

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Efecto del consumo de la hoja y la semilla cocida de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre el hígado graso asociado a la disfunción metabólica y su relación con el estrés oxidativo en un modelo *in vivo*”

TESIS

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

MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta

I.B.Q. Laura Lizeth Victoria Ruiz

Dirigido por

Dra. Minerva Ramos Gómez

Santiago de Querétaro, Qro., Diciembre 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



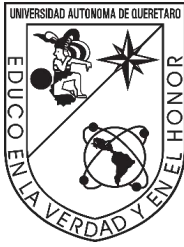
Efecto del consumo de la hoja y la semilla cocida de
frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre el hígado graso
asociado a la disfunción metabólica y su relación con
el estrés oxidativo en un modelo in vivo

por

Laura Lizeth Victoria Ruiz

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: FQMAC-309121



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia Tecnología de Alimentos

“Efecto del consumo de la hoja y la semilla cocida de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre el hígado graso asociado a la disfunción metabólica y su relación con el estrés oxidativo en un modelo *in vivo*”

TESIS

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

Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.B.Q. Laura Lizeth Victoria Ruiz

Dirigido por:

Dra. Minerva Ramos Gómez

Dra. Minerva Ramos Gómez

Presidente

Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano

Secretario

Dra. Nuria Elizabeth Rocha Guzmán

Vocal

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Suplente

M.C. Perla Viridiana Ocampo Anguiano

Suplente

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Directora de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Directora de Investigación y Posgrado

Santiago de Querétaro, Qro., Diciembre 2023

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo.

A la Dra. Minerva Ramos Gómez, por su constante respaldo a lo largo de este proceso, su habilidad para guiarme a través de los aspectos más complejos de este proyecto ha sido invaluable y estoy agradecida por haber tenido la oportunidad de contar con su mentoría.

A los miembros de mi comité, Dra. Marisela Ahumada Solorzano, Dra. Rosalía Reynoso Camacho, Dra. Nuria Elizabeth Rocha Guzmán y M.C. Viridiana Ocampo Anguiano, por sus valiosas propuestas que contribuyeron significativamente a la mejora de este trabajo. Agradezco profundamente su compromiso y experiencia, que han enriquecido enormemente este proyecto.

A mis compañeros Viri y Josué, quienes me brindaron su apoyo, conocimiento y paciencia, agradezco no solo por su colaboración en este proyecto, sino también por la amistad que me brindaron. ¡Gracias por ser parte fundamental de este viaje!

DEDICATORIAS

A Dios, por darme la fortaleza y sabiduría para poder hacer de este sueño realidad.

A mis padres, quienes han sido mi pilar fundamental, les dedico con profundo agradecimiento este logro. Por siempre creer en mí y por el profundo amor que me han dado que no solo han sido esenciales, sino también la inspiración que necesitaba para alcanzar esta meta.

A mis hermanos Jairo y Karely, por su respaldo y compañía han sido esenciales en este trayecto. Gracias por estar siempre para mí, compartiendo alegrías y desafíos.

A mi novio Julio, quien ha sido mi compañero en esta travesía, porque a pesar de las dificultades, siempre ha estado a mi lado, brindándome apoyo incondicional en cada paso, por su amor inquebrantable y por ser mi fuente de fortaleza.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Enfermedad del hígado graso asociado a la disfunción metabólica.....	3
2.2. Epidemiología.....	4
2.3. Factores de riesgo asociados a MAFLD.....	5
2.4. Fisiopatología	5
2.5. Estrés oxidativo	7
2.6. Sistemas antioxidantes.....	8
2.7. Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	9
2.8. Consumo de frijol en México	10
2.9. Composición química y valor nutrimental	12
2.10. Propiedades biológicas de los componentes del frijol	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
5. METODOLOGÍA	20
5.1. Material biológico.....	20
5.2. Material vegetal	20
5.3. Preparación de la harina de la hoja y semilla cocida de frijol	21
5.4. Análisis proximal de la hoja y la semilla cocida de frijol.....	21
5.5. Análisis fitoquímico de la hoja y la semilla cocida de frijol	22
5.5.1. Extracción de compuestos fenólicos.....	22
5.5.2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales	22
5.5.3. Cuantificación de flavonoides	23
5.5.4. Cuantificación de taninos condensados	23
5.5.5. Perfil de compuestos fenólicos por UPLC-ESI-MS/MS.....	24

5.6. Modelo experimental de esteatosis hepática <i>in vivo</i>	25
5.7. Eutanasia y obtención de muestras.....	28
5.8. Evaluación del efecto del consumo de la hoja y la semilla cocida de frijol sobre la esteatosis hepática.....	29
5.8.1. Análisis histológico del tejido hepático.....	29
5.8.2. Cuantificación de triglicéridos en hígado	29
5.8.3. Enzimas de función hepática	30
5.9. Evaluación del efecto del consumo de la hoja y semilla de frijol sobre las alteraciones metabólicas asociadas al hígado graso	30
5.9.1. Cuantificación de glucosa en suero	30
5.9.2. Determinación del perfil de lípidos en suero	30
5.10. Evaluación del estrés oxidativo en hígado.....	31
5.10.1. Preparación de homogenados citosólicos	31
5.10.2. Cuantificación de proteínas en homogenados citosólicos	31
5.10.3. Determinación de glutatión reducido (GSH)	32
5.10.4. Determinación de la enzima glutatión S- transferasa (GST).....	32
5.10.5. Determinación de la actividad de la enzima catalasa (CAT).....	33
5.10.6. Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx).....	34
5.10.7. Índice de peroxidación lipídica	35
5.11. Análisis estadístico	35
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
6.1. Caracterización de la hoja y semilla cocida de frijol	36
6.1.1. Composición proximal de la hoja y semilla cocida de frijol	36
6.1.2. Composición fitoquímica de la hoja y semilla cocida de frijol	37
6.1.3. Perfil de compuestos fenólicos por UPLC-ESI-MS/MS.....	38
6.2. Inducción de la MAFLD en un modelo <i>in vivo</i>	41
6.3. Efecto de la hoja y semilla cocida de frijol sobre la esteatosis hepática ..	45
6.4. Efecto de la hoja y semilla cocida de frijol sobre las alteraciones metabólicas asociadas a la esteatosis hepática	50
6.5. Efecto de la hoja y semilla cocida de frijol sobre marcadores de estrés oxidativo en tejido hepático	54
CONCLUSIONES	59

