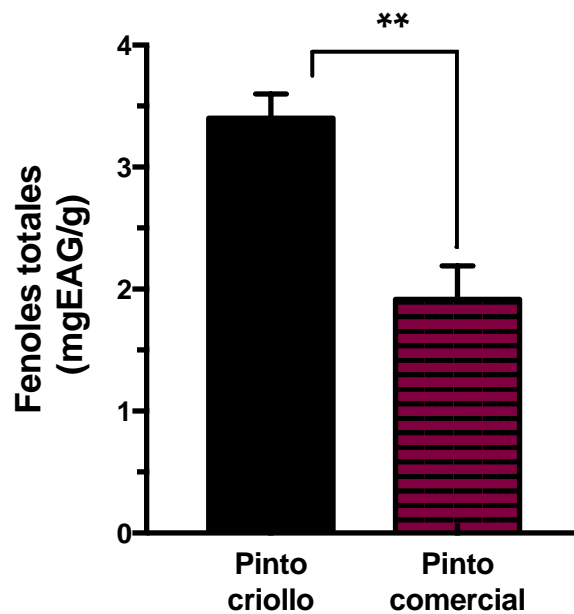


Figura 7. Contenido de fenoles totales en semillas de dos variedades de frijol. Las barras de error representan SD; (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, t Student dos colas). n=6

7.4 Actividad antioxidante *in vitro*

La capacidad de eliminación del radical libre DPPH[•] y ABTS^{•+} por los extractos de frijoles pinto criollo y comercial se presentan en la figura 8. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los valores de DPPH y ABTS para el frijol pinto de la variedad comercial, mostrando una actividad antioxidante de 64.43 μ MTrolox/mL y 181.23 43 μ MTrolox/mL, respectivamente. Sin embargo, para el ensayo FRAP el extracto del frijol pinto criollo obtuvo la mayor capacidad de reducir el hierro férrico a su forma ferrosa, con un valor de 93.6 μ MTrolox/mL, más del doble de actividad que el frijol pinto comercial.

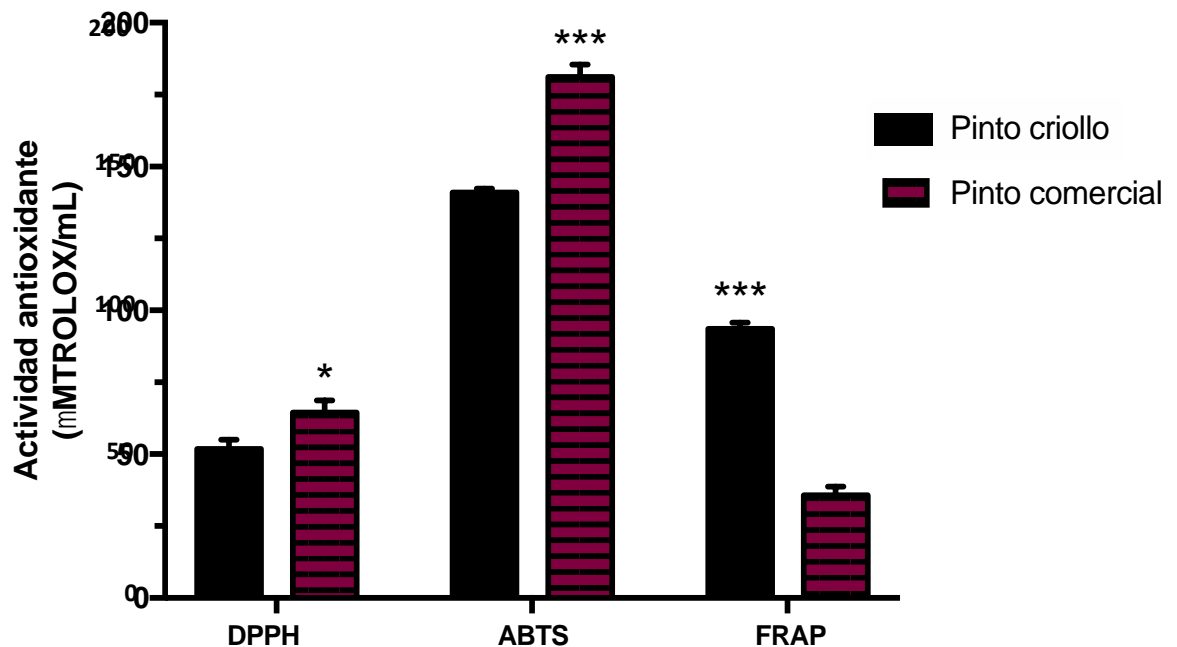


Figura 8. Actividad antioxidante *in vitro*. Las barras de error representan la desviación estándar (SD); (*p<0.05, **p<0.005, ***p<0.001, t Student dos colas). n=6

7.3 Contenido de fenoles totales en *Caenorhabditis elegans*

Para establecer un posible beneficio del consumo de compuestos fenólicos encontrados en el frijol y su participación en la modulación de la respuesta antioxidante, se analizó primeramente la absorción de estos compuestos bioactivos en *C. elegans*. En la figura 9, se muestra el contenido de fenoles totales absorbidos por los nematodos al exponerse a diferentes concentraciones de compuestos fenólicos del extracto del frijol pinto criollo en el medio de crecimiento de nemátodos (NGM). Desde 15 hasta 40 µg/mL de fenoles en el medio, los nematodos ingieren en promedio el 66% de la totalidad de la concentración de fenoles totales presentes en el medio. Se obtuvo una correlación significativa ($R^2=0.987$) entre el contenido de fenoles en el medio, y los absorbidos por el nemátodo, sin embargo, se observó que a medida que incrementa la concentración de fenoles en el medio disminuye el porcentaje absorbido (concentración de 40 µg/mL).

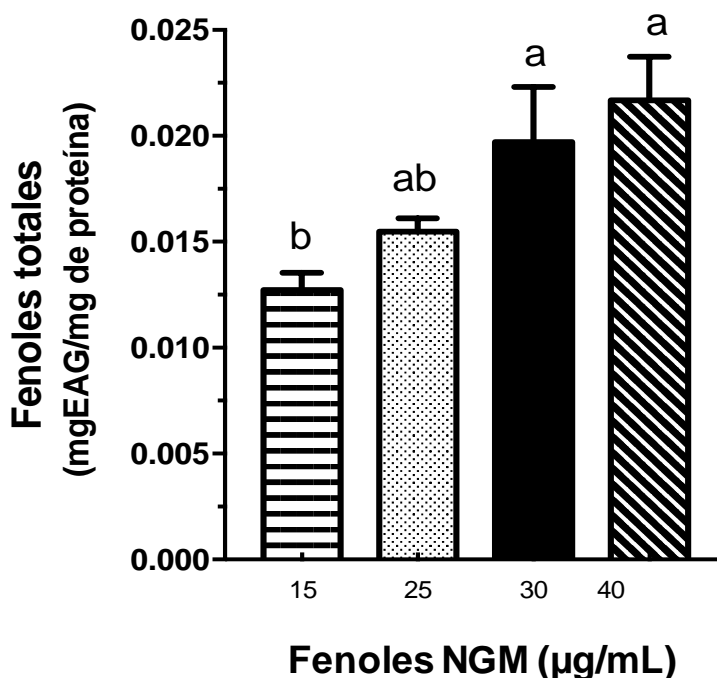


Figura 9. Contenido de fenoles totales en *C. elegans*. ANOVA, Tukey; $\alpha= 0.05$, letras diferentes denotan diferencia significativa; las barras de error representan la desviación estándar (SD), n=3

7.4 Efecto del extracto del frijol sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se sabe que las dietas con alto contenido de glucosa generan especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ray y col., 2012; Mendler y col., 2012). Para asegurarnos si en nuestras condiciones de estudio la glucosa induce la generación de ROS, *C. elegans* se expuso a 80 mM de glucosa. Se observó que en los nematodos crecidos en medio de cultivo con alto contenido de glucosa se incrementó alrededor de 3 veces la producción de ROS en comparación con la condición control. De manera interesante, la adición del extracto metanólico del frijol al medio con altas concentraciones de glucosa mantuvo la producción de ROS intracelulares a niveles similares a los nematodos crecidos en el medio control sin glucosa (Figura 10).

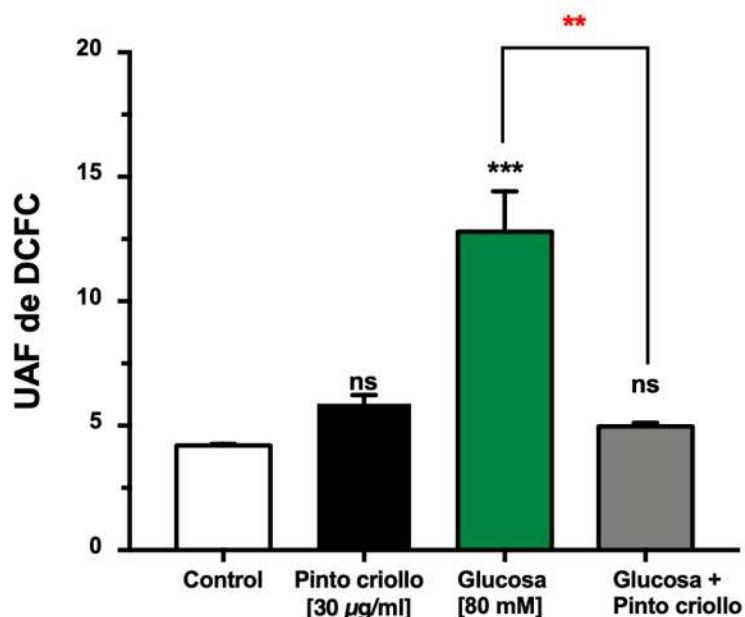


Figura 10. Efecto de la adición de glucosa y extracto metanólico del frijol en la producción de ROS en *C. elegans*. Las barras de error representan desviación estándar (SD); t Student *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001. n=3, 20°C; 48 horas.

7.5 Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo y comercial sobre la longevidad de *C. elegans*.

Nos preguntamos si los compuestos fenólicos presentes en el extracto del frijol pinto criollo y comercial podría influir en la esperanza de vida de *C. elegans*, para esto, agregamos 30 µg/mL de fenoles totales a las placas de cultivo que contienen medio de crecimiento normal (NG) y bacterias como alimento. Encontramos que la adición de estos compuestos del frijol pinto criollo aumentó la esperanza de vida aproximadamente un 10% y la extiende 3 días más (considérese que en promedio 1 día de vida del nematodo equivale a 3.6 años de vida de un humano), llegando hasta el día 28, sin embargo, la adición de glucosa la disminuye alrededor de 5 días con respecto al control, curiosamente, en esta misma condición, cuando se adiciona el extracto del frijol se incrementa la resistencia al estrés en casi un 20% (figura 11 a).

En el caso del frijol pinto comercial, no se observa una extensión en la esperanza de vida en comparación con el control, sin embargo, se logra aumentar un 20% la resistencia al estrés inducido con glucosa al añadir el extracto del frijol pinto comercial (Figura 11 b).

Por otro lado, además se indujo estrés oxidante en *C. elegans* por inducción química con H₂O₂ a una concentración de 15 mM de este compuesto normalizado en el medio M9. Los nematodos que fueron crecidos con el extracto metanólico del frijol (50 µg/mL) aumentaron casi un 40 % la supervivencia de *C. elegans* en presencia del extracto del frijol pinto criollo y de un 30 % para el comercial (Figura 11 c).

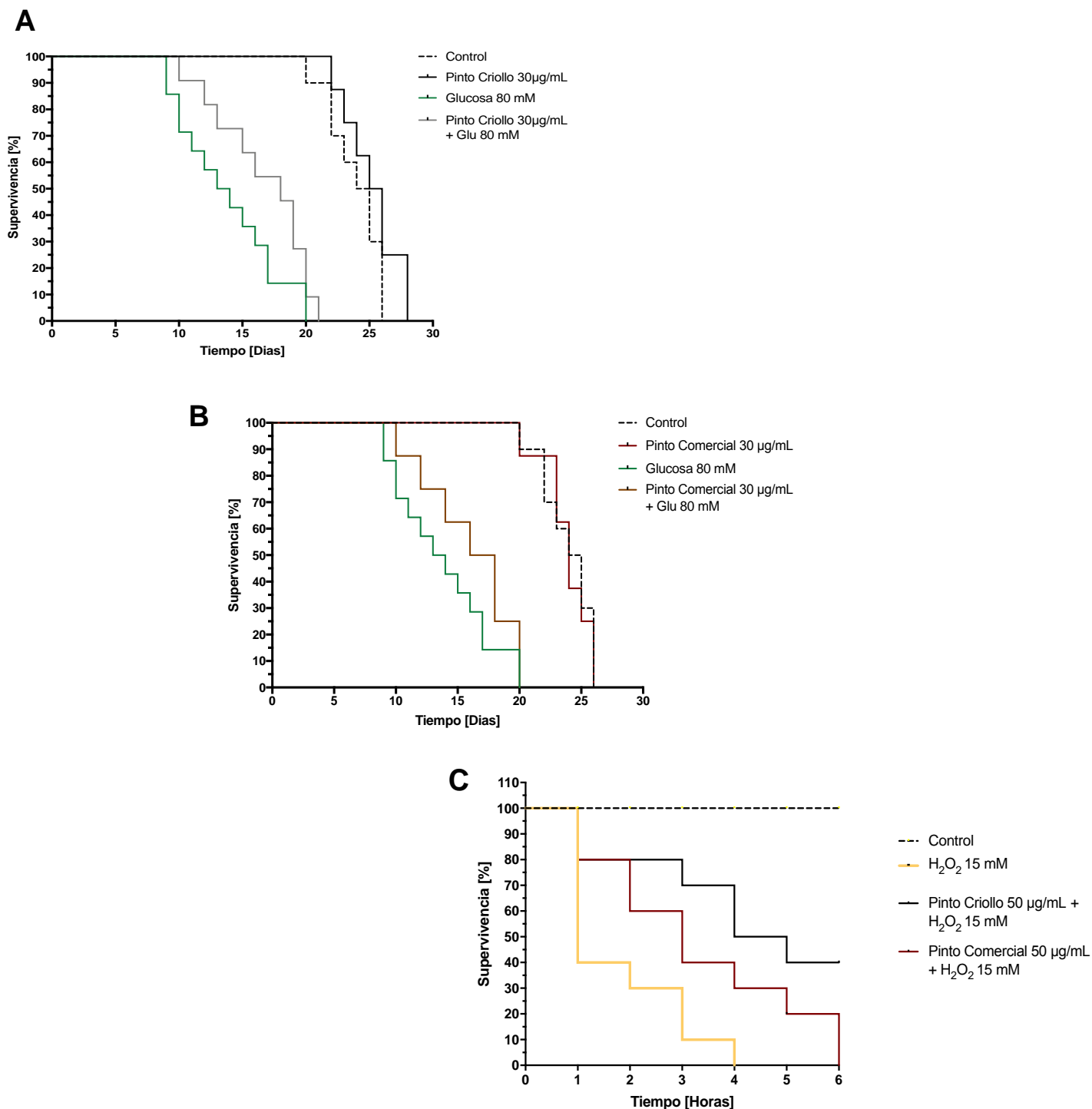


Figura 11. Efecto del extracto metanólico del frijol en la longevidad y la resistencia al estrés oxidante en *C. elegans*. a) y b) El extracto del frijol Pinto criollo y comercial alarga la esperanza de vida de *C. elegans* y lo protegen en presencia de altas concentraciones de glucosa, como inductor de estrés oxidante. c) El extracto del frijol pinto protege del estrés oxidante inducido químicamente con H₂O₂ a *C. elegans*. Gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier, n=6 ,20 individuos, 20°C.