REFERENCIAS60
ANEXOS77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química y nutrimental de la semilla cocida de frijol común	13
Cuadro 2. Composición química de la hoja de frijol variedad Flor de Mayo.....	14
Cuadro 3. Gradiente de elución para compuestos fenólicos.....	24
Cuadro 4. Contenido nutrimental de la dieta estándar y DAGF.	25
Cuadro 5. Grupos de estudio para la evaluación del efecto de la hoja y semilla de frijol cocido en animales con MAFLD.....	26
Cuadro 6. Composición proximal de la hoja y semilla cocida de frijol	37
Cuadro 7. Composición fitoquímica de la hoja seca y la semilla cocida de frijol ...	38
Cuadro 8. Caracterización de la hoja y la semilla cocida de frijol por UPLC-ESI-MS/MS	40
Cuadro 9. Grado de esteatosis hepática en ratones alimentados con DE y DAGF	42
Cuadro 10. Contenido de triglicéridos hepáticos y enzimas de daño hepático en los animales de experimentación.	44
Cuadro 11. Parámetros bioquímicos en suero de animales alimentados con DE y DAGF.....	45
Cuadro 12. Grado de esteatosis hepática en ratones alimentados con DAGF y tratados con semilla y hoja de frijol.	47
Cuadro 13. Parámetros bioquímicos evaluados en ratones alimentados con DAGF y tratados con hoja y semilla cocida de frijol.	52
Cuadro 14. Marcadores de estrés oxidativo evaluados en hígado de animales alimentados con DAGF y tratados con hoja y semilla de frijol.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución patológica de MAFLD.	3
Figura 2. Consumo per cápita de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) en México en las últimas dos décadas.	10
Figura 3. Modelo experimental de MAFLD <i>in vivo</i>	27
Figura 4. Peso corporal de los animales alimentados con dieta estándar y dieta alta en grasa y fructosa durante 14 semanas.	42
Figura 5. Histología hepática de los animales alimentados con DE y DAGF	43
Figura 6. Histología hepática de los animales alimentados con DAGF y tratados con hoja y semilla de frijol.	46
Figura 7. Contenido de TG hepáticos de animales alimentados con DAGF y tratados con hoja y semilla de frijol.	48
Figura 8. Enzimas transaminasas en suero de animales alimentados con DAGF y tratados con hoja y semilla de frijol.	49
Figura 9. Peso corporal de los animales alimentados con DAGF y tratados con hoja y semilla de frijol durante las 12 semanas de tratamiento.	50
Figura 10. Efecto de la hoja y semilla cocida de frijol sobre el contenido de MDA y GSH en animales con MAFLD.	57

RESUMEN

La enfermedad del hígado graso asociado a la disfunción metabólica (MAFLD, por sus siglas en inglés) se caracteriza por la presencia de esteatosis hepática acompañada de diabetes, obesidad y desregulación metabólica. La ingesta de alimentos ricos en fitoquímicos puede emplearse como una estrategia altamente eficaz para prevenir la progresión de MAFLD. Aunque se ha comprobado que el consumo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) puede reducir o prevenir el riesgo de obesidad y regular el metabolismo de lípidos debido a su alto contenido en fibra, proteína y compuestos bioactivos, aún no se ha evaluado su efecto como tratamiento de la MAFLD. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del consumo de la hoja y de la semilla cocida de frijol como tratamiento de la MAFLD. Ratones macho de la cepa C57BL/6 se alimentaron con una dieta alta en grasa y fructosa (DAGF) durante 14 semanas y posteriormente se realizó una eutanasia de 6 animales de cada grupo para confirmar la enfermedad a través de histología hepática, contenido de triglicéridos (TG) en hígado y parámetros en suero. Al término de este periodo, la DAGF se suplementó con semilla cocida de frijol (5 y 15%) y hoja de frijol (10%) por 12 semanas adicionales. La suplementación con hoja de frijol redujo significativamente la actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALT, 27%), el contenido de TG hepáticos (16%) y la infiltración de grasa hepática, en comparación con el grupo alimentado con DAGF ($P < 0.05$). Además, este tratamiento demostró un mejor efecto hepatoprotector con el aumento de las enzimas antioxidantes (GST y GPx) y la disminución del contenido de MDA. Si bien todos los tratamientos disminuyeron los niveles séricos de TG y glucosa, la suplementación de la hoja de frijol mostró el mayor efecto (hasta en un 21 y 30%, respectivamente). En general, este estudio demostró el efecto hepatoprotector del consumo de la hoja de frijol sobre la esteatosis hepática y el estrés oxidativo en un modelo de MAFLD inducido por una DAGF.

Palabras clave: MAFLD, esteatosis hepática, frijol común, hojas de frijol, estrés oxidativo.

ABSTRACT

Metabolic dysfunction–associated fatty liver disease (MAFLD) is characterized by the presence of hepatic steatosis and at least one these conditions: diabetes mellitus, overweight or obesity and metabolic dysregulation. Consuming phytochemical-rich foods could be used as an effective strategy to prevent progression of MAFLD. Although several studies have demonstrated that the consumption of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) can reduce or prevent the risk of obesity and regulate lipid metabolism due to its high content of fiber, protein and bioactive compounds, its effect has not yet been evaluated as treatment of MAFLD. Therefore, the objective of this research was to evaluate the effect of consuming cooked bean leaf and seed as a treatment in an *in vivo* model of MAFLD. C57BL/6 male mice were fed with high fructose high fat diet (HFFD) for 14 weeks and 6 animals from each group were euthanized to confirm the disease by histological analysis, hepatic triglycerides (TG) content and serum parameters. Then, HFFD was supplemented with cooked bean seed (5 and 15%) and bean leaves (10%) for an additional 12 weeks. Bean leaf supplementation (10%) significantly reduced the activity of the enzyme alanine aminotransferase (ALT, 27%), hepatic TG content (16%), and hepatic fat infiltration, compared with the values of the DAGF-fed group ($P < 0.05$). Furthermore, this treatment demonstrated a better hepatoprotective effect with the increase in antioxidant enzymes (GST and GPx) and the decrease in MDA content. Although all treatments decreased serum TG and glucose levels, bean leaf supplementation showed the greatest effect (up to 21 and 30%, respectively). Overall, this study demonstrated the hepatoprotective effect of bean leaf consumption on hepatic steatosis and oxidative stress in a DAGF-induced MAFLD model.

Keywords: MAFLD, hepatic steatosis, common bean, bean leaves, oxidative stress.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad del hígado graso asociado a la disfunción metabólica (MAFLD, por sus siglas en inglés) es un problema importante de salud pública a nivel mundial, ya que afecta a gran parte de la población incluyendo niños y adultos. Su prevalencia ha aumentado notablemente en los últimos años y, si bien su etiología es compleja, se atribuye principalmente a un estilo de vida sedentario y a una dieta alta en carbohidratos y lípidos (Pipitone *et al.*, 2023). Esta patología se caracteriza por la acumulación anormal o excesiva de grasa en el hígado, principalmente en forma de triglicéridos (TG), debido a un desequilibrio entre la adquisición y la eliminación de estos compuestos, con el consecuente aumento de estrés oxidativo, lipotoxicidad y la liberación de citocinas inflamatorias que, en conjunto, contribuyen a la gravedad de la enfermedad (Bence y Birnbaum, 2021).