7.6 El extracto del frijol pinto criollo aumentan la longevidad y la resistencia al estrés oxidante de mutantes en genes que modulan la vía de señalización de la insulina /IGF-1

Debido a que la actividad de la vía de insulina / IGF-1 es necesaria para el crecimiento hasta la edad adulta (Hu, 2007), las mutaciones en el receptor de esta vía (*daf-2*) solo inhibe parcialmente la actividad de los genes. En este estudio se han planteado tres puntos de acción que pueden ejercer los compuestos fenólicos del extracto del frijol los cuales pueden ejercer un efecto temprano modulando vías de señalización asociadas a la longevidad y la resistencia al estrés, un efecto medio aumentando la actividad de enzimas antioxidantes y un efecto tardío actuando en mecanismos de reparación en la oxidación de biomoléculas. Por lo tanto, para saber si estos compuestos tenían un efecto temprano modulando genes involucrados en la vía de señalización de la insulina en nuestras condiciones estudiadas, se utilizaron mutantes tanto en el receptor DAF-2 como en la quinasa AGE-1, componentes clave de esta vía. De manera inicial se sabe que la supresión en el gen *daf-2* duplica la longevidad de *C. elegans* en comparación con la población silvestre N2. Cuando se añadió el extracto del frijol pinto criollo se aumentó la esperanza de vida de *C. elegans* alrededor de un 10% comparado con el grupo control, por otro lado, con dietas altas de glucosa la esperanza de vida de *C. elegans* se ve suprimida 22 días, pero logra extenderse dos días más en comparación con su respectivo control (glucosa 80 mM) al añadir el extracto del frijol (Figura 12).

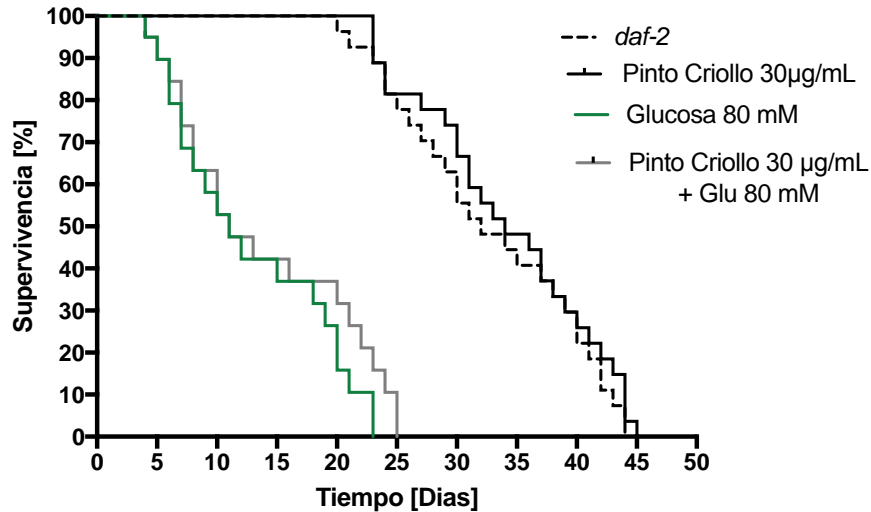


Figura 12. Efecto del extracto metanólico del frijol en la longevidad y la resistencia al estrés oxidante en la mutante *daf-2*. Gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier, n=10; 20 individuos, 20°C.

Para saber si los compuestos fenólicos del extracto del frijol tenían un efecto sobre la quinasa AGE-1, la cual desencadena una cascada de fosforilación en la vía, se usó una mutante de esta quinasa. También las mutaciones en el gen *age-1* duplican la longevidad de *C. elegans* en comparación con la población silvestre N2, al exponerse los nematodos al extracto del frijol pinto criollo no se observan cambios en la esperanza de vida con respecto al grupo control, sin embargo, en condiciones de estrés oxidante con glucosa la esperanza de vida de *C. elegans* logra extenderse siete días más en comparación con su respectivo control (glucosa 80 mM) (Figura 13).

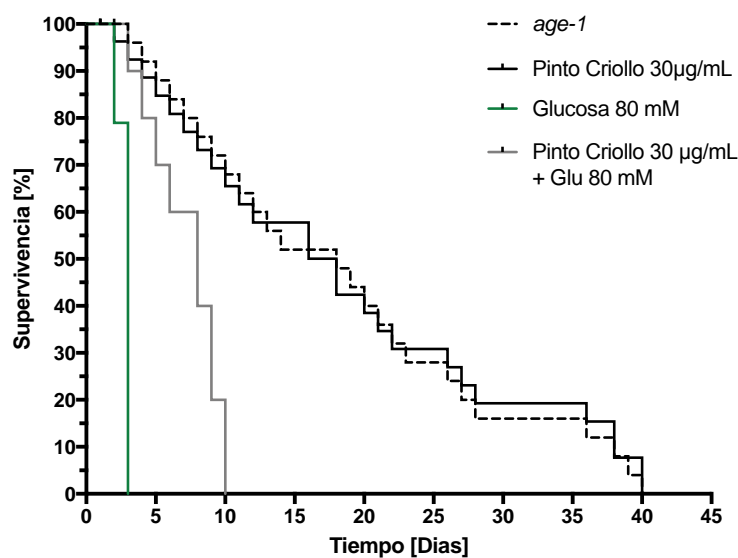


Figura 13. Efecto del extracto metanólico del frijol en la longevidad y la resistencia al estrés oxidante en la mutante *age-1*. Gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier, n=10; 20 individuos, 20°C.

7.7 Los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo aumentan la actividad del factor de transcripción DAF-16/FOXO de respuesta a estrés oxidante.

La señalización de insulina / IGF-1 inhibe la actividad transcripcional de DAF-16 / FOXO (Salih y Brunet, 2008). La señalización reducida de esta vía conduce a la translocación de DAF-16/FOXO del citoplasma al núcleo, donde activan un conjunto de genes que median el estrés oxidante. Para saber si los compuestos fenólicos en el extracto tenían un efecto antioxidante indirecto sin ser necesario activar el receptor y actuando a nivel de DAF-16, factor transcripcional que responde al estrés oxidante investigamos sus efectos sobre la longevidad y el estrés oxidante inducido por glucosa utilizando una cepa mutante en el gen *daf-16* y una cepa reportera *daf-16::GFP* para permitir determinar su translocación.

La presunción es que sí se requiere DAF-16 para la longevidad y la resistencia al estrés oxidante inducida por el extracto del frijol, el efecto antioxidante no se observaría en el mutante en *daf-16* que se trató con el extracto del frijol. Los resultados mostraron que la supervivencia de los nematodos mutantes *daf-16* que fueron tratados con el extracto del frijol (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no fue diferente de la supervivencia de los nemátodos mutantes que no fueron tratados con el extracto, observando que la absorción de glucosa acorta la vida de *C. elegans* y una adición del extracto del frijol no logra aumentar la supervivencia (Figura 14). En la cepa reportera *daf-16::GFP*, se observó con claridad que la adición del extracto del frijol aumentó la traslocación hacia el núcleo del DAF-16 casi un 80% en comparación con las condiciones control, por otro lado, en condiciones de estrés oxidante con la localización nuclear en *C. elegans* aumenta casi un 20% en comparación con su respectivo control (glucosa 80 mM) (Figura 15). Estos resultados sugieren que el factor de transcripción DAF-16 está involucrado en la regulación de la longevidad y la resistencia al estrés oxidante mejorada por el extracto del frijol pinto criollo.

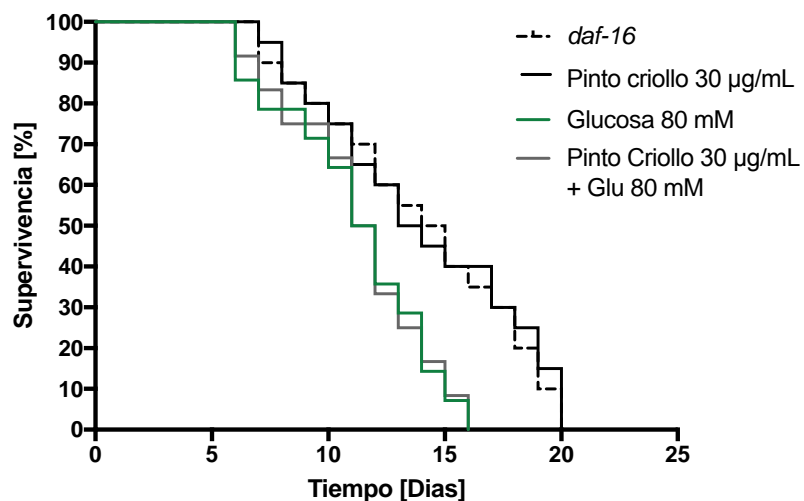


Figura 14. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre DAF-16. Mutante *daf-16* en exposición a compuestos fenólicos del extracto del frijol pinto criollo, gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier, n=10; 20 individuos, 20°C.

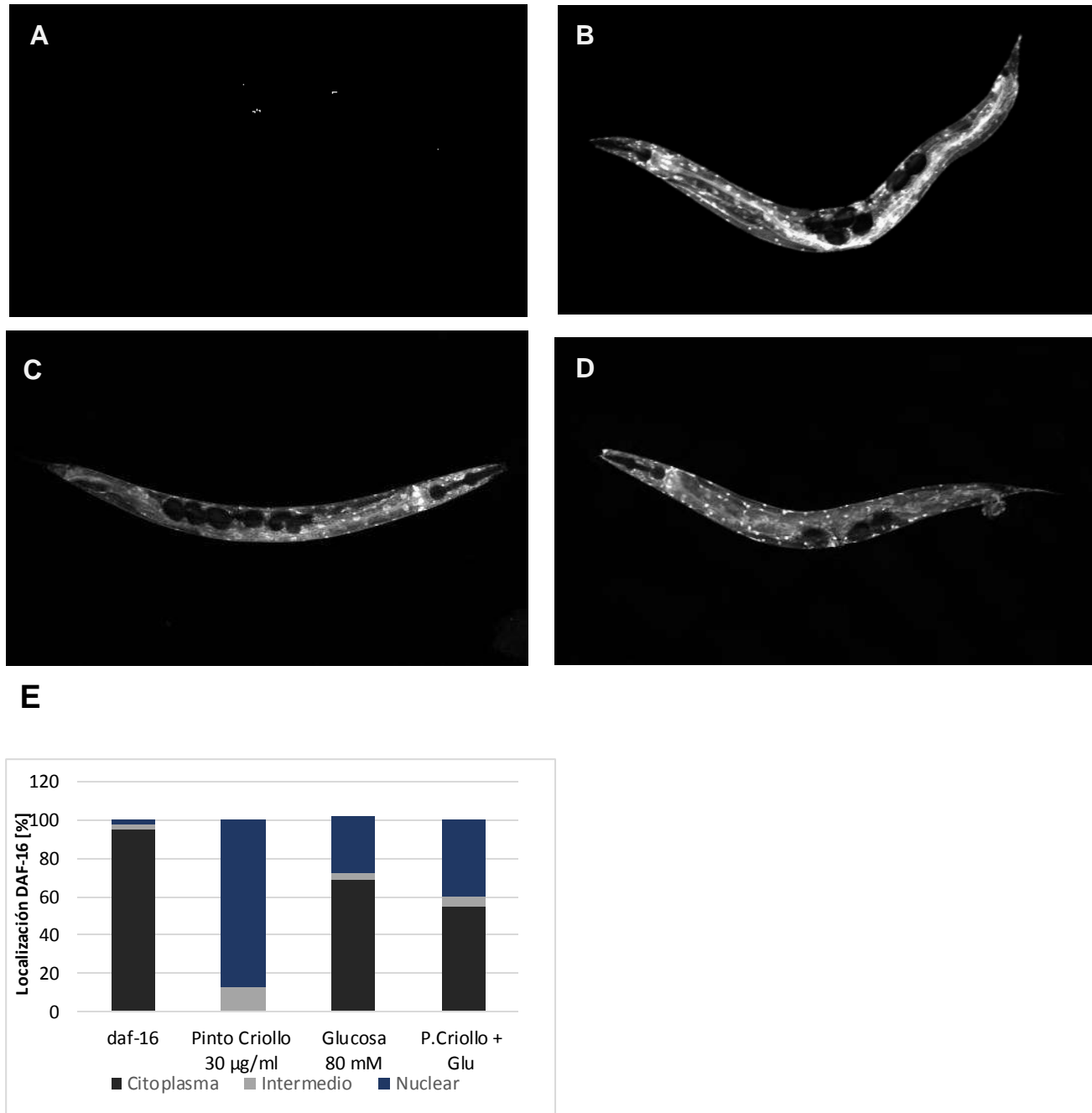


Figura 15. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre la traslocación de DAF-16. A) Control, B) Pinto criollo 30 µg/mL, C) Glucosa 80 mM, D) Pinto criollo y glucosa E) Localización de DAF-16, corresponden a cada tratamiento. n=3, 20°C; 48 horas, microscopía confocal 20X. El diagrama de barra representa el porcentaje de localización nuclear del factor de transcripción *daf-16*.

7.8 Los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo aumentan la actividad del factor transcripcional SKN-1/NRF-2 en respuesta al estrés oxidante

El factor de transcripción, SKN-1 es un importante gen del desarrollo (Bowerman y col., 1992) que promueve la resistencia al estrés oxidante (Tullet y col., 2017) y la sobreexpresión de SKN-1 aumenta la vida útil de *C. elegans* (Bowerman y col., 1992; An y col., 2003; Hertweck y col., 2008). Por lo tanto, quisimos ver si los compuestos fenólicos encontrados en el extracto del frijol pinto criollo podían actuar en la activación de SKN-1. Para nuestras condiciones utilizadas en este estudio se utilizó una cepa reportera *skn-1::GFP*. Se percibió que el extracto del frijol pinto criollo aumenta los niveles de SKN-1 en el núcleo aproximadamente 2 veces más; con glucosa es muy similar al control y con la mezcla de ambos esta traslocación aumenta casi el doble con respecto a su control (glucosa) (Figura 16).

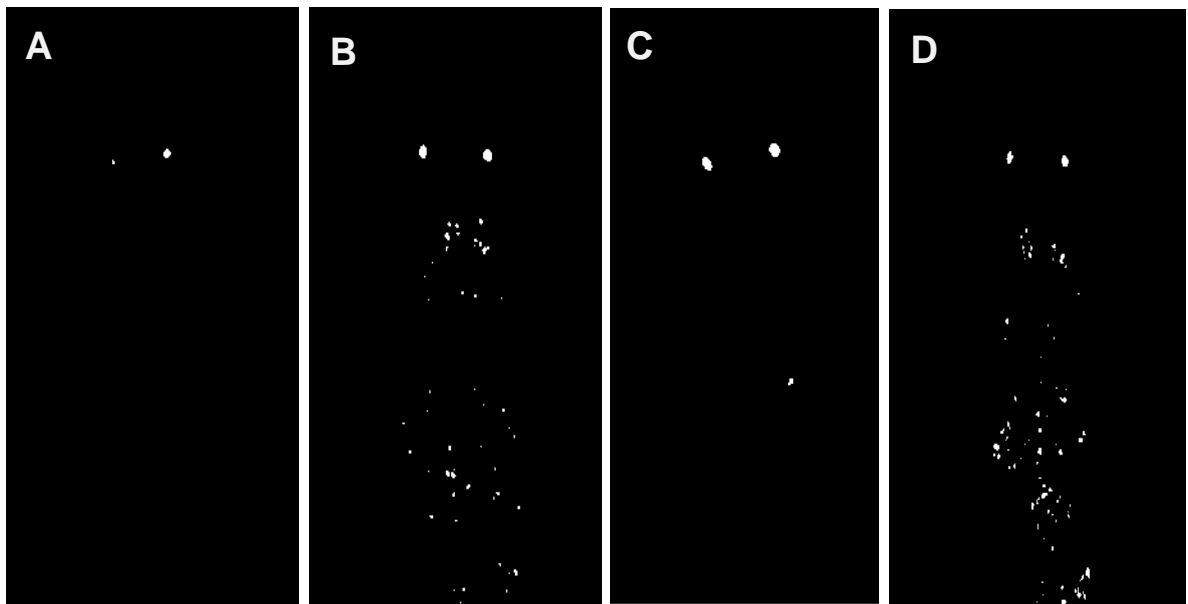


Figura 16. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre la traslocación de SKN-1. Cepa reportera *skn-1::GFP*, A) Control, B) Pinto criollo 30

µg/mL, C) Glucosa 80 mM, D) Extracto metanólico del frijol pinto criollo + glucosa. n=3, 20°C; 48 horas, microscopía confocal 60X.

7.9 Los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre los niveles de glutatión.

Para determinar si los los compuestos fenólicos del frijol tenían un efecto medio participando en el aumento de la actividad de enzimas de detoxificación de ROS, se analizó la actividad del glutatión, un antioxidante no enzimático, que con la excepción de las enzimas antioxidantes de las especies reactivas de oxígeno (ROS) , el glutatión reducido (GSH) actúa como la principal defensa celular contra los oxidantes (Matés., 1999). Después de la oxidación a disulfuro (GSSG), la glutatión reductasa (GSR) la reduce a GSH, que utiliza NADPH como donante de electrones (Luersen., 2013). Por lo tanto, quisimos saber si con las condiciones ricas en compuestos fenólicos del frijol podían tener un efecto en los niveles de glutatión. Se encontró que los niveles totales de glutatión, GSH y GSSG no muestran un aumento significativo en los nematodos que crecieron en 30 µg/mL de fenoles, sin embargo, los niveles de estos marcadores muestran un aumento en las condiciones con glucosa, pero solamente existe una tendencia en GSSG, si además se adiciona el extracto del frijol estos valores se ven disminuidos en un 55, 58, 20 y 45% para el glutatión total, GSH, GSSG y la relación de GSH/GSSG, respectivamente comparandolos con las condiciones con glucosa 80 mM (Figura 17).

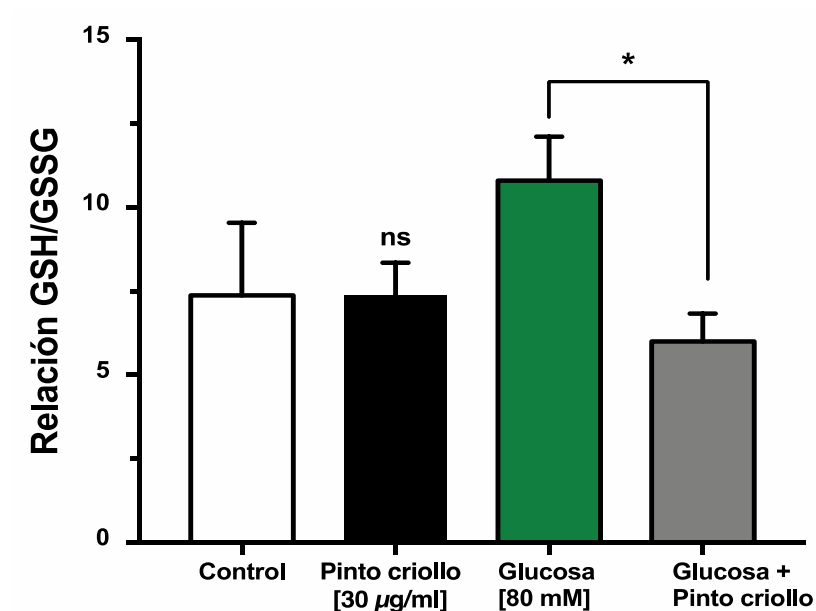


Figura 17. Efecto del extracto del frijol pinto criollo en los niveles de glutatión. Las barras de error representan SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, t Student, (tratamientos vs. Control; Glu vs. Glu+ Pinto criollo C). $n=3$, 20°C; 48 horas.

7.10 Los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo modulan las enzimas antioxidantes

Las enzimas antioxidantes juegan un papel muy importante en la eliminación de ROS y así mantener una homeostasis celular, por lo tanto fue de nuestro interés comprobar si los compuestos fenólicos encontrados en el frijol podían aumentar la

actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés oxidante. En un inicio, la exposición con el extracto del frijol (30µg/mL) aumentó 4 veces más la actividad de SOD con respecto al control, sin embargo, en condiciones de estrés oxidante con glucosa, la actividad de SOD aumenta casi 5 veces y se ve disminuida casi un 40% al añadir el extracto del frijol (Figura 18). Posteriormente, se observó la expresión de *sod-1*, una SOD Cu/Zn, esta se sobreexpresó en las condiciones tanto para el extracto como para la glucosa, aumentando dos y tres veces más la expresión respectivamente. En condiciones de estrés oxidante con glucosa, la adición del extracto disminuye 3 veces más la expresión de SOD-1 en comparación con su respectivo control de glucosa 80 mM (Figura 19). También para corroborar este efecto, se utilizó una cepa mutante *sod-12345*, la cual tiene un tiempo de vida normal e incrementa la sensibilidad al estrés oxidante. Con el extracto del frijol la esperanza de vida de *C. elegans* aumenta alrededor de un 10% en comparación con el control, cuando los nematodos fueron expuestos a glucosa y al extracto, de igual manera, se tiene un aumento en la vida casi de un 10-15% con respecto a las condiciones solamente con el agente oxidante (Figura 20).

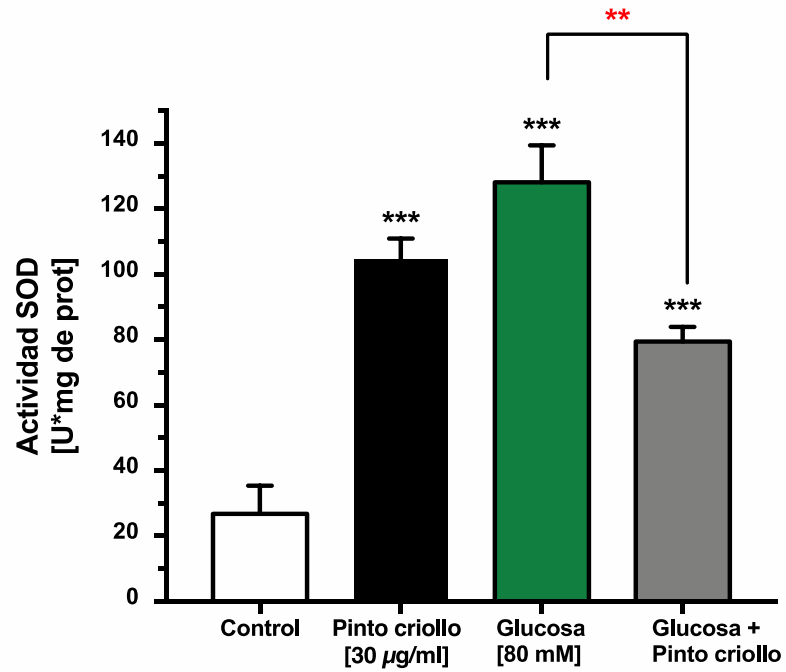


Figura 18. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre la actividad de SOD. Las barras de error representan SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, t Student (tratamientos vs. control; glu vs. glu+ pinto criollo). $n=3$, 20°C ; 72 horas.

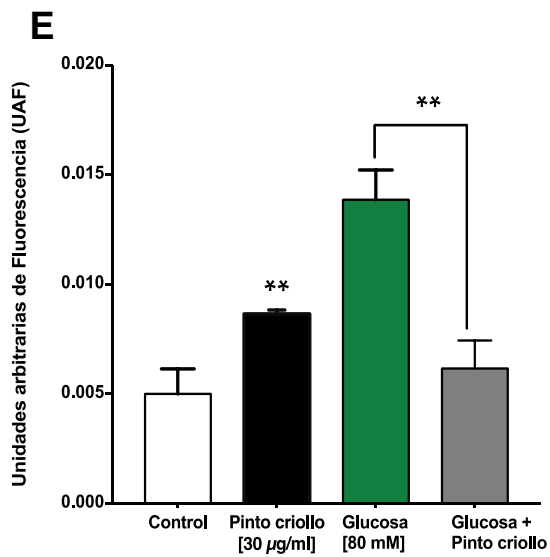
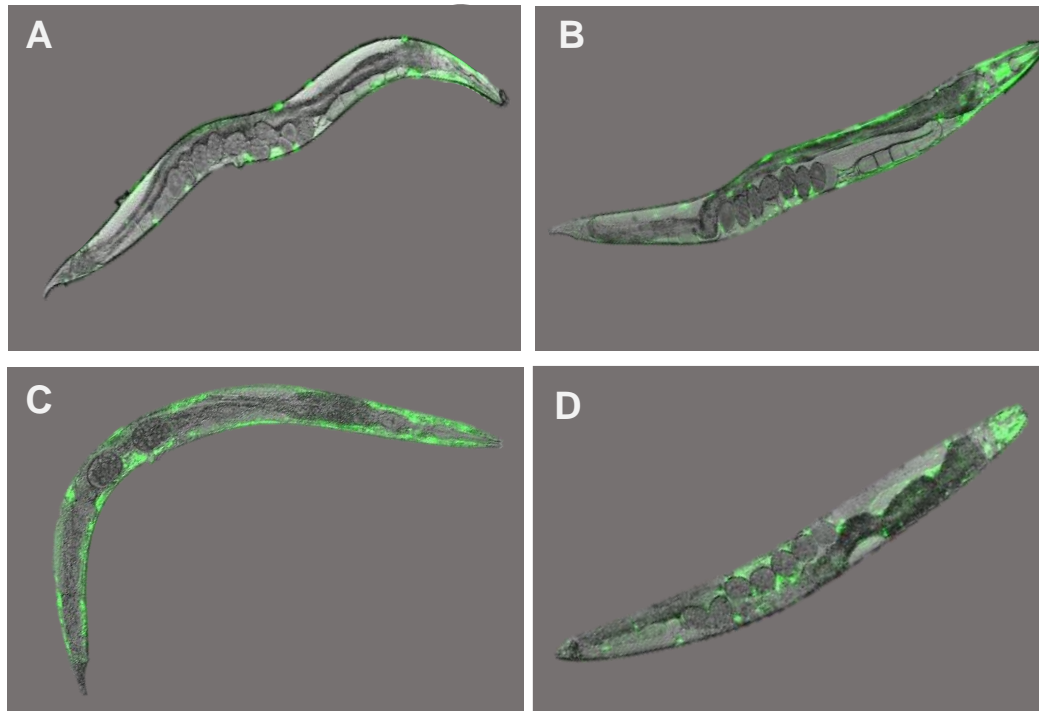


Figura 19. La expresión de *sod-1::YFP* es mayor cuando los animales se cultivaron en con el extracto del frijol pinto criollo. Cepa reportera *sod-1::YFP*, A) Control, B) Pinto criollo 30 µg/mL, C) Glucosa 80 mM, D) Pinto criollo y glucosa, E) Unidades arbitrarias de fluorescencia que corresponden a cada tratamiento. Las barras de error representan SD; *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001, t Student, (tratamientos vs. Control; Glu vs. Glu+ Pinto criollo) n=3, 20°C; 48 horas, microscopía confocal 20X.

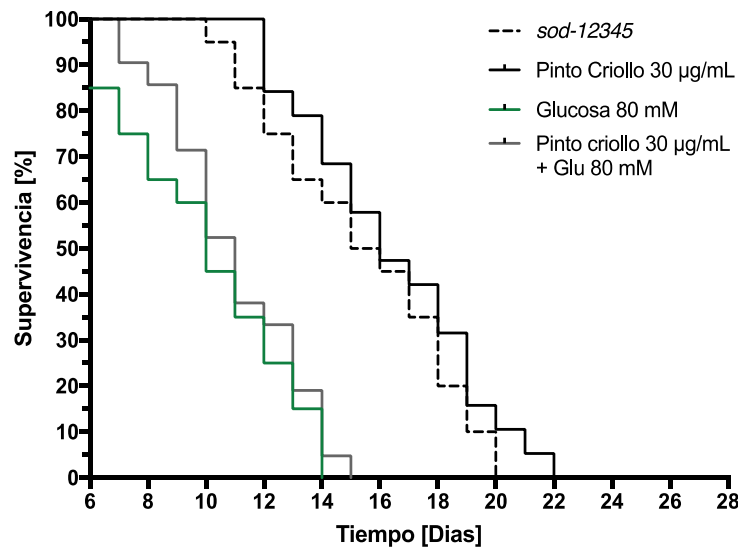


Figura 20. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre la esperanza de vida de la mutante *sod-12345* de *C. elegans*. Mutante *sod-12345* en exposicion a compuestos fenólicos del extracto del frijol pinto criollo, gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier, n=10; 20 individuos, 20°C.