Actualmente no existe un tratamiento farmacológico estandarizado para la MAFLD; los únicos tratamientos recomendados y que han demostrado eficacia en el manejo de la enfermedad se basan en modificaciones en la dieta y al aumento de la actividad física (Muhammad, 2019). Existe evidencia que indica que tanto la semilla como la hoja de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) contienen una fuente importante de fibra soluble e insoluble y compuestos bioactivos, entre los que se incluyen principalmente compuestos fenólicos con múltiples beneficios a la salud debido a sus propiedades antioxidantes e hipolipidémicas (Yahfoufi *et al.*, 2018; Becerril-Campos, 2023). Estudios previos han reportado que el consumo de frijol cocido puede regular el metabolismo de lípidos a través de la disminución de la lipogénesis *de novo* (LDN) y el aumento de la oxidación de ácidos grasos (Thompson *et al.*, 2017; Lutsiv *et al.*, 2023). Por otro lado, se ha demostrado que la suplementación de hojas de frijol a una DAGF en modelos animales previene la obesidad y el desarrollo de esteatosis hepática, además se ha observado que mejora la peroxidación lipídica hepática y el aumento de GSH en suero (Ramírez-Venegas *et al.*, 2021; Becerril-Campos *et al.*, 2023). Sin embargo, los estudios antes mencionados son modelos preventivos y considerando que la MAFLD es una

patología que no presenta manifestaciones clínicas al inicio de la enfermedad y al no tener la cultura de prevención en la población mexicana, es necesario proponer un modelo correctivo para comprender mejor los efectos del consumo de frijol sobre la MAFLD inducida por una DAGF. Por otro lado, la terapia antioxidante, a través de fitoquímicos de la dieta, también podría ser una opción potencialmente beneficiosa para mitigar la progresión de MAFLD. A través de modelos *in vitro* se ha demostrado que las propiedades antioxidantes de los compuestos presentes en la variedad de frijol Flor de Mayo radican en su capacidad para neutralizar los radicales libres y la quelación de los metales de transición, por lo que contrarrestan el inicio y propagación de los procesos oxidativos (García-Lafuente et al., 2009).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del consumo de la hoja y semilla cocida de frijol común sobre la MAFLD inducida por una DAGF y su asociación con marcadores de estrés oxidativo en un modelo *in vivo*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Enfermedad del hígado graso asociado a la disfunción metabólica

La enfermedad del hígado graso asociado a la disfunción metabólica (MAFLD, por sus siglas en inglés), anteriormente denominada enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), es una patología compleja y multifactorial que se caracteriza por la acumulación anormal de grasa en el hígado principalmente en forma de gotas lipídicas ricas en TG, acompañada de sobrepeso u obesidad, diabetes mellitus o evidencia de desregulación metabólica (Ipsen *et al.*, 2018; Kaya y Yilmaz, 2022). La mayoría de los pacientes con MAFLD son asintomáticos y solo una minoría presenta fatiga, malestar abdominal en el cuadrante superior derecho y hepatomegalia (aumento patológico del tamaño del hígado) (Chalasani *et al.*, 2018).

La presentación clínica de esta patología puede variar, evolucionando desde la esteatosis simple (Figura 1) que es generalmente benigna y reversible, hasta la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la cual se caracteriza por la inflamación e iniciación de fibrosis que puede desarrollar a cirrosis hepática y progresar a carcinoma hepatocelular de manera irreversible (Buzzetti *et al.*, 2016; Bessone *et al.*, 2019).

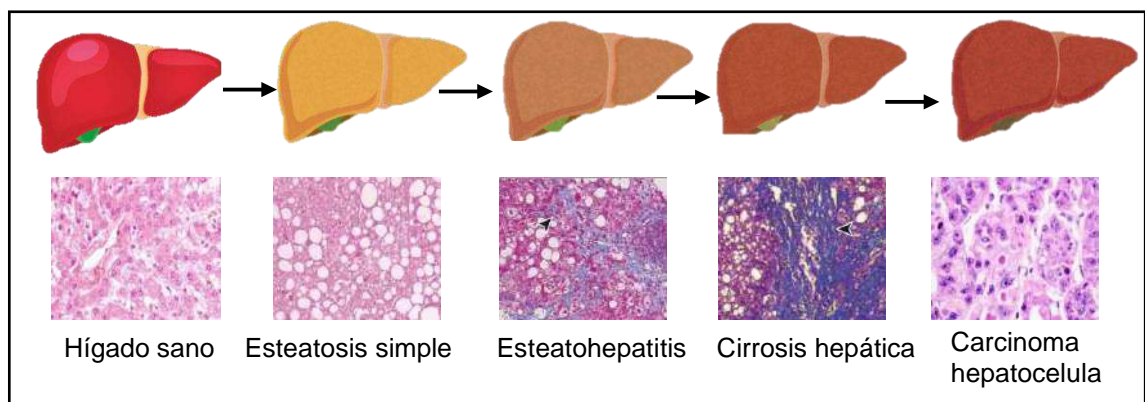


Figura 1. Evolución patológica de MAFLD (Adaptado de Bessone *et al.*, 2019).

La esteatosis hepática se clasifica según el porcentaje de grasa dentro del hepatocito de la siguiente manera: grado 0 o sano, más del 5 %; grado 1 o leve, del 5 al 33 %; grado 2 o moderado, del 34 al 66 % y grado 3 o grave, más del 66 %. Es importante destacar que esta evaluación es exclusivamente semicuantitativa, ya que se basa en una estimación bidimensional de la proporción de hepatocitos que contienen lípidos, sin tener en cuenta el volumen de las gotas (Qayyum *et al.*, 2012).

2.2. Epidemiología

La prevalencia de MAFLD ha aumentado significativamente en paralelo con el aumento de la obesidad y es ahora la causa más común de enfermedad hepática crónica a nivel mundial (Wong y Chan, 2021).

Se estima que la prevalencia global de MAFLD es del 25 %, reportándose las tasas más altas en Sudamérica y Norteamérica; así mismo, esta enfermedad se encuentra presente en el 70 % de individuos con sobrepeso, arriba del 90 % en pacientes con obesidad mórbida y 75 % en pacientes con diabetes tipo 2 (Younossi *et al.*, 2019).

En cuanto a la etnicidad, diversos estudios han demostrado que la prevalencia de esta patología es mayor en la población hispana y México-americana (Sherif *et al.*, 2016). En México, la investigación epidemiológica sobre la prevalencia de la enfermedad es limitada. No obstante, un estudio llevado a cabo en 2019 por Briseño-Bass y colaboradores reveló una prevalencia global del 49.19 %. De este grupo, el 65 % de los pacientes mostraba sobrepeso u obesidad, consolidando con mayor evidencia la correlación existente entre estas patologías (Briseño-Bass *et al.*, 2019).