Asimismo, se determinó la actividad de la enzima catalasa (CAT), en donde se tuvo un aumento en la actividad de la enzima 6 veces más cuando *C. elegans* se expuso a los compuestos fenólicos presentes en el extracto del frijol, en condiciones de estrés con glucosa esta actividad se ve aumentada alrededor de dos veces más, pero no se observó una diferencia con el extracto del frijol pinto criollo en esta condición de estrés oxidante, ya que ambas condiciones oscilaban entre las 3 Unidades/mg de proteína (Figura 21).

Se utilizó una cepa reportera que expresa a *ctl-123* se utilizó para ver si el tratamiento con el extracto del frijol podía tener algún cambio en la expresión de *C. elegans*, se observó que dicho tratamiento incrementó casi 2 veces más la expresión de la enzima catalasa comparándolo con el control, sin embargo, en condiciones de estrés solo se logra aumentar 1.4 veces más la expresión de CAT y no hay un cambio significativo al exponerse con el extracto (Figura 22).

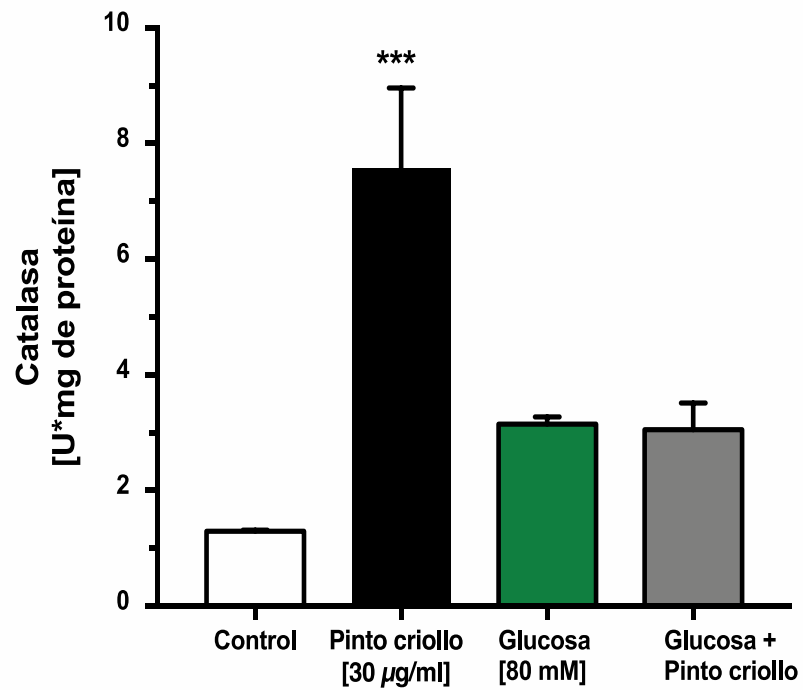


Figura 21. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre la actividad de CAT. a) Las barras de error representan SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, t Student (tratamientos vs. Control; Glu vs. Glu+ Pinto criollo), $n=3$, 20°C ; 72 horas.

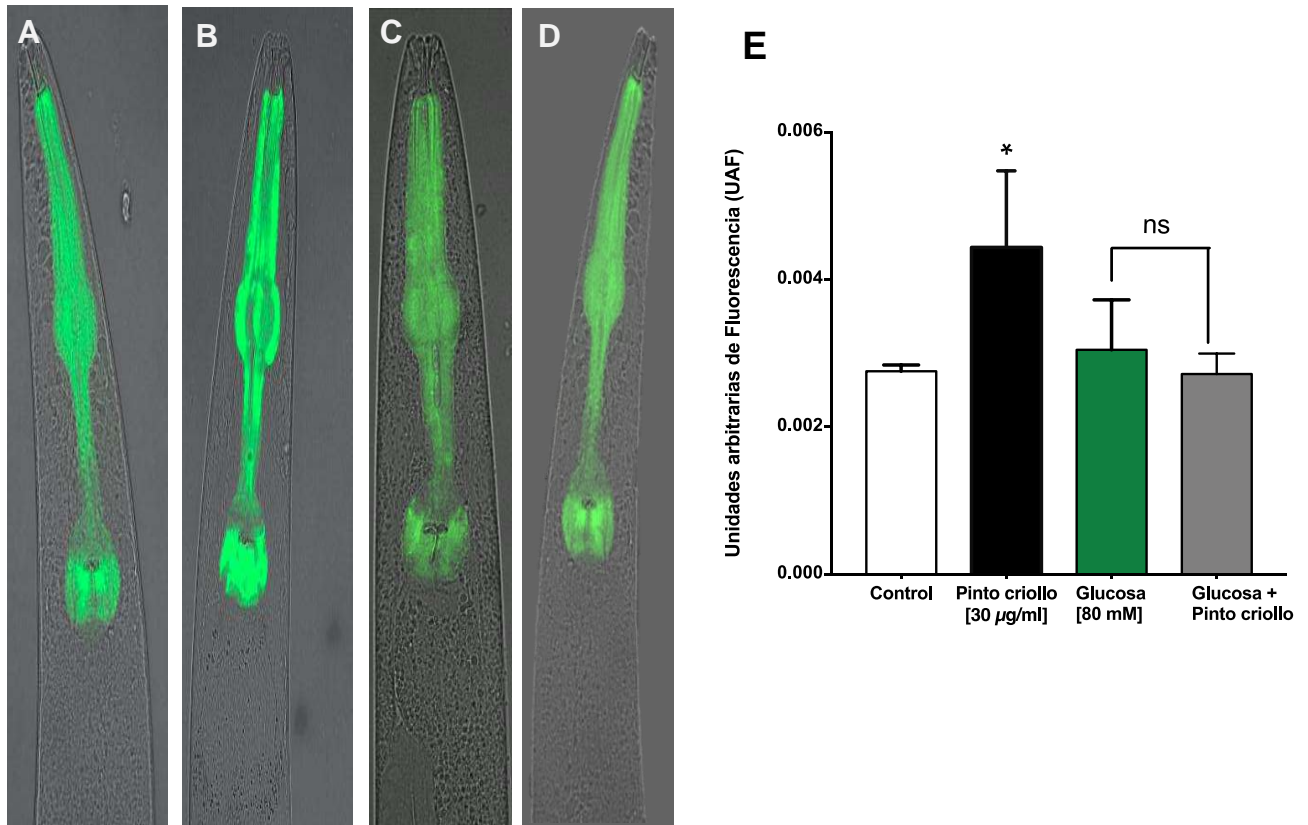


Figura 22. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre la expresión de la catalasa. Expresión de *ctl-123::GFP*, microscopia confocal 60X. A) Control, B) Pinto criollo 30 µg/mL, C) Glucosa 80 mM, D) Pinto criollo y glucosa E) Unidades arbitrarias de fluorescencia que corresponden a cada tratamiento. Las barras de error representan SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, t Student, (tratamientos vs. Control; Glu vs. Glu+ PC) $n=3$, 20°C; 48 horas.

Para observar un efecto en la expresión de la enzima antioxidante de fase II Glutación-S-Transferasa (GST), se utilizó una cepa reportera *gst-4::GFP*. Después de 48 horas en exposición en cada una de las condiciones, los nematodos expuestos al extracto del frijol aumentaron la expresión del gen *gst-4* un 43%, con

glucosa un 58 % y glucosa con el extracto del frijol un 25% en comparación con el control (Figura 23).

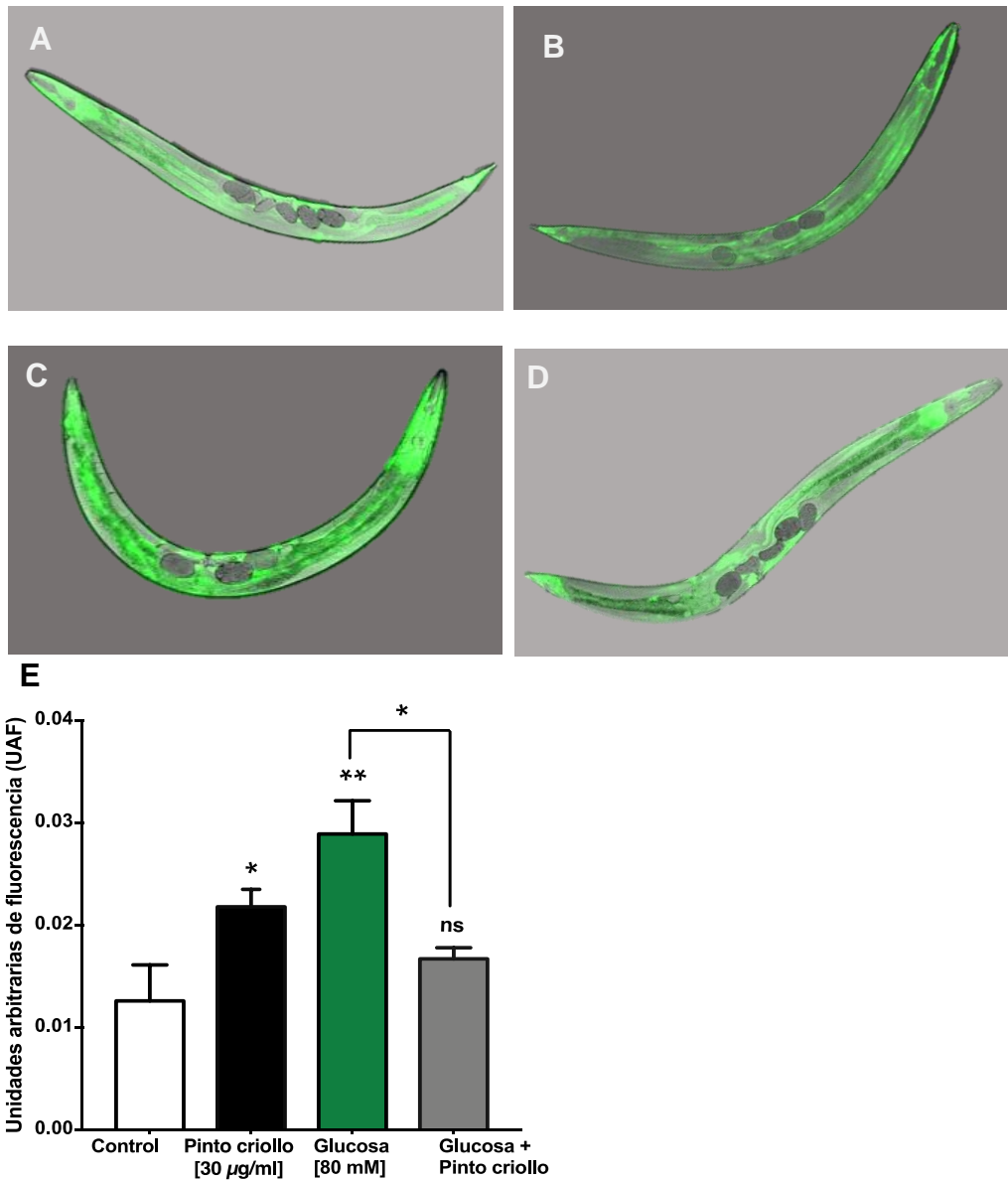


Figura 23. Efecto de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo sobre la expresión de *gst-4*. Expresión de *gst-4*:GFP, microscopia confocal 20X. A) Control, B) Pinto criollo 30 µg/mL, C) Glucosa 80 mM, D) Pinto criollo y glucosa E) Unidades arbitrarias de fluorescencia que corresponden a cada tratamiento. Las barras de error representan SD; *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001, t Student (tratamientos vs. control; glu vs. glu+ pinto criollo) n=3, 20°C; 48 horas.

7.11 Una dieta rica en antioxidantes presentes en el frijol pinto criollo disminuye la oxidación de lípidos y proteínas

Para saber si los compuestos fenólicos del extracto metanólico del frijol tenían un efecto tardío el cual comprende los mecanismos de prevención y/o reparación del daño oxidativo de biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN. En nuestras condiciones estudiadas, de manera inesperada, con el extracto del frijol las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se ven aumentadas casi el doble con respecto al control. En condiciones de estrés oxidante, la glucosa aumenta la concentración de TBARS casi 4 veces más, de manera interesante, en presencia del extracto del frijol en esta misma condición, se ven disminuidas las TBARS alrededor de 4 veces en comparación con las condiciones de estrés oxidante, incluso a un nivel similar al control (Figura 24).

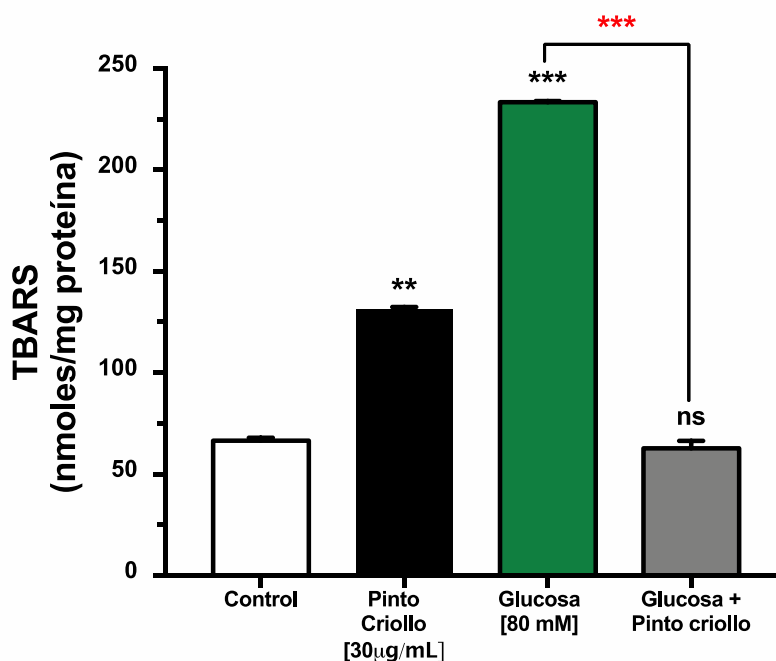


Figura 24. Efecto del extracto del frijol en la peroxidación de lípidos. Las barras de error representan SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, t Student (tratamientos vs. Control; Glu vs. Glu+ Pinto criollo). $n=3$; 20°C, 11 días.

Por otra parte, para evaluar el efecto de los compuestos fenólicos del extracto metanólico del frijol sobre la oxidación de proteínas se cuantificó el contenido de grupos carbonilo en *C. elegans*. Inicialmente, en el grupo de nematodos que fue expuesto al extracto del frijol se disminuyó el contenido de grupos carbonilo casi 6 veces comparándolo con la condición control. Aquellos nematodos con dietas altas de glucosa (80mM) aumentaron 1.5 veces más el contenido de grupos carbonilo. De manera interesante, en esta misma condición de estrés al adicionar el extracto del frijol pinto criollo el contenido de grupos carbonilo disminuyó significativamente casi en un 40% (Figura 25).

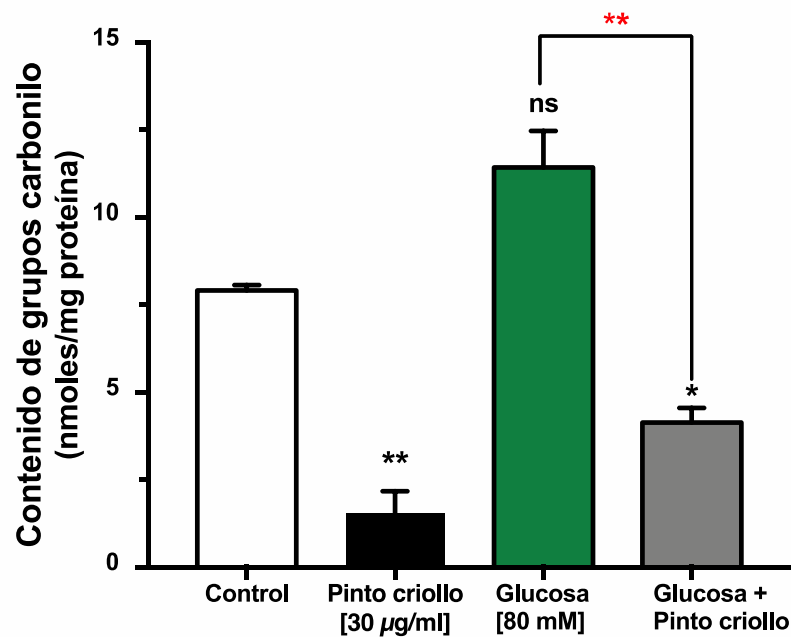


Figura 25. Efecto del extracto del frijol en la carbonilación de proteínas. Las barras de error representan SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, t Student (tratamientos vs. Control; Glu vs. Glu+ Pinto criollo). $n=3$; 20°C, 11 días.

Se ha descrito que CEP-1 es el ortólogo funcional del supresor de tumores p53 en *C. elegans* y que media respuestas de estrés múltiples, incluido el estrés oxidante (Vousden y Lane, 2007). Finalmente, para determinar si los polifenoles del extracto del frijol interactúan con el ortólogo del nematodo p53/CEP-1, probamos el efecto del extracto en mutantes de CEP-1. Inicialmente, al añadir el extracto del frijol pinto criollo la esperanza de vida de *C. elegans* tiene un comportamiento similar comparado con el grupo control, por otro lado, con dietas altas de glucosa la esperanza de vida de *C. elegans* se ve suprimida aproximadamente un 40%, en aquellos nematodos con una dieta de glucosa y polifenoles el comportamiento también se muestra muy similar en comparación con su respectivo control (glucosa 80 mM) (Figura 25).

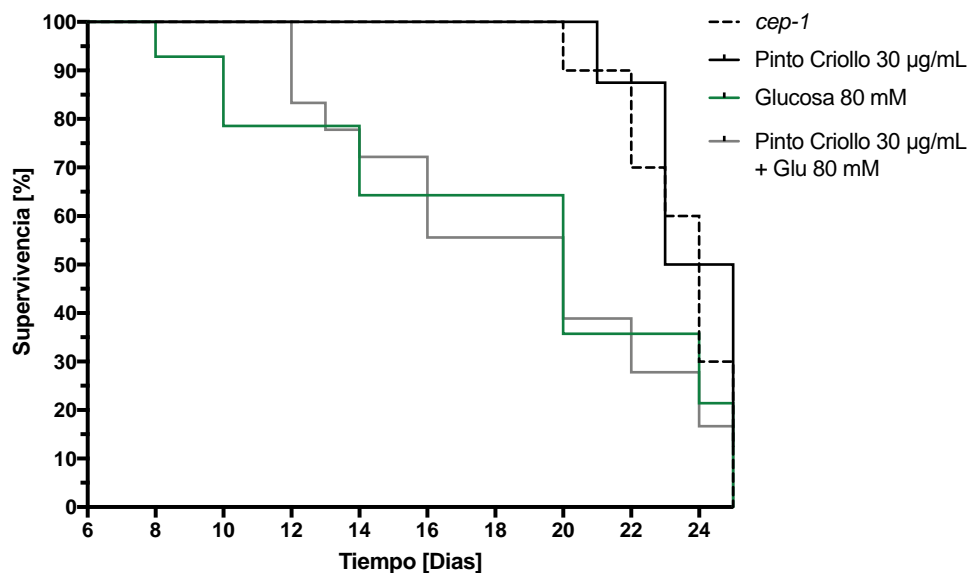


Figura 26. Exposición a compuestos fenólicos del extracto del frijol pinto criollo en la mutante *cep-1/P53*. Gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier, n=10; 20 individuos, 20.

VIII. DISCUSIÓN

El frijol (*Phaseolus* spp.) es conocido por ser una fuente importante de proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales, ácidos grasos insaturados (Celmeli y col., 2018). También contienen gran cantidad de sustancias bioactivas, como los polifenoles, considerados agentes antioxidantes. Sin embargo, los efectos de los antioxidantes en la salud que se atribuyen en muchos estudios se basan principalmente en estudios *in vitro*, que no necesariamente reflejan los mecanismos fisiológicos *in vivo*.

En nuestro estudio, se utilizó el extracto metanólico de las semillas del frijol pinto de la variedad criolla y comercial, y como organismo modelo se utilizó al nematodo *Caenorhabditis elegans*, para entender los fenómenos biológicos particulares de nuestro interés. Los nematodos se cultivaron desde la etapa larval L4 hasta alcanzar su estado adulto en medios de crecimiento suplementados con 30 µg/mL de fenoles totales de un extracto del frijol pinto de la variedad criolla y comercial, con glucosa 80 mM y una combinación con el extracto y glucosa.

Inicialmente, para comprobar y justificar su actividad antioxidante y los beneficios a la salud que se han atribuido al frijol como reducción de enfermedades crónico-degenerativas, se determinó el contenido de fenoles totales (figura 7). El frijol pinto de la variedad criolla mostró tener un contenido de fenoles totales de 3.4 mgEAG/g, mayor que el frijol pinto comercial con un contenido de 1.91 mgEAG/g, sin embargo, Rubio-Landa., (2017) (datos no publicados) demostró lo contrario, ya que el contenido de fenoles totales para el frijol pinto de la variedad criolla fue de 1.10 mgEAG/g y la variedad comercial de 3.77 mgEAG/g, esto puede ser por varios factores que se atribuyan al cambio en el contenido de fenoles totales como el tiempo de uso de las semillas y duración en la extracción por la temperatura, ya que estas moléculas son afectadas por su naturaleza termosensibles (Quiñones y

col.,2012). Además, en ese mismo estudio se identificaron ácidos fenólicos en la semilla del frijol Pinto criollo como el ácido Quínico, ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeíco y ácido p-cumárico, los cuales pueden ejercer un efecto antioxidante en la semilla.

La capacidad antioxidante es determinada por interacciones sinérgicas entre diferentes compuestos y por el modo de acción de cada uno, por lo tanto, es necesario evaluar esta capacidad antioxidante por diferentes estrategias, por lo tanto en este estudio se determinó la capacidad antioxidante por tres métodos: DPPH•, ABTS^{•+} y FRAP. El extracto del frijol pinto comercial tuvo excelentes actividades antioxidantes *in vitro* a través de la eliminación de radicales como el DPPH• y ABTS^{•+}. Curiosamente, el extracto del frijol pinto criollo tuvo la mayor actividad antioxidante en la reducción de Hierro (FRAP), sugiriendo una alta posibilidad de tener efectos antioxidantes *in vivo* (Prior y col., 2006) (Figura 8). Esto indica que la semilla del frijol pinto comercial tiene mas compuestos sencillos, como ácidos fenólicos, que fácilmente entran al sitio activo del radical y lo pueden neutralizar, además presenta compuestos complejos como los flavonoides con capacidad de neutralizar radicales como el ABTS^{•+}, sin embargo, estos radicales son artificiales y no reflejan de manera adecuada la situación que se presenta en condiciones *in vivo*.

Por otro lado, se sabe que las diferencias en la biodisponibilidad de los polifenoles es debida a su gran diversidad estructural entre ellos (Ogasawara y col., 2011; Park y col., 2011). De esta manera, los ácidos fenólicos son fácilmente absorbidos, junto con las catequinas, flavanonas y glucósidos de quercetina mientras que la absorción de polifenoles de tamaño superior, como son las proantocianidinas, es muy baja (Little y col., 2012), se sabe que el frijol pinto criollo presenta ácidos fenólicos que pueden ser fácilmente absorbidos, como el ácido gálico. En este contexto, se determinó su biodisponibilidad en *C. elegans* por lo que confirmamos que estos compuestos son biodisponibles para *C. elegans* con una concentración dependiente de la acumulación en los animales, mostrando una mayor

concentración de estos compuestos con una concentración de 30 µg/mL y 40 µg/mL de fenoles totales en el medio, sin mostrar diferencia en la absorción entre estas concentraciones (Ver figura 10), esto nos sugiere que el nematodo contiene compuestos presentes en el extracto metanólico del frijol ya que estos se deben absorber para ejercer efectos protectores.

Determinamos si en nuestras condiciones de laboratorio la glucosa también generaba ROS y principalmente si las condiciones con el extracto del frijol pinto criollo podrían actuar como antioxidantes directos, en nuestras condiciones de trabajo la glucosa genera especies reactivas de Oxígeno, lo cual se relaciona con lo reportado por Ray y col., 2012; Schlotterer y col., 2009. En estas mismas condiciones, la adición del extracto del frijol generó una disminución en la formación de ROS, por lo que estos resultados demostraron que el extracto crudo puede actuar contra el estrés oxidante debido a su capacidad de eliminación de ROS ya sea cediendo un H⁺ a la molécula reactiva o formando intermediarios estables por la resonancia del electrón desapareado dentro de los anillos aromáticos contenidos en sus estructuras (Figura 10). Además, Brand y col., 2004 demostraron que algunos polifenoles como la quercetina y ácido gálico pueden quelar iones metálicos de transición como el hierro o el cobre, evitando así la formación de las ROS producidas por la reacción de Fenton, sin embargo, no hay estudios que demuestren esto en el extracto crudo de *Phaseolus vulgaris*, sin embargo el extracto metanólico del frijol pinto criollo contiene ácido gálico por lo que probablemente se realice el mismo mecanismo.

En los ensayos antioxidantes *in vivo*, primero, confirmamos que los nematodos alimentados con el extracto del frijol pinto criollo y comercial mostraron una resistencia a estrés oxidante inducido con altas concentraciones de glucosa y químicamente con peróxido de hidrógeno (H₂O₂), de manera interesante, el extracto del frijol pinto criollo mostró un aumento en la longevidad. El aumento en la supervivencia de los nematodos puede atribuirse a los componentes químicos en extractos con capacidades para eliminar los radicales libres para reducir el

estrés oxidativo inducido por H₂O₂ y glucosa en *C. elegans* (ver figura 11), que estuvo en buena concordancia con los datos de antioxidantes *in vitro* de la prueba FRAP, considerado un método adecuado para evaluar la capacidad de algún compuesto para modular el tono REDOX de células y tejidos (García, 2005). Estos datos en conjunto, sugieren que el consumo del extracto del frijol aumenta directamente la vida útil de *C. elegans* y plantea la posibilidad de retrasar el proceso de envejecimiento celular en humanos a base de los compuestos fenólicos que ejercen una acción antioxidante, esto a su vez, puede retrasar las enfermedades, incluso se pueden prevenir y tratar más eficientemente.

Hasta este punto, el aumento en la longevidad y la resistencia al estrés oxidante de *C. elegans* al exponerse al extracto del frijol se atribuye a la presencia de compuestos bioactivos como los polifenoles, ya que diferentes estudios realizados en este modelo alimentado con diferentes extractos vegetales o polifenoles aislados de los mismos demuestran que hay un aumento en la longevidad y que esto se asocia a la participación de estos compuestos (Cheng y col., 2014) ya que tienen propiedades antioxidantes directas y también pueden actuar como antioxidantes indirectos debido a la fuerte naturaleza electrofílica de sus formas oxidadas, que pueden participar en las reacciones de conjugación electrofílica (Birringer., 2011; Nakamura y col., 2010). Tomando esto en consideración, los compuestos polifenólicos pueden ejercer su capacidad antioxidante indirecta modulando vías de señalización que están involucradas tanto en el envejecimiento como en la resistencia al estrés oxidante, como la vía de señalización de la insulina /IGF. Se sabe que la reducción de la esperanza de vida en *C. elegans* está regulada por esta vía de señalización y que algunos compuestos fenólicos tienen como diana esta vía IIS (Kitaoka y col., 2016; Koch y col., 2014), determinamos si una dieta con el extracto crudo del frijol pinto criollo podía actuar en los componentes de esta vía de señalización. Encontramos que los nematodos con una baja actividad en DAF-2 que fueron alimentados con el extracto del frijol aumentaron la esperanza de vida de *C. elegans*, y en aquellos expuestos a dietas

altas de glucosa con la adición del extracto del frijol se logró observar una resistencia al estrés oxidante inducido por glucosa (Ver figura 12). Para la mutación en *age-1*, la resistencia al estrés oxidante aumenta considerablemente al adicionar el extracto del frijol, observando una extensión en la supervivencia (Ver figura 13). Estos resultados nos sugieren que los compuestos fenólicos encontrados en el extracto crudo del frijol no actúan a nivel del receptor ni de la fosfatidilinositol-3-OH quinasa de IIS para proporcionar el aumento en la resistencia al estrés oxidante, por lo tanto, probablemente tengan otra diana de acción. Sin embargo, para proporcionar una extensión en la vida, estos compuestos polifenólicos actúan a nivel de la quisasa AGE-1. Así mismo, reportes han documentado que los polifenoles encontrados en los extractos de algunos vegetales como en las hojas del té verde pueden actuar inhibiendo al gen *age-1*, lo cual fue confirmado con un aumento en la translocación del factor de transcripción DAF-16 (Büchter y col., 2013).

En este mismo contexto, se sabe que la glucosa acorta la esperanza de vida de *C. elegans* al evitar que DAF-16 (homólogo al factor de transcripción de mamíferos FoxO) regule la expresión de genes diana específicos (Lee y col., 2009). Encontramos que los nematodos alimentados con el extracto del frijol en mutantes *daf-16*, en ambas condiciones no muestra diferencia en la esperanza de vida (Ver figura 14). Así mismo, observamos que la traslocación hacia el núcleo de *daf-16* aumentó considerablemente con el extracto del frijol, sin embargo, con una exposición del extracto del frijol y glucosa se observó que, si bien, se lograba aumentar la traslocación hacia el núcleo, la presencia de este agente oxidante que involucra la regulación negativa de *daf-16* (Alcántar-Fernández y col., 2018). En conjunto, estos datos sugieren que, los compuestos fenólicos que se encuentran en el extracto del frijol actúan como moduladores genéticos sobre DAF-16 y que probablemente la extensión de la esperanza de vida sea por este mecanismo, así como la resistencia al estrés oxidante ya que se ha informado que para diferentes flavonoides como la quercetina (Kampkötter y col., 2007), apigenina (Kawasaki y

col., 2010) y kaempferol (Kampkötter y col., 2007), que también pueden estar presentes en frijoles pintos, promueven la translocación nuclear de DAF-16.