2.3. Factores de riesgo asociados a MAFLD

La obesidad, la diabetes, la resistencia a la insulina, la hipertensión y la dislipidemia, que juntos se conocen como síndrome metabólico, se han identificado como los principales factores de riesgo asociados a MAFLD (Nassir *et al.*, 2015). Sin embargo, la patogenia de esta enfermedad también comprende factores genéticos, demográficos y ambientales (Younossi *et al.*, 2019).

Diversos estudios han reportado que la prevalencia de diabetes y prediabetes entre los pacientes con MAFLD oscila entre el 20 y el 23 % (Younossi *et al.*, 2016). Algunos autores han propuesto que la hiperglucemia desempeña un papel importante en el desarrollo de MAFLD; así mismo, entre los mecanismos asociados al desarrollo de esta patología se incluyen el incremento de la lipoperoxidación y la activación de genes implicados en vías lipogénicas y glucolíticas (Tanase *et al.*, 2020; Khandelwal *et al.*, 2021). En un estudio clínico con personas con hiperlipidemia combinada reveló una mayor prevalencia de hígado graso y niveles elevados de la enzima alanina aminotransferasa (ALT), tanto en pacientes dislipidémicos como en pacientes con niveles normales de lípidos (Brouwers *et al.*, 2006).

Los factores ambientales también tienen un papel importante para el desarrollo de esta patología; los hábitos alimenticios, el estilo de vida y los factores socioeconómicos son los factores más relevantes (McCarthy y Rinella, 2012). En este contexto, un estudio publicado por Leslie y colaboradores (2014) informó que la mayoría de los pacientes con MAFLD llevan una dieta alta en grasas y un estilo de vida sedentario en comparación con individuos sanos.

2.4. Fisiopatología

El hígado constituye un órgano esencial en el metabolismo de los lípidos. Como regulador central de la homeostasis de los lípidos, el hígado es responsable de orquestar la síntesis de nuevos ácidos grasos, su exportación y posterior

redistribución a otros tejidos (Nguyen *et al.*, 2008). Estos procesos están estrechamente regulados por interacciones complejas entre hormonas, receptores nucleares y factores de transcripción, lo que mantiene la homeostasis de los lípidos hepáticos bajo estricto control (Bechmann *et al.*, 2012). La interrupción de una o más de estas vías puede inducir la retención de grasa en el hígado y, consecuentemente, el desarrollo de MAFLD.

En condiciones normales, el hígado no almacena ácidos grasos; sin embargo, bajo condiciones de estrés, como la obesidad o una dieta alta en grasas y carbohidratos, promueve un metabolismo anormal que ocasiona que los lípidos se almacenen en forma de gotas lipídicas (Nassir *et al.*, 2015). Particularmente, una dieta alta en fructosa conduce a la acumulación inmediata de lípidos en el hígado, al promover la lipogénesis, dislipidemia, adiposidad visceral y resistencia a la insulina en mayor medida que la glucosa. Esto se explica por la capacidad de la fructosa para ser metabolizada directamente en el hígado, evitando el paso limitante de la glucólisis a nivel de la fosfofructoquinasa (Yu *et al.*, 2021).

La acumulación de grasa hepática incorpora ácidos grasos de diferentes fuentes dependiendo del estado metabólico del organismo, al igual que de los niveles de metabolitos y hormonas. La mayoría de los ácidos grasos se originan de la lipólisis, de la lipogénesis *de novo* utilizando carbohidratos como sustratos, de los remanentes de lipoproteínas como los quilomicrones, resultantes de la absorción intestinal de grasas. La acumulación de ácidos grasos en el hígado ocurre entonces, como resultado de un desequilibrio entre la adquisición y la eliminación de lípidos (Ipsen *et al.*, 2018). Bajo estas condiciones, los ácidos grasos son esterificados entre las dos monocapas de la membrana del retículo endoplasmático (RE) en ésteres de esteroides por la enzima acil-CoA colesterol aciltransferasa (ACAT 1 y 2), y en TG por la enzima diacilglicerol aciltransferasa 2 (DGAT 2) (Mashek, 2021). La acumulación de lípidos entre las dos monocapas genera un depósito de lípidos en forma de lente que, cuando madura, se separa y queda libre en el citosol rodeado por la monocapa externa de la membrana del RE, formándose lo que se conoce

como gota lipídica (Seebacher *et al.*, 2020).

Por el contrario, una adecuada oxidación de los ácidos grasos a través de la β -oxidación previene su acumulación en el hígado; sin embargo, la oxidación excesiva de estas biomoléculas puede conducir a la generación de especies lipotóxicas que pueden llegar a causar lesiones hepatocelulares que se manifiestan como estrés del RE, inflamación, apoptosis y necrosis, característicos de la enfermedad de hígado graso (Neuschwander-Tetri, 2010).

2.5. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo (EO) se considera uno de los mecanismos patológicos que dan lugar a la iniciación y progresión de diversas enfermedades hepáticas. El EO se define como el desequilibrio entre la producción de especies reactivas y la regeneración de antioxidantes, a favor de los primeros. Debido a sus características químicas, las especies reactivas pueden iniciar la peroxidación de lípidos, causar rupturas de cadenas de ADN y oxidar indiscriminadamente todas las moléculas en membranas y tejidos biológicos (Chen *et al.*, 2020).

La homeostasis energética en las células hepáticas está mediada principalmente por el metabolismo oxidativo mitocondrial, que incluye la β -oxidación, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA por sus siglas en inglés), la cetogénesis, la actividad de la cadena transportadora de electrones (CTE) y la fosforilación oxidativa; por lo que, las mitocondrias son la principal fuente de especies reactivas. Sin embargo, también se ha demostrado que los peroxisomas y el RE son una fuente importante de estos compuestos (Li *et al.*, 2015). Por lo anterior, si la función mitocondrial o peroxisomal no puede manejar el aumento del flujo de lípidos, la oxidación respiratoria puede verse afectada, provocando un desequilibrio en la homeostasis de las grasas, la generación de metabolitos tóxicos derivados de los lípidos y la sobreproducción de especies reactivas, lo que da como resultado la condición conocida como lipotoxicidad (Berlanga *et al.*, 2014). En este sentido, las especies reactivas interactúan con los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA por sus siglas en inglés);

la inducción resultante de la peroxidación de lípidos dentro de la célula conduce a la formación de 4-hidroxinonenal (HNE) y malondialdehído (MDA) que pueden difundirse libremente en el espacio extracelular para afectar a las células distantes, amplificando así los efectos del EO (Armutcu *et al.*, 2013).

Los compuestos lipotóxicos pueden activar la respuesta inmunitaria en el hígado a través de las células Kupffer y las células estrelladas, estas últimas desencadenan la proliferación y síntesis de colágeno, lo que conduce a la aparición de fibrosis impulsando la transición de la esteatosis simple a EHNA. Por otro lado, las células Kupffer también contribuyen de manera crítica a la progresión de la MAFLD, al producir una variedad de citocinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF), lo que aumenta la inflamación y la apoptosis, provocando que la fibrosis pueda progresar a carcinoma hepatocelular (Li *et al.*, 2015).

2.6. Sistemas antioxidantes

El sistema de defensa antioxidante está conformado por moléculas y enzimas que provienen los alimentos o formadas endógenamente. Estos mecanismos tienen la capacidad de contrarrestar los efectos de las especies reactivas y mantener la homeostasis celular. Entre las defensas antioxidantes enzimáticas se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y las enzimas del sistema glutatión, como la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR) y la glutatión S-transferasa (GST) (Sánchez-Valle *et al.*, 2012).

En cuanto al sistema de defensa no enzimático, el glutatión (GSH) es uno de los antioxidantes más importantes (Forman *et al.*, 2009). El GSH se encuentra principalmente en forma reducida en la mitocondria y neutraliza las especies reactivas producidas en la CTE, protegiendo así al organelo. Por lo que, tanto el sistema antioxidante enzimático como el no enzimático, son esenciales para la respuesta celular con el fin de hacer frente al EO en condiciones fisiológicas; además, estas enzimas se utilizan como indicadores de la progresión de esteatosis en varios modelos experimentales, principalmente en roedores (Li *et al.*, 2015).

Por lo tanto, resulta crucial conservar y promover los niveles óptimos de los sistemas de defensa antioxidante, tanto enzimáticos como no enzimáticos. Existe evidencia que indica que una dieta rica en fitoquímicos, principalmente compuestos fenólicos, poseen múltiples beneficios relacionados particularmente con su capacidad para inducir los sistemas antioxidantes endógenos y atenuar los procesos de EO característicos de varias patologías, entre ellas la MAFLD (Yahfoufi *et al.*, 2018).

2.7. Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas más antiguas y consumidas a nivel mundial, perteneciente a la familia de las *fabaceas*, de tallos delgados y débiles; la vaina se caracteriza por ser suavemente curvada y de color verde; las hojas son ovaladas con el ápice agudo y de coloración verde; las semillas pueden ser ovaladas o redondas y de diferente coloración dependiendo de la variedad (Ulloa *et al.*, 2011).

Entre las leguminosas alimenticias de mayor consumo en el mundo, el frijol ocupa un lugar importante en la nutrición humana. Se ha reportado que es una fuente importante de proteínas, fibra dietaria, vitaminas, minerales y compuestos fenólicos, los cuales tienen diversos beneficios a la salud, incluyendo un papel preventivo en enfermedades cardiovasculares, propiedades anticancerígenas, antioxidantes y antiinflamatorias (Suárez-Martínez *et al.*, 2016; Ciudad-Mulero *et al.*, 2020).

Las regiones de mayor consumo de frijol común incluyen toda América Latina, la India y África. México posee la mayor diversidad del género *Phaseolus*, dentro de los cuales, la semilla de frijol común es la de mayor importancia agronómica y económica (SAGARPA, 2020).

2.8. Consumo de frijol en México

El frijol representa un alimento clave en la dieta de los mexicanos; sin embargo, su consumo se ha reducido a través del tiempo. A partir de los datos proporcionados por el Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA), se señala que actualmente se consumen 27.5 g diarios de frijol cocido, de los cuales resulta un aproximado de consumo anual por persona de 11 Kg, inferior a lo consumido en los últimos 5 años (Figura 2). Diversos factores económicos y sociales, como cambios de estilo de vida y los hábitos alimentarios, han contribuido a la reducción en el consumo de esta leguminosa en las últimas dos décadas.



Figura 2. Consumo Per cápita de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en México en las últimas dos décadas (CEDRSSA, 2020. Con datos del SIAP / SADER).

* *datos preliminares*

De acuerdo con las guías de alimentación para la población mexicana (2023), se recomienda una ingesta diaria de 100 g (equivalente a ½ taza) de frijoles cocidos, para promover los beneficios nutricionales de esta leguminosa. Esta cantidad

recomendada se basa en el Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes junto con la NOM-043-SSA2-2012.

Por otro lado, se ha demostrado un riesgo reducido de enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes, obesidad y varios tipos de cáncer al aumentar la ingesta diaria de frijoles cocidos a 120-132 g (equivalente a 2/3 de taza) (Mitchell *et al.*, 2022).

En algunas regiones del país, principalmente en estados con presencia de grupos étnicos como el Estado de México, Chihuahua, San Luis Potosí, Oaxaca, Puebla, Chiapas y Tabasco, se tiene referencia de que las personas consumen habitualmente las hojas de frijol durante la etapa temprana de la planta, las cuales son consumidas en forma cruda, cocida o molidas como condimentos para otros alimentos (Ocampo-Anguiano, 2020). Las hojas de frijol forman parte del grupo de los quelites u hojas comestibles, que incluye hojas tiernas de plantas herbáceas, arbustos y árboles, tallos tiernos, flores e inflorescencias (Linares y Bye, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda una ingesta diaria de al menos 400 g (equivalente a 5 porciones) de frutas y verduras para llevar a cabo una dieta correcta. En este sentido, se ha informado que la composición nutricional de los quelites es similar a la de otras verduras. Estos presentan niveles significativos de agua, superando el 75 %, mientras que los sólidos (25 %) incluyen proteínas, carbohidratos y pequeñas cantidades de lípidos que dan una densidad energética comparativamente baja. Además, los quelites pueden llegar a contener hasta 6 g de proteína por 100 g de porción comestible, una cifra superior al proteico de muchas verduras comunes (Bourges y Vargas, 2015). Sin embargo, también el consumo de quelites en el país ha disminuido por modificaciones en la dieta, derivadas de los cambios de estilo de vida.

Los datos anteriores ponen de manifiesto la necesidad de investigar de manera sistemática las propiedades biológicas del consumo de frijol y promover nuevamente su consumo, particularmente en México.

2.9. Composición química y valor nutrimental

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una fuente importante de proteínas, carbohidratos, fibra dietaria, vitaminas y minerales (Cuadro 1). Dependiendo de la variedad de frijol, el contenido de proteínas en la semilla varía del 14 al 33 %, siendo rico en aminoácidos como tirosina, lisina y fenilalanina (Paredes-López *et al.*, 2013; Chávez-Mendoza y Sánchez, 2017).

En cuanto a su composición, los carbohidratos representan el macronutriente más abundante en un 55-65 % de peso seco, entre los que se incluyen principalmente carbohidratos complejos como la fibra dietaria y el almidón (Campos-Vega *et al.*, 2013; Suárez-Martínez *et al.*, 2016). Dentro de los macronutrientes presentes en la semilla del frijol, la fracción de lípidos constituye solo entre el 2 y el 4% del grano seco, destacando que aproximadamente el 70 % del contenido lipídico esta compuesto por ácidos grasos insaturados (Bennink y Rondini, 2012).