Hay otros factores que se han relacionado con la resistencia al estrés celular o la longevidad que se podría esperar sean modulados por los compuestos fenólicos. Entre estos se encuentra el factor de transcripción SKN-1 (homólogo al factor de transcripción de mamíferos Nrf2) que es responsable de modular genes que pueden responder al estrés oxidante (Ndhlala y col., 2010; Smirnoff y col., 2000). En nuestro estudio, encontramos que el tratamiento con el extracto del frijol pinto criollo (30 µg/mL) cambió la localización del factor de transcripción hacia el núcleo, lo que demuestra que SKN-1 está activado por los compuestos presentes en el extracto del frijol (Figura 16). Con glucosa (80mM) se ve disminuida esta traslocación y no logra aumentar con el extracto del frijol. Esto nos indica que tal vez estos polifenoles deben poseer características estructurales similares para activar esta vía de señalización. Por lo tanto, al analizar los efectos moleculares de los polifenoles, la investigación de vías de señalización involucradas en la respuesta al estrés y el envejecimiento es crucial, con DAF-16 como una de ellas, puede resultar en una mayor resistencia al estrés y longevidad en *C. elegans*. Debido al importante papel de esta vía para la farmacología y la toxicología, los efectos moduladores de los polifenoles en la dieta son cada vez más importantes (Kampkötter y col., 2007; Kawasaki y col., 2010).

Con la excepción de las enzimas antioxidantes de las ROS, el GSH actúa como la principal defensa celular contra los oxidantes (Matés, 1999). Investigamos si el extracto del frijol inducía un efecto sobre las reservas de glutatión. En nuestro estudio, encontramos que los niveles totales de glutatión, GSH y GSSG no aumentaron en los nemátodos alimentados con el extracto del frijol pinto criollo, lo que sugiere que los gusanos alimentados con el extraco, si bien, no están experimentando estrés oxidante, no aumentan las reservas del glutatión, sin embargo, con glucosa aumentan estas reservas los cual indican que están experimentando estrés oxidante, dato que concuerda con Alcantar y col., (2018)

en donde los los niveles totales de glutatión, GSH y GSSG aumentaron significativamente en los nemátodos que crecieron en las concentraciones desde 20 a 100 mM de glucosa. Curiosamente, en esta misma condición y además con el extracto del frijol estos valores se ven disminuidos a un nivel casi comparable con el control. La proporción de GSH / GSSG se mantuvo con la misma tendencia, lo que indica que los nematodos expuestos con el extracto crudo del frijol no inducen el sistema glutatión como un mecanismo de defensa contra el estrés oxidante.

En *Phaseolus vulgaris*., no ha sido reportado que los compuestos presentes en el extracto incrementen las enzimas antioxidantes, sin embargo, para otros modelos de plantas esto no ha sido totalmente esclarecido. En nuestro estudio, evaluamos la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), de manera interesante, una dieta rica en compuestos fenólicos (normalizados a 30 µg/mL) que se encontraban presentes en el extracto metanólico del frijol pinto criollo, incrementaron de manera significativa la actividad de SOD y CAT, lo que podría haber tenido una correlación con el factor de transcripción DAF-16 que se translocó hacia el núcleo y luego activó los genes blanco posteriores. Si bien, no existen reportes de este acontecimiento en el frijol, Luo y col, (2019) evaluaron las capacidades antioxidantes de extractos de hojas de olivo (EOL) y determinaron las actividades de las enzimas antioxidantes, como SOD y CAT también en *C. elegans*, observando un incremento en su actividad, de casi el doble con respecto al control. Probablemente ambos extractos presentan compuestos fenólicos en común lo que hace que se potencialice la actividad de estas enzimas, sin embargo, se sabe que el EOL contiene ácido clorogénico, al igual que el extracto del frijol pinto criollo, aunque aún no se han determinado todos los compuestos fenólicos presentes en estos extractos.

Además, la expresión de *sod-1* y *ctl-123* también se vio incrementada con el extracto del frijol, sin embargo, en condiciones de estrés se tiene un decremento en la expresión de SOD en presencia del extracto, al igual que con una mutación en *sod-12345* el aumento en la supervivencia puede deberse a la acción antioxidante directa de estos compuestos bioactivos. Esto nos sugiere, que los polifenoles encontrados en este extracto pueden inducir un aumento en la actividad de SOD y CAT, el cual puede ser interesante para prevenir a la célula ante un posible estrés que la comprometa. Esto puede relacionarse en parte, a que el frijol pinto criollo presenta ácidos fenólicos, como el ácido gálico (Rubio-Landa., 2017) el cuál se ha demostrado que tiene la capacidad de unirse a estas enzimas y aumentar su actividad antioxidante (Mendoza y col., 2017). Sin embargo, esto va de la mano con el incremento en la traslocación nuclear de factores transcripcionales como DAF-16 (FOXO) y SKN-1 (Nrf-2), que inducen enzimas de fase II como son las Superóxido Dismutasas y catalasas (Li y col., 2002).

A demás, una dieta con el extracto aumento la expresión de GST (Glutati6n-S-Transferasa), una enzima destoxicadora, esto nos sugiere que el extracto del frijol puede modular directamente la expresi6n de GST o posiblemente sea por la modulaci6n de SKN-1(Nrf-2), que se sabe que es regulada por este factor transcripcional (Li y col., 2002).

En nuestros experimentos, los niveles aumentados de TBARS y carbolinaci6n de prote6nas sugieren mayor da1o por estr6s oxidante en altas concentraciones de glucosa (80mM) por un exceso en la producci6n de radicales libres y la exposici6n con el extracto del frijol (30 µg/mL) disminuye considerablemente la oxidaci6n de est6s biomol6culas, lo que nos sugiere que el extracto del frijol puede proteger de la oxidaci6n por radicales libres a los l6pidos y prote6nas frente a un estado de estr6s oxidante. Sin embargo en condiciones sin estr6s, la disminuci6n de los grupos carbonilo podr6a encontrarse directamente relacionada con el aumento en la longevidad en *C. elegans*. De forma inesperada, los niveles de TBARS aumentados por el extracto del frijol pudieran sugerir un efecto pro-oxidante de los

compuestos presentes en el extracto, lo cual pudiera correlacionarse con las ROS generadas, que, aunque hubo una tendencia no fue significativa ($p < 0.05$), esto puede estar relacionado a que en los sistemas celulares los polifenoles pueden sufrir procesos de autooxidación a quinonas dando lugar a la formación de ROS, los cuales podrían actuar como oxidantes y estimular la expresión de enzimas a través del sistema Keap1/Nrf2/ARE (Chabert y col., 2014).

Continuando con el daño oxidativo, se sabe que el correcto mantenimiento y la duplicación de la información genética se ven constantemente obstaculizados por el estrés causado por daños oxidativos como resultado de especies reactivas de oxígeno intracelular. En respuesta a esto, las células activan las vías de control que conducen a la reparación del ADN, detención del ciclo celular transitorio para permitir el tiempo necesario para reparar lesiones genéticas comprometedoras o la apoptosis para desencadenar la desaparición de células dañadas genéticamente que podrían llegar a ser perjudiciales para todo el organismo (Gartnet y col., 2000). Se utilizó un ortólogo de la proteína supresora de tumores P53 (CEP-1, en *C. elegans*), en donde la esperanza de vida en los nematodos al añadir el extracto del frijol tuvo un comportamiento similar a las condiciones control. Aunque la inducción de estrés oxidante con glucosa suprime la extensión de la vida, el efecto con la adición del extracto no se ve extendida, lo que se propone que posiblemente el extracto del frijol puede actuar a nivel de daño en el ADN, ya que se sabe que p53 en *C. elegans* media múltiples respuestas al estrés oxidante y promueve la apoptosis inducida por daños en el ADN (Derry y col., 2001).

En nuestra investigación, hemos presentado evidencia de: 1) La resistencia al estrés inducido por glucosa 80 mM no necesariamente puede ser un efecto de estos compuestos como antioxidante directo, eliminando las especies reactivas de oxígeno o quelando iones metálicos de transición para evitar la formación de ROS producidas por las reacciones Fenton (Brand y col., 2004), si no, que además, esto puede ser un efecto indirecto derivado de otros procesos no estudiados, pero en los que la glucosa tiene un efecto, como los productos de glicación avanzada

(AGE)(12) o por una inducción de otras enzimas que actúan como destoxificadores de ROS. Sin embargo, en la protección de los polifenoles presentes en el extracto del frijol en lípidos y proteínas para evitar su oxidación, podría ser un efecto inicial del decremento en ROS intracelular en *C. elegans*, aunque en la protección de la oxidación de proteínas es un claro efecto de que estos compuestos actúan a este nivel de daño de la célula. 2) El aumento en la longevidad en *C. elegans* está relacionada con un efecto antioxidante indirecto del extracto del frijol pinto criollo ya que actúa como un modulador genético de factores transcripcionales que por consiguiente regularán enzimas antioxidantes de fase II, y que una baja en el contenido de grupos carbonilo puede también aumentar la esperanza de vida.

En esta investigación se propone el siguiente modelo del efecto de los polifenoles del frijol en la protección del estrés oxidante y la longevidad de *Caenorhabditis elegans*:

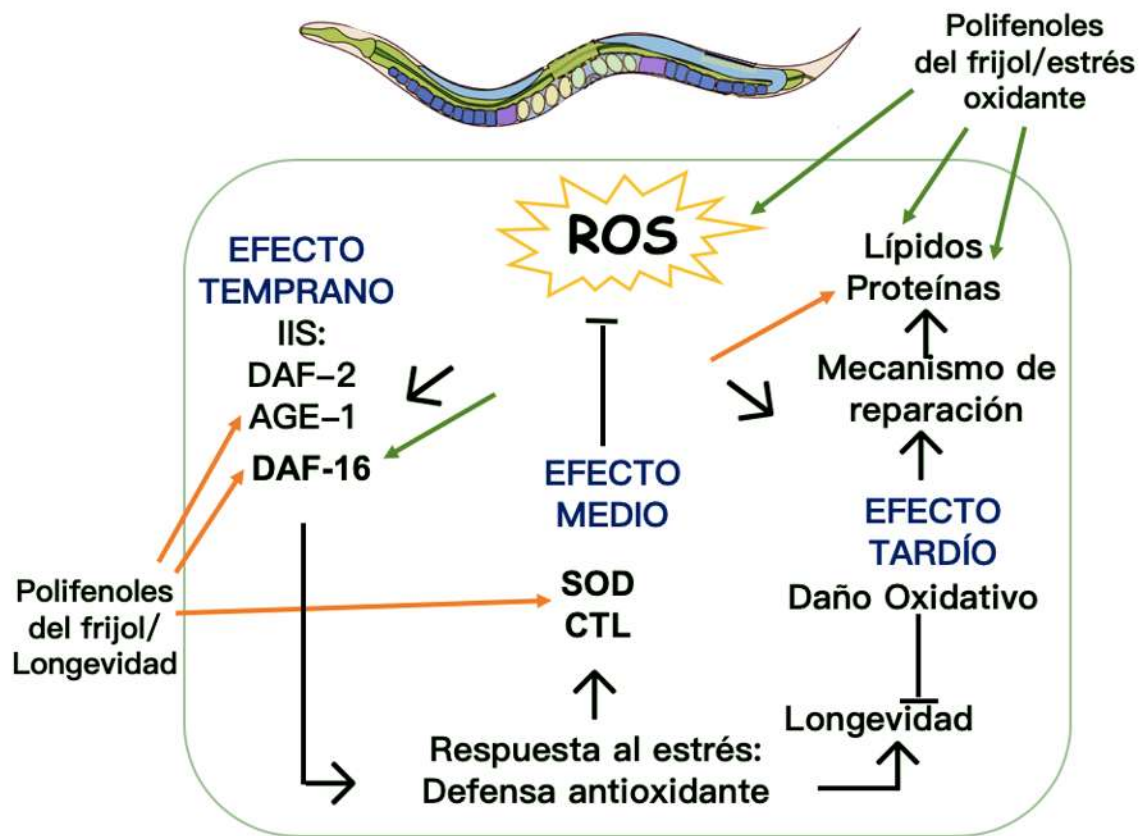


Figura 27. Modelo propuesto de la acción antioxidante de los polifenoles del extracto metanólico de *Phaseolus vulgaris* en *Caenorhabditis elegans*.

IX. CONCLUSIÓN

El frijol pinto criollo aumenta la longevidad de *C. elegans* y la resistencia al estrés oxidante por altas concentraciones de glucosa, a causa de una modulación genética en vías de señalización asociadas a la longevidad y disminuyendo la oxidación de proteínas.

X. PERSPECTIVAS

Los datos mostrados en nuestro estudio abordan nuevas preguntas acerca de los componentes tanto del extracto del frijol pinto criollo.

1. Determinar los compuestos fenólicos que intervienen en los procesos de protección y longevidad en *Caenorhabditis elegans*.
2. Evaluar la participación de los compuestos fenólicos del frijol pinto criollo en enfermedades crónico- degenerativas.
3. Uso de modelos de ratones para el estudio de enfermedades asociadas a estrés oxidante.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, J. A.; Rosales, R.; Navarrete, R.; López, E. Desarrollo de variedades mejoradas de frijol para condiciones de riego y temporal en México. *Agric. Tec. Méx.* **2000**, *26*, 79-98.

Acosta, J.A.; Kelly, J.D.; Gepts, P. Rebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm. *Crop. Sci.* **2007**, *47*, S44-S59

Adams, S.M.; Standridge, J.B.; What should we eat? Evidence from observational studies. *South. Med. J.* **2006**, *99*, 744–74.

Akillioglu, H.G.; Karakaya, S. Changes in total phenols, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and pinto beans after soaking, cooking, and *in vitro* digestion process. *Food. Sci. Biotechnol.* **2010**, *19*, 633–639.

Alcántar-Fernández, J.; Navarro, R.E.; Salazar-Martínez, A.M.; Pérez-Andrade, M.E.; Miranda-Ríos, J. *Caenorhabditis elegans* respond to high-glucose diets through a network of stress-responsive transcription factors. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0199888.

Altintas, O.; Park, S.; Lee, S.J.V. The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB Reports.* **2016**, *49*, 81-2.

An, J.H.; Blackwell T.K. SKN-1 links *C. elegans* mesodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes. Dev.* **2003**, *17*, 1882–1893.

Antoshechkin, I.; Sternberg, P.W. The versatile worm: genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 518-532.