Cuadro 1. Composición química y nutrimental de la semilla cocida de frijol común

	Aspecto indicador	Contenido
Composición química (%)	Proteína	16.20 – 19.80
	Lípidos	0.40 – 1.20
	Carbohidratos	36.50 – 55.00
	Fibra	Total 36.50 – 52.00
		Soluble 5.50 – 11.00
		Insoluble 31.00 – 41.00
Minerales (mg/100 g)	Calcio	76.25 - 167.00
	Fosforo	403 – 463
	Hierro	5.75 - 6.24
	Magnesio	199.00
	Zinc	2.20 - 4.15
Otros componentes	Compuestos fenólicos totales (mg EAG/g) ^a	8.58 – 11.80
	Flavonoides (mg ECat/g) ^b	0.02 – 0.75

^a Miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra.

^b Miligramos equivalentes de catequina por gramo de muestra.

(Adaptado de Campos-Vega *et al.*, 2009; Suárez-Martínez *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018).

Las vitaminas y minerales también forman parte de los componentes principales de la semilla de frijol. Dentro de las vitaminas, las de mayor abundancia son las del complejo B (tiamina, riboflavina, biotina, niacina, y ácido fólico) y la vitamina E. El frijol también es una importante fuente de calcio, hierro, fósforo y zinc (Chávez-Mendoza y Sánchez, 2017).

En cuanto a las hojas de frijol, existen pocos estudios acerca de su composición; sin embargo, un estudio llevado a cabo por Martínez-Zavala y colaboradores (2016) reportó que las hojas de frijol variedad Pinto Villa son una excelente fuente de hierro (275 mg/Kg), incluso mayor que en las semillas (50 mg/Kg). En otro estudio se determinó que las hojas de frijol variedad Flor de Mayo tiene un alto contenido de proteína y de carbohidratos, dentro de los cuales la fibra dietaria representa poco más del 50% (Cuadro 2) (Ocampo-Anguiano, 2020).

Cuadro 2. Composición química de la hoja de frijol variedad Flor de Mayo

Aspecto indicador	Contenido (%)
Proteína	24.04 ± 0.02
Lípidos	1.33 ± 0.05
Carbohidratos	46.15 ± 0.67
Fibra dietaria total	24.08 ± 1.37

(Adaptado de Ocampo-Anguiano, 2020).

2.10. Propiedades biológicas de los componentes del frijol

En las últimas décadas se ha incrementado el interés por los compuestos bioactivos que se encuentran en el frijol, entre los que se incluyen inhibidores enzimáticos, compuestos fenólicos, almidón resistente y fibra soluble e insoluble, los cuales se han asociado con un riesgo reducido de diversas enfermedades como la obesidad, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, entre otras (Suárez-

Martínez *et al.*, 2016; Ganesan y Xu, 2017).

Los compuestos fenólicos son ampliamente conocidos por sus propiedades antioxidantes, poseen diferente estructura y función; se encuentran principalmente en la cascarilla o testa del frijol común y se ha reportado que el contenido de compuestos fenólicos es de 145 mg/g, representando alrededor del 11 % del total de la semilla (Ciudad-Mulero *et al.*, 2020).

Iniestra-González y colaboradores (2005) reportaron que dentro de las variedades que se consumen en México, y presentan mayor capacidad antioxidante, se encuentran las variedades Flor de Mayo y negro Durango. Las propiedades antioxidantes de los compuestos presentes en estas variedades radican en su capacidad para neutralizar los radicales libres y la quelación de los metales de transición, evaluadas a través de técnicas *in vitro*, por lo que podrían contrarrestar el inicio y propagación de los procesos oxidativos (García-Lafuente *et al.*, 2009).

El contenido de compuestos fenólicos cambia dependiendo la variedad del frijol. Los principales compuestos encontrados en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) consisten en ácidos fenólicos, taninos condensados y flavonoides (Espinosa-Alonso *et al.*, 2006; Chávez-Mendoza y Sánchez, 2017).

2.10.1. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos que comparten una estructura común que consta de dos anillos aromáticos unidos a través de tres carbonos, formando un heterociclo oxigenado. Los subgrupos más importantes dentro de los flavonoides son los flavonoles, antocianinas, isoflavonas, flavanoles y proantocianidinas (Chávez-Mendoza y Sánchez, 2017).

La actividad biológica de los flavonoides depende del tipo de constituyentes fitoquímicos, de la complejidad de su estructura y de la composición de la mezcla de flavonoides, ya que ha sido bien establecido que las mezclas de fitoquímicos en las legumbres pueden proporcionar beneficios protectores para la salud,

principalmente a través de un efecto sinérgico entre ellos (Singh *et al.*, 2017).

Thompson y colaboradores (2017) demostraron que el consumo de semilla cocida de frijol común reduce notablemente la adiposidad visceral y el tamaño de los adipocitos en ratas susceptibles y resistentes a la obesidad inducida por una dieta alta en grasa. Además, los autores reportaron un aumento de la actividad de la enzima carnitina palmitoil transferasa 1 (que es el paso limitante en la tasa de oxidación de los PUFAs) y niveles más bajos de TG circulantes en el hígado.

Por otro lado, Zhao y colaboradores (2021) reportaron efectos hipolipidémicos y niveles reducidos de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) en ratones alimentados con una dieta alta en grasa suplementada con harina de frijol cocido de la variedad Adzuki al 15 %.

2.10.2. Taninos condensados

Los taninos son componentes fenólicos que, debido a sus múltiples grupos hidroxilo en su estructura, permiten su unión a proteínas, iones metálicos y otras macromoléculas como polisacáridos para formar complejos (Singh *et al.*, 2017). Estos compuestos se dividen en taninos hidrolizables y taninos condensados. Los taninos hidrolizables están compuestos por ácido gálico y sus dímeros de ácido elágico esterificado con moléculas de azúcar (Beecher, 2003).

Los taninos condensados son los compuestos fenólicos predominantes en las semillas de leguminosas y, por lo general, se encuentran en la testa de la semilla, protegiéndola de los factores ambientales. En cuanto a su actividad biológica, estos compuestos poseen propiedades antioxidantes, antimutagénicas y anticancerígenas (Espinosa-Alonso *et al.*, 2006).

2.10.3. Fibra dietaria

La fibra dietaria se caracteriza como la porción comestible de las plantas que no se digiere ni absorbe en el intestino delgado, sometiéndose a una fermentación

parcial o total en el intestino grueso. La fibra dietaria está constituida por carbohidratos complejos (como celulosa, hemicelulosa y pectinas), oligosacáridos, lignina y sustancias vegetales asociadas (Campos-Vega *et al.*, 2013).

Diversos estudios han demostrado efectos beneficiosos del consumo de frijoles secos y cocidos, relacionados con la prevención o reducción de alteraciones metabólicas, debido principalmente a su alto contenido en fibra dietaria (soluble e insoluble) (Thompson *et al.*, 2017; Brick *et al.*, 2022).

Becerril-Campos y colaboradores (2023) evaluaron el efecto del consumo diario de hojas de frijol (10 %) sobre las funciones hepáticas en un modelo preventivo de ratas alimentadas con una DAGF durante 13 semanas, encontrando que el consumo de hoja de frijol disminuyó significativamente los niveles de TG séricos y hepáticos, colesterol total y VLDL. Además, el análisis histológico demostró que las ratas alimentadas con DAGF adicionada con 10 % de hoja de frijol presentaron una acumulación de grasa hepática microvesicular menor al 5 %; mientras que, las ratas sin tratamiento presentaron una acumulación de grasa hepática macrovesicular menor o igual al 33 %, indicando que el consumo de la hoja de frijol previno el riesgo de desarrollar esteatosis grado 1.

Estos resultados sugieren la importancia del consumo de semilla y hoja de frijol en el control de enfermedades metabólicas, como la MAFLD. Por lo que, los resultados derivados del presente proyecto resaltan la importancia de reintroducir el consumo de frijol a la dieta como una estrategia accesible para la población mexicana.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad no existe un tratamiento farmacológico estandarizado para la MAFLD y, de acuerdo con las recomendaciones médicas, su control se basa principalmente por modificaciones en la dieta y aumento de la actividad física. Por lo que, existe el interés en proponer una alternativa para controlar la progresión de la MAFLD a través de la dieta. En este sentido, el consumo de la hoja y semilla cocida de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) podría ser una opción viable debido a sus propiedades antioxidantes y sus efectos hipolipidémicos, ya que estudios previos en modelos animales han demostrado que la suplementación con hoja (10%) y semilla cocida (15 al 40 %) a dietas altas en grasa previene la obesidad, la acumulación de lípidos hepáticos y el estrés oxidativo.

En este sentido, los porcentajes propuestos en este estudio se basan principalmente en el consumo actual (5 %) y recomendado (15 %) de frijol en México, con la finalidad de promover nuevamente el consumo de frijol en la dieta del mexicano, ya que se ha reducido en los últimos años debido a los cambios de estilo de vida y hábitos alimentarios. Adicionalmente, los quelites son una fuente accesible, económica y rica en nutrientes como el hierro, la fibra y diversos compuestos bioactivos. Su consumo se ha relacionado con beneficios a la salud, tales como efectos antioxidantes, antihiperlipidémicos e hipocolesterolémicos, además forman parte de las tradiciones culinarias de México. Por lo que, la revalorización y reintegración de los quelites en la dieta contribuirá significativamente a cumplir con las recomendaciones de ingesta de vegetales, promoviendo así una alimentación equilibrada.

Por lo anterior, con este estudio se pretende promover el consumo recomendado de la semilla y hoja de frijol común, así como también obtener información significativa que facilite la implementación de nuevas estrategias para controlar y reducir la progresión de MAFLD.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto del consumo de la hoja y semilla cocida de frijol sobre el desarrollo de hígado graso asociado a la disfunción metabólica y su relación con el estrés oxidativo en un modelo *in vivo*.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del consumo de la hoja y la semilla cocida de frijol sobre el control de esteatosis hepática mediante la determinación de triglicéridos hepáticos, análisis histopatológico y la actividad de las enzimas de daño hepático.
- Evaluar el efecto del consumo de la hoja y la semilla cocida de frijol sobre las alteraciones metabólicas asociadas al hígado graso.
- Evaluar el efecto del consumo de la hoja y la semilla cocida de frijol sobre el estado redox en tejido hepático.

5. METODOLOGÍA

5.1. Material biológico

Se emplearon 96 ratones macho de la cepa C57BL/6 con pesos entre 25-30 g, de aproximadamente 8 semanas, los cuales se adquirieron del bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México (UNAM), Campus Juriquilla, Qro.

Se alojaron 4 ratones por caja (dimensiones: 19 x 29 x 12 cm) de acrílico, con cama sanitaria de viruta estéril de 1.5 cm de grosor, aproximadamente, con pisos y paredes continuas sólidas y con tapa removible perforada, las cuales permitieron la entrada de aire y luz. Se mantuvo a los ratones en condiciones controladas de humedad ($50 \pm 10 \%$), temperatura adecuada ($23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) y ciclos de 12 h de luz-obscuridad. Además, se les proporcionó alimento y agua *ad libitum* (acorde a las indicaciones señaladas por la NOM-062-ZOO-1999). Estas condiciones fueron mantenidas en las instalaciones del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Cabe destacar que el proyecto recibió la aprobación del Comité de bioética de la facultad bajo el número de oficio CBQ22/051.

De igual manera, se llevaron a cabo las condiciones adecuadas de limpieza, que incluyeron el lavado diario de comederos y bebederos con cambio de viruta, así como la limpieza de las cajas cada tercer día. Durante la manipulación de los animales, se siguieron las especificaciones de la NOM-062-ZOO-1999, específicamente en su apartado 10.4, que indica el uso de guantes, cubrebocas y bata como medidas de precaución al tener contacto con los animales.

5.2. Material vegetal

Se utilizaron las hojas y semillas de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Eugenia, la cual se obtuvo por sembradío en campo abierto en el campus experimental Amazcala (FCN, UAQ) en junio del 2019 en colaboración con el Dr. Candelario Mondragón Jacobo (Ocampo-Anguiano, 2020). El material vegetal se almacenó en recipientes oscuros a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

5.3. Preparación de la harina de la hoja y semilla cocida de frijol

Se siguió la metodología descrita por Acosta-Gallegos y colaboradores (2010) con las modificaciones pertinentes. El frijol se lavó y se colocó en una olla de acero inoxidable en una relación aproximada de 1:4 (p/v). Se realizó un proceso de cocción por 2 h a 95 °C. Una vez realizada la cocción, se llevó a cabo una molienda del frijol junto con el caldo para reducir el tamaño de partícula, posteriormente se liofilizó por 96 h y se almacenó a -20 °C, protegido de la luz.

Las hojas se secaron en un horno de aire forzado a 45 °C hasta peso constante. Una vez transcurrido el tiempo de secado, las hojas se molieron y cribaron a 0.2 mm (molino Thomas-Wiley modelo 4). El producto obtenido se almacenó a -20 °C protegido de la luz.