Aregueta-Robles, U.; Fajardo-Ramírez, O.; Villela, L.; Gutiérrez-Urbe, J.; Hernández-Hernández, J.; López-Sánchez, R.C.; Scott, S.P.; Serna-Saldívar, S. Cytotoxic activity of a black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extract and its flavonoid fraction in both *in vitro* and *in vivo* models of lymphoma. *Rev. Inves. Clin.* **2018**, *70*, 32-39.

Ávalos, G.A.; Pérez-Urria, C.E. Metabolismo secundario de plantas. *Ser. Fisiol. Veg.* **2009**, *2*, 119–145.

- Avello, M.; Suwalsky, M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*. **2006**, 2, 161-172.
- Basso- Los, F.; Zielinski, A.; Wojeicchowski, J.P.; Nogueira, A.; Demiate. Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition. *Food Sci*. **2018**, 19, 63-71.
- Barbieri, M.; Bonafe, M.; Franceschi, C.; Paolisso, G. Insulin/IGF- I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2003**, 285, E1064–E1071.
- Barsyte, D.; Lovejoy, D.A.; Lithgow, G.J. Longevity and heavy metal resistance in *daf-2* and *age-1* long-lived mutants of *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* **2001**, 15, 627–634.
- Bauer, J.H.; Goupil, S.; Grber, G.B.; Helfand, S.L. An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 101, 12985.
- Benner, J.; Daniel, H.; Spanier, B. Glutathione peroxidase, intracellular peptidases and the tor complexes regulate peptide transporter PEPT-1 in *C. elegans*. *PLoS ONE* **2007**, 6, e25624.
- Becker, E.M.; Nissen, L.R.; Skibsted, L.H. Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. *Eu.r Food. Res. Technol.* **2004**, 219, 561–71.
- Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, 239, 70-76
- Birringer, M. Hormetics: dietary triggers of an adaptive stress response. *Pharm. Res.* **2011**, 28, 2680–94
- Blackwell, T. K.; Steinbaugh, M.J.; Hourihan, J.M.; Ewald, C.Y.; Isik, M. SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, 88, 290–301.
- Bonomini, F.; Rodella, L.F.; Rezzani, R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging. Dis.* **2015**, 6, 109-120.

Bowerman, B.; Eaton, B.A.; Priess, J.R. *skn-1*, a maternally expressed gene required to specify the fate of ventral blastomeres in the early *C. elegans* embryo. *Cell* **1992**, *68*, 1061–1075.

Brandt, K.; Christensen, L.P.; Hansen-Møller, J.; Hansen, S.L.; Haraldsdottir, J.; Jespersen, L. Health promoting compounds in vegetables and fruits: a systematic approach for identifying plant components with impact on human health. *Trend. Food. Sci. Technol.* **2004**, *15*, 384–93.

Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **1974**, *94*, 77-7.

Buege, J.A.; Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Met. Enzymol.* **1978**, *52*, 302-310.

C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*; a platform for investigating biology. *Science* **1998**, *282*, 2012-2018.

Cardador-Martinez, A.; Castano-Tostado, E.; Loarca-Pina, G. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1. *Food Addit. Contam.* **2002**, *19*, 62–69.

Celmeli, T.; Sari, H.; Canci, H.; Sari, D.; Adak, A.; Eker, T.; Toker, C. The nutritional content of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in comparison to modern varieties. *Agronomy* **2018**, *8*, 166.

Chabert, P.; Auger, C.; Pincemail, J.; Schini-Kerth, V.B. Overview of Plant-Derived Antioxidants. *Sys. Bio./Free. Rad. Antiox.* **2014**, pp. 4005-4022.

Chávez-Mendoza, C.; Sánchez, E. Bioactive compounds from Mexican varieties of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): implications for health. *Molecules* **2017**, *22*, 1360.

Chen, Y.; McGee, R.; Vandemark, G.; Brick, M.; Tompson, H. Dietary fiber analysis of four pulses using AOAC: implications for human health. *Nutrients* **2016**, *8*, 829.

Chen, P.X.; Dupuis, J.H.; Marcone, M.F.; Pauls, P.K.; Liu, R.; Liu, Q.; Tang, Y.; Zhang, B.; Tsao, R. Physicochemical properties and in vitro digestibility of cooked regular and nondarkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their effects on bioaccessibility, phenolic composition, and antioxidant activity. *J. Agric. Food. Chem.* **2015**, *63*, 10448-10458.

Chen, C.; Kong, A.T. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *Trends. Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 318–326.

Cheng, S.C.; Li, W.H.; Shi, Y.C.; Yen, P.L.; Lin, H.Y.; Liao, H.C.; Chang, S.T. Antioxidant Activity and Delayed Aging Effects of Hot Water Extract from *Chamaecyparis obtuse* var. *formosana* Leaves. *J. Sci. Food. Agric.* **2014**, *62*, 4159–4165.

Choi, S.S. High glucose diets shorten lifespan of *Caenorhabditis elegans* via ectopic apoptosis induction. *Nutr. Res. Pract.* **2011**, *5*, 214–218.

Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J.P.; Cimanga, K.; Poel, B.V.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J.; Berghe, D.V. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* **1988**, *61*, 71–76.

Croft, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1998**, *854*, 435–442.

Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1001–43.

Dalle-Donne, I.; Colombo, R.; Giustarini, D.; Rossi, R. Protein carbonylation in human diseases. *Trends. Mol. Med.* **2003**, *9*, 169–176.

Derry, W.B.; Putzke, A.P.; Rothman, J.H. *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science* **2001**, *294*, 591–595.

Dinkova-Kostova, A.T.; Holtzclaw, W.D.; Cole, R.N.; Itoh, K.; Wakabayashi, N. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 908–13.

Dinkova-Kostova, A.T.; Talalay, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol. Nutr. Food. Res.* **2008**, *52*, S128–38.

Doonan, R.; McElwee, J.; Matthijssens, F.; Walker, G.; Houthoofd, K.; Back, P.; Matscheski, A.; Vanfleteren, G.D. Against the oxidative damage theory of aging: Superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes. Dev.* **2008**, *22*, 3236–3241.

Dueñas, M.; Sarmiento, T.; Aguilera, Y.; Benitez, V.; Molla, E.; Esteban, R.M.; Martín-Cabrejas, M.A. Impact of cooking and germination on phenolic composition and dietary fibre fractions in dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and lentils (*Lens culinaris* L.). *Food Sci Technol.* **2016**, *19*, 63-71.

Đuračková, Z. Free Radicals and Antioxidants for Non-Experts. *Sys. Biol. Free Rad. Antiox.* **2014**, Pp., 3-38.

Drago, M.E.; López, M.; Espuñes, T.R. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Rev. Mex.Cie. Farm.* **2006**, *37*, 58-68.

Espinosa-Diez, C.; Miguel, V.; Mennerich, D.; Kietzmann, T.; Sánchez-Pérez, P.; Cadenas, P.; Lamas, S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Red. Biol.* **2015**, *6*, 183-197.

Felix, M.A.; Barkoulas, M. Robustness and flexibility in nematode vulva development. *Tred. Gen.* **2012**, *28*, 185-195.

Fernández, E.,; Gallus, S.; Vecchia, C. Nutrition and cancer risk: an overview. *J. Br. Menopause. Soc.* **2006**, *12*, 139–142.

Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 97–112.

García, F.J. Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis doctoral de la Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia, España. **2005**, Pp., 18.

Garigan, D.; Hsu, A.L.; Fraser, A.G.; Kamath, R.S.; Ahringer, J.; Kenyon, C. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* **2002**, *161*, 1101–1112.

Gartner, A.; Milstein, S.; Ahmed, S.; Hodgkin, J.; Hengartner, M. O. A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage-induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans*. *Mol. Cell.* **2000**, *5*, 435–443.

Gepts, P. *Phaseolus vulgaris* (Beans). *Encyc. Gen.* **2001**, Pp., 1444-1445.

Giusti, F.; Caprioli, G.; Ricciutelli, M.; Vittori, S.; Sagratini, G. Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode

array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. *Food. Chem.* **2017**, *221*, 689-697.

Hall, C.; Hillen, C.; Robinson, J.G. Composition, Nutritional Value, and Health Benefits of Pulses. *Cer. Chem.* **2017**, *94*, 11-31.

Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* **1996**, *16*, 33–50.

Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. *Bio. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1147-1150.

Halliwell, B.; Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, *57*, 715S–724S.

Henderson, S.T.; Johnson, T.E. *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 1975–1980.

Honda, Y.; Honda, S. The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* **1999**, *13*, 1385–1393.

Hsu, A.L.; Murphy, C.T.; Kenyon, C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* **2003**, *300*, 1142–1145.

Huber, K.; Brigide, P.; Bretas, E.B.; Canniatti-Brazaca, S.G. Phenolic acid, flavonoids and antioxidant activity of common brown beans (*Phaseolus vulgaris* L.) before and after cooking. *J. Nutr. Food Sci.* **2016**, *6*, 1–7.

Hu, P.J. Dauer. In WormBook, The *C. elegans* Research Community, ed. 10.1895/wormbook.1.144.1, **2007**, <http://www.wormbook.org>.

Jaiswal, A.K. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *36*, 1199–1207.

Jenkins, D.J.A.; Kendall, C.W.C.; Augustin, L.S.A.; Mitchell, S.; Sahye- Pudaruth, S.; Mejia, S.; Chiavaroli, L.; Mirrahimi, A.; Ireland, C.; Bashyam, B. Effect of legumes as part of a low glycemic index diet on glycemic control and cardiovascular risk factors in type 2 diabetes mellitus. *Arch. Intern. Med.* **2012**, *172*, 1653.

Kampkötter, A.; Nkwonkam, C.G.; Zurawski, R.F.; Timpel, C.; Chovolou, Y.; Wätjen, W.; Kahl, R. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin

on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology* **2007**, *243*, 113-123.

Kampkötter, A.; Nkwonkam, C.; Zurawski, R.F.; Timpel, C.; Chovolou, Y.; Wätjen, W.; Kahl, R. Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Arch. Toxicol.* **2007**, *81*, 849-858.

Kaspar, J.W.; Niture, S.K.; Jaiswal, A.K. Nrf2:Keap1 signaling in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *471*, 304-309.

Katic, M.; Kahn, C.R. The role of insulin and IGF-1 signaling in longevity. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 320–343.

Kawasaki, I.; Jeong, M.H.; Oh, B.K.; Shim, Y.H. Apigenin inhibits larval growth of *Caenorhabditis elegans* through DAF-16 activation. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 3587–3591.

Kenyon, C.; Chang, J.; Gensch, E.; Rudner, A.; Tabtiang, R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **1993**, *366*, 461–464.

Khlebnikov, A.I.; Schepetkin, I.A.; Domina, N.G.; Kirpotina, L.N.; Quinn, M.T. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1749–1770.

Kimura, K.D.; Tissenbaum, H.A.; Liu, Y.; Ruvkun, G. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **1997**, *277*, 942–946.

Kitaoka, S.; Morielli, A.D.; Zhao, F.Q. FGT-1-mediated glucose uptake is defective in insulin/IGF-like signaling mutants in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Open Bio.* **2016**, *6*, 576-585.

Koch, K.; Haverman, S.; Büchter, C.; Wätjen, W. *Caenorhabditis elegans* as model system in pharmacology and toxicology: Effects of flavonoids on Redox-Sensitive signaling pathways and ageing. *Sci world J.* **2014**, *2014*, 920398.

Ladizinsky, G. Plant evolution under domestication. *Kluwer Ac. Pub.* **1998**, Pp. 256.

Lassen, N.; Black, W.J.; Estey, T.; Vasiliou, V. The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2008**, *19*, 100–112.

Lee, S.J.; Murphy, C.T.; Kenyon, C. Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell. Metab.* **2009**, *10*, 379–391.

Li, J.; Lee, J.M.; Johnson, J.A. Microarray analysis reveals an antioxidant responsive element-driven gene set involved in conferring protection from an oxidative stress-induced apoptosis in IMR-32 cells. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 388–94.

Lin, K.; Dorman, J.B.; Rodan, A.; Kenyon, C.; *daf-16*: an HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* **1997**, *278*, 1319–1322.

Lin, K.; Hsin, H.; Libina, N.; Kenyon, C. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 139–145.

Luersen, K.; Stegehake, D.; Daniel, J.; Drescher, M.; Ajonina, I.; Ajonina, C. The glutathione reductase GSR-1 determines stress tolerance and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* **2013**, *8*, 60731.

Luo, S.; Jiang, X.; Jia, L.; Tan, C.; Li, M.; Yang, Q.; Du, Y.; Ding, C. In vivo and In vitro activities of methanol extracts from olive leaves on *Caenorhabditis elegans*. *Molecules* **2019**, *24*, 704.

Luthria, D.L.; Pastor-Corrales, M.A. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *J. Food. Comp. An.* **2006**, *19*, 205–211.

Margis, R.; Dunand, F. K.; Margis-Pinheiro, M. Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview,” *The FEBS Journal.* **2008**, *275*, 3959–3970.

Matés, J.M.; Pérez-Gómez, C.; Núñez-de Castro, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* **1999**, *32*, 595–603.

Mendler, M.; Schlotterer, A.; Morcos, M.; Nawroth, P.P. Understanding diabetic polyneuropathy and longevity: what can we learn from the nematode *Caenorhabditis elegans*? *Exp. Clin. Endoc. Diab.* **2012**, *120*, 182–183.

Meister, A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 17205–8.

Messina, V. Nutritional and health benefits of dried beans. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, *100*, 437S–442S.

Mondoux, M.A.; Love, D.C.; Ghosh, S.K.; Fukushige, T.; Bond, M.; Weerasinghe, G.R. O-linked-N-acetylglucosamine cycling and insulin signaling are required for the glucose stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **2011**, *188*, 369-382.

Mojica, L.; Chen, K.; Mejía, E.G. Impact of commercial precooking of common bean (*Phaseolus vulgaris*) on the generation of peptides, after pepsin-pancreatin hydrolysis, capable to inhibit dipeptidyl peptidase-IV. *J. Food. Sci.* **2015**, *80*, H188-H198.

Mojica, L.; Luna-vital, D.A.; González, E.; Mejía, D. Characterization of peptides from common bean protein isolates and their potential to inhibit markers of type-2 diabetes, hypertension and oxidative stress. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 2401-2410.

Moon, J.; Shibamoto, T.; Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1655–1666.

Mudryj, A.N.; Yu, N.; Aukema, H.M.) Nutritional and health benefits of pulses. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2014**, *39*, 1197-204.

Murakami, S.; Johnson, T.E. A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **1996**, *143*, 1207– 1218.

Murphy, C.T.; McCarroll, S.A.; Bargmann, C.I.; Fraser, A.; Kamath, R.S.; Ahringer, J.; Li, H.; Kenyon, C. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **2003**, *424*, 277–283.

Nakamura, Y.; Miyoshi, N. Electrophiles in foods: the current status of isothiocyanates and their chemical biology. *Bio. Biot. Bioch.* **2010**, *74*, 242–55.

Ndhlala, A.R.; Moyo, M.; Van, S.J. Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? *Molecules* **2010**, *15*, 6905–30.

Ngoh, Y.Y.; Gan, C.Y. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and alfa-amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chem.* **2016**, *190*, 331-337.

- Nioi, P.; McMahon, M.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Hayes, J.D. Identification of a novel Nrf2 regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H: quinine oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem. J.* **2003**, *374*, 337–348.
- Ogg, S.; Paradis, S.; Gottlieb, S.; Patterson, G.I.; Lee, L.; Tissenbaum, H.A.; Ruvkun, G. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* **1997**, *389*, 994–999.
- Oliveira, R. P.; Porter, J.; Dilks, K.; Landis, J.; Ashraf, J. Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell* **2009**, *8*, 524–541.
- Oseguera, M.E.; Gonzalez, E.; Sivaguru, M.; Amaya, S.L. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein-derived peptides increased insulin secretion, inhibited lipid accumulation, increased glucose uptake and reduced the phosphatase and tensin homologue activation *in vitro*. *J. Funct. Foods.* **2016**, *27*, 160-177.
- Papa, R.; Nanni, L.; Sicard, D.; Rau, D.; Attene, G. The evolution of genetic diversity in *Phaseolus vulgaris* L. *In: Darwin's Harvest: New Approaches to the Origins, Evolution, and Conservation of Crops.* Columbia University Press. **2006**, pp, 121-142.
- Parr, A.J.; Bolwell, G.P. Phenols in the plant and in man The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Agric. Food. Chem.* **2002**, *80*, 985.
- Pedrosa, M.M.; Cuadrado, C.; Burbano, C.; Muzquiz, M.; Cabellos, B.; Olmedilla-alonso, B.; Asensio-vegas, C. Effects of industrial canning on the proximate composition, bioactive compounds contents and nutritional profile of two Spanish common dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem.* **2015**, *166*, 68-75.
- Peña-Montes, D.; Cervantes-Huerta, M.; Ríos-Silva, M.; Trujillo, X.; Huerta, M.; Noriega-Cisneros, R.; Salgado-Garciglia, R.; Saavedra-Molina, A. Protective effect of the Hexanic Extract of *Eryngium carlinae* Inflorescences In Vitro, in Yeast, and in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Rats. *Antiox.* **2019**, *8*, 73.
- Peña-Valdivia, C.; Trejo, C.; Celis-Velazquez, R.; López, A. Wild beans (*Phaseolus vulgaris* L.) reaction to planting depth. *Rev.Mex.Cienc.Agríc.* **2013**, *14*, 89-102.
- Pietsch, K.; Saul, N.; Menzel, R.; Stürzenbaum, S.R.; Steinberg, C.E.W. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by *age-1*, *daf-2*, *sek-1* and *unc-43*. *Biogerontology* **2009**, *10*, 565–578.

Prior, R.L.; Wu, X. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic. Res.* **2006**, *40*, 1014-1028.

Quiñones, M.; Miguel, M.; Aleixandre, A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria : Órgano Oficial de La Sociedad Española de Nutrición Parenteral Y Enteral* **2012**, *27*, 76-89.

Ramírez-Jiménez, A.K.; Reynoso, R.; Tejero, M.E.; León, F.; Loarca, G. Potential role of bioactive compounds of *Phaseolus vulgaris* L. on lipid-lowering mechanisms. *Food Res. Int.* **2015**, *76*, 92–104.

Ratman, D.V.; Ankola, D.D.; Bhardwaj, V.; Sahana, D.K.; Kumar, M.N.V.R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy, a pharmaceutical perspective. *J Control Release* **2006**, *113*, 189–207.

Ray, P.D.; Huang, B.W.; Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* **2012**, *24*, 981-990.

Reverri, E.J.; Randolph, J.M.; Kappagoda, C.T.; Park, E.; Edirisinghe, I.; Burton-Freeman, B.M. Assessing beans as a source of intrinsic fiber on satiety in men and women with metabolic syndrome. *Appetite* **2017**, *118*:75-81.

Rodriguez, M.; Snoek, L.B.; Bono, M.; Kammenga, J.E. Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging. *Trends Gen.* **2013**, *29*, 367-374.

Rossi, R. Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clin. Chem.* **2002**, *48*, 5742–5753.

Rubio-Landa, M. Contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* en frijol criollo y comercial bajo diferentes métodos de cocción. Tesis de maestría. **2017**.

Rui, X.; Boye, J.I.; Simpson, B.K.; Prasher, S.O. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of *Phaseolus vulgaris* bean hydrolysates effects of different thermal and enzymatic digestion treatments. *Food Res. Int.* **2012**, *49*, 739-746.

Sakamoto, T.; Maebayashi, K.; Nakagawa, Y.; Imai, H. Deletion of the four phospholipid hydroperoxide genes accelerates aging in *Caenorhabditis elegans*. *Gen Cells* **2014**, *19*, 778-7792.

Salih, D.A.; Brunet, A. FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20*, 126–136.

Sathe, S.K.; Deshpande, S.S. BEANS. *Food sci. nut.* **2003**, *2*, 403-412.

Schlotterer, A.; Kukudov, G.; Bozorgmehr, F.; Hutter, H.; Du, X.; Oikonomou, D. *C. elegans* as model for the study of high glucose- mediated life span reduction. *Diabetes* **2009**, *58*, 2450-2456.

Sena, L.A.; Chandel, N.S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell.* **2012**, *48*, 158–167.

Shi, J.; Arunasalam, K.; Yeung, D.; Kakuda, Y.; Mittal, G.; Jiang, Y. Saponins from edible legumes: Chemistry, processing, and health benefits. *J. Med. Food.* **2004**, *7*, 67–68.

Shore, D. E.; Ruvkun, G. A cytoprotective perspective on longevity regulation. *Trends Cell Biol.* **2013**, *23*, 409–420.

Singh, B.; Singh, J.P.; Shevkani, K.; Singh, N.; Kaur, A. Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *J. Food. Sci. Technol.* **2017**, *54*, 858-870.

Sivaci, A.; Duman, S. Evaluation of seasonal antioxidant activity and total phenolic compounds in stems and leaves of some almond (*Prunus amygdalus* L.) varieties. *Biol. Res.* **2014**, *47*, 9.

Smirnoff, N.; Glen, W.L. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2000**, *35*, 291–314.

Tissenbaum, H.A. Using *C. elegans* for aging research. *Invertebr Reprod Dev.* **2014**, *30*, 59-63.

Tullet, J.M.A.; Green, J.W.; Au, C.; Benedetto, A.; Thompson, M.A.; Clark, E.; Gilliat, A.F.; Young, A.; Schmeisser, K.; Gems, D. The SKN-1/Nrf2 transcription factor can protect against oxidative stress and increase lifespan in *C. elegans* by distinct mechanisms. *Aging cell* **2017**, *16*, 1191-1194.

Ulloa, J.A.; Rosas, U.P.; Ramírez, R.J.C.; Rangel, U.B.E. Beans (*Phaseolus vulgaris*): Their nutritional importance and source of phytochemicals. *Rev. Fu.* **2011**, *3*, 5–9.

- Van-Raamsdonk, J.M.; Hekimi, S. Reactive Oxygen Species and Aging in *Caenorhabditis elegans*: Causal or Casual Relationship?. *Antiox. Redox Sign.* **2010**, *13*, 1911-1953.
- Vousden, K.H.; Lane, D.P. P53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2007**, *8*, 275-283.
- Wan, C.; Yu, Y.; Zhou, S.; Liu, W.; Tian, S.; Cao, S. Antioxidant activity and free radical- scavenging capacity of *Gynura divaricata* leaf extracts at different temperatures. *Pharmac. Mag.* **2011**, *7*, 40-45.
- Wang, J.; Robida-Stubbs, S.; Tullet, J. M. A .; Rual, J.-F.; Vidal, M. RNAi screening implicates a SKN-1-dependent transcriptional response in stress resistance and longevity deriving from translation inhibition. *PLoS Genet.* **2010**, *6*, e1001048.
- Yang, C.; Landau, J.M.; Huang, M.T.; Newmark, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* **2001**, *21*, 381-406.
- Yang, W.; Li, J.; Hekimi, S. A measurable increase in oxidative damage due to reduction in superoxide detoxification fails to shorten the life span of long-lived mitochondrial mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **2007**, *177*, 2063–2074.
- Zigman, S.; Schultz, J.B.; Schultz, M. Measurement of oxygen production by in vitro human and animal lenses with an oxygen electrode. *Curr Eye Res.* **1998**, *17*, 115-119.

XII. ANEXO

A. MEDIOS DE CULTIVO Y BUFFER UTILIZADOS

Tabla A 1. Nematode Growth Medium (NGM)

Cloruro de Sodio (NaCl)	2 g/L
Peptona de caseína	4 g/L
Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) 1M	3 g/L
Fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄) 1M	0.5 g/L
Colesterol	5 mg/mL
Agar	20 /L

Tabla A 2. Buffer M9

Cloruro de Sodio (NaCl)	5 g/L
Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) 1M	3 g/L
Fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄) 1M	6 g/L
Sulfato de magnesio (MgSO₄) 1M	1 mL

Tabla A 3. Buffer de fosfafos (PBS)

Cloruro de Sodio (NaCl)	5 g/L
Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄)	3 g/L
Fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄)	6 g/L

Tabla A 4. Luria-Bertani (LB)

Cloruro de Sodio (NaCl)	10 g/L
Peptona de caseína	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Agar	20 g/L

B. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE ACUERDO AL NÚMERO DE NEMATÓDOS (Método de Bradford).

CURVA DE CALIBRACIÓN BSA

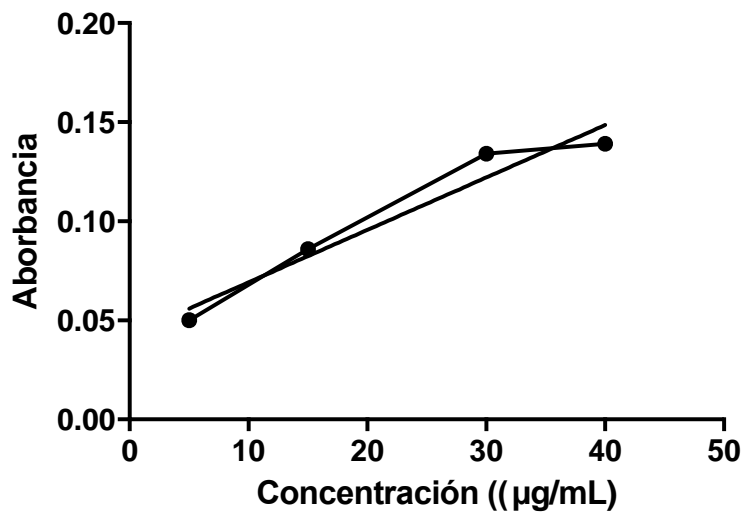
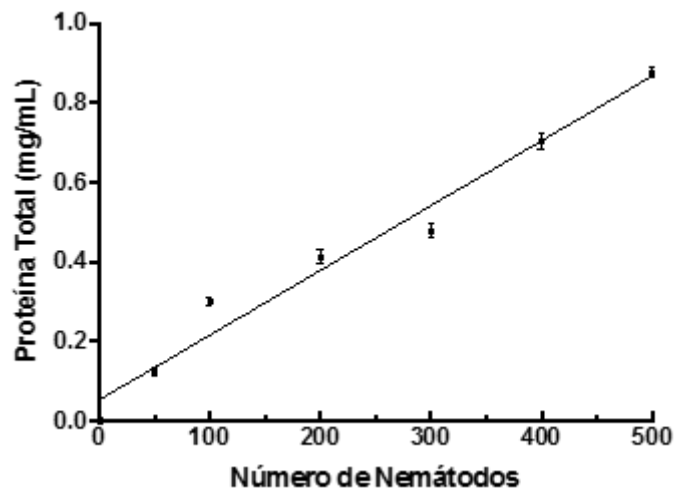


Figura B 1. Curva de calibración para cuantificación de proteína total en *C. elegans*.



C. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN *C. elegans*.

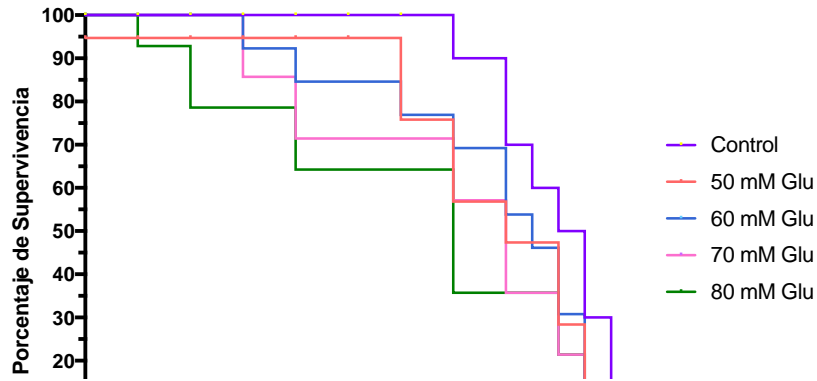


Figura B 2. Concentración de proteína total en *C. elegans*

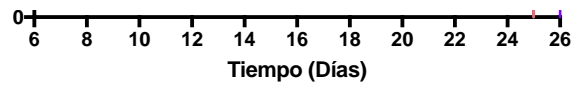


Figura C 1. Porcentaje de supervivencia de acuerdo a la concentración de glucosa.

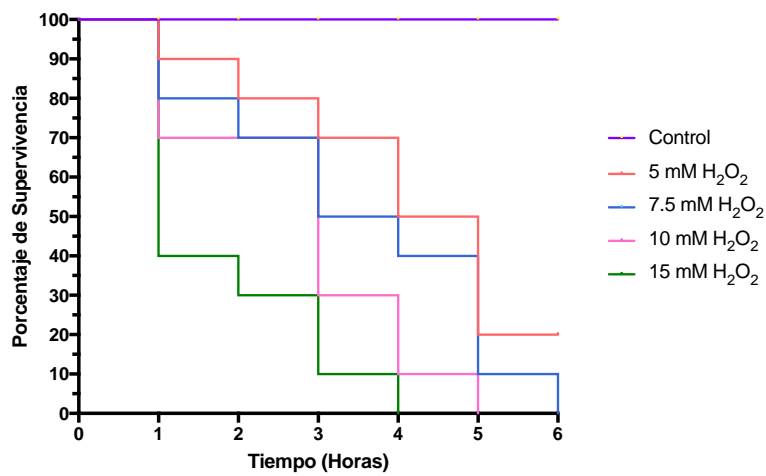


Figura C 2. Porcentaje de supervivencia de acuerdo a la concentración de H_2O_2 .