5.4. Análisis proximal de la hoja y la semilla cocida de frijol

La composición proximal se determinó siguiendo los métodos descritos por la AOAC (2002). La humedad se determinó por estufa de secado; las cenizas por calcinación (AOAC 942.05); el contenido proteico por el método de nitrógeno total macro- Kjeldahl (AOAC 2001); los lípidos por el método de extracto etéreo (AOAC 920.39) y el contenido de carbohidratos se determinó por la diferencia del porcentaje obtenido de los otros componentes mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ carbohidratos} = 100 - \% \text{ cenizas} - \% \text{ proteínas} - \% \text{ grasa} - \% \text{ fibra}$$

La extracción de fibra insoluble se llevó a cabo por el método de Heredia-Ortega y colaboradores (2014). Se colocó 1 g de muestra en bolsas filtrantes previamente pesadas. Las bolsas se sellaron y se colocaron en un vaso de precipitados con 50 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.08 mM (pH 6), en seguida se adicionaron 100 µL de α-amilasa y las muestras se llevaron a baño María por 30 min a 95 °C con agitación continua y protegiendo de la luz; el pH se ajustó a 7.5 con NaOH 0.275 N. Posteriormente, se agregaron 100 µL de proteasa a la muestra y nuevamente se llevó a baño María por 30 min a 60 °C con agitación continua; transcurrido el tiempo, la muestra se dejó enfriar y se ajustó nuevamente el pH a

4.6 con HCl 0.375 N. Enseguida, se adicionaron 300 μ L de amiloglucosidasa y se incubó por 30 min a 60 °C con agitación continua. Una vez terminada la incubación, se realizaron dos lavados con agua destilada precalentada a 60 °C (el residuo obtenido se conservó para la determinación de fibra dietaria soluble). Las muestras se secaron a temperatura ambiente por 5 min para posteriormente secarlas en una estufa a 105 °C por una noche. Una vez transcurrido el tiempo de secado, las muestras se enfriaron y finalmente se determinó el peso. Con el residuo obtenido en la determinación de fibra dietaria insoluble se procedió a calcular el contenido de fibra soluble. Al residuo se le adicionó etanol al 95 % y se dejó reposar a temperatura ambiente por 60 min. Posteriormente, la muestra se filtró en papel Whatman (previamente pesado), con ayuda de una bomba de vacío y matraz Kitazato. El papel filtro se dejó por una noche en una estufa a 105 °C. La diferencia entre el peso del papel filtro se atribuyó a la fracción de fibra soluble.

5.5. Análisis fitoquímico de la hoja y la semilla cocida de frijol

5.5.1. Extracción de compuestos fenólicos

Para la extracción de los compuestos fenólicos de la harina de frijol cocido y la hoja de frijol se siguió la metodología descrita por Mendoza-Sánchez y colaboradores (2016). Se tomó una muestra de 0.25 g de harina de frijol, la cual se mezcló con 0.5 mL de metanol/agua (50:50) ajustada a pH 2 con HCl. Posteriormente, las muestras se sonicaron por 30 s, seguido de una centrifugaron a 25,000 g durante 5 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Al residuo se le adicionaron 0.5 mL de acetona/agua (70:30) y se centrifugó a 25,000 g durante 5 min a 4 °C. Luego, se combinaron ambos sobrenadantes, se removió el solvente por rota-evaporación y el extracto resultante se suspendió en 1 mL de metanol.

5.5.2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó por el método descrito por Singleton y colaboradores (1965) con las modificaciones pertinentes. En una microplaca, se colocaron 12.5 μ L del extracto y 30 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu 1

N. La reacción de oxidación se neutralizó mediante la adición de 156 μL de carbonato de sodio al 20 %. La mezcla se dejó reposar en la obscuridad durante 2 h a temperatura ambiente, y finalmente, se midió la absorbancia a 760 nm.

Los cálculos de compuestos fenólicos totales se realizaron mediante una curva de calibración con ácido gálico (0 - 20 μg). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g).

5.5.3. Cuantificación de flavonoides

La determinación de flavonoides totales se realizó por la metodología descrita por Heimler y colaboradores (2006). Se tomó una muestra de 31.25 μL del extracto correspondiente en una microplaca de 96 pozos, a la cual se le añadieron 156 μL de agua destilada y 9.4 μL de NaNO_2 . La mezcla reposó durante 6 min. Luego, se incorporaron 18.8 μL de AlCl_3 y se dejó reposar por 5 min. Finalmente, se adicionaron 63 μL de NaOH y la absorbancia se midió a 510 nm. Para realizar los cálculos, se utilizó una curva de calibración con catequina y los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina/g de muestra seca (mg ECat/g).

5.5.4. Cuantificación de taninos condensados

Para la cuantificación de taninos condensados se empleó la prueba de vainillina de Deshpande y Cheryan (1987). Del extracto correspondiente se colocaron 50 μL en una microplaca de 96 pozos. A esta muestra se le añadieron 200 μL de una mezcla recién preparada de vainillina al 0.5 % (vainillina 1 % en metanol y HCl 8 % en metanol en una relación 1:1). Posteriormente, se dejó reposar la mezcla durante 20 min y se midió la absorbancia a 492 nm.

La concentración de taninos condensados se determinó mediante una curva de calibración realizada con catequina en un rango de 0 a 0.2 mg/mL. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina/g de muestra seca (mg ECat/g).

5.5.5. Perfil de compuestos fenólicos por UPLC-ESI-MS/MS

El perfil de los compuestos fenólicos se analizó por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) acoplada a un espectrómetro de masas del tipo triple cuadrupolo (Waters Corp., Mildford, MA, USA) con una interfase de ionización por electrospray (ESI). La separación de los compuestos fenólicos se realizó usando una columna Acquity BEH C18 (1.7 μm , 2.1 x 100 mm) a 35 °C. Se empleó agua/ácido fórmico 7.5 mM para la fase (A) y acetonitrilo como fase (B) a una velocidad de flujo de 0.25 mL/min y volúmenes de muestra de 2 μL (Díaz-Rivas *et al.*, 2019). El gradiente de elución que se empleó se cita en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Gradiente de elución para compuestos fenólicos

Tiempo (min)	% A	% B
-	97.0	3.0
1.23	91.0	9.0
3.82	84.0	16.0
11.40	50.0	50.0
13.24	97.0	3.0
15.00	97.0	2.0

Las condiciones del espectrómetro de masas incluyeron un voltaje de capilar de 2.15 kV, cono de 30 V, fuente de salida 60 V, temperatura de la fuente de 150 °C, temperatura de desolvatación de 400 °C, un flujo de gas de cono de 150 L/h, flujo de gas de colisión de 0.15 mL/h y flujo de gas de nebulización de 700 bares. La energía de colisión en modo MS de 2.00 y en modo MS/MS de 20.00. Para la cuantificación de los compuestos identificados se utilizaron estándares a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

5.6. Modelo experimental de esteatosis hepática *in vivo*

Después de una semana de aclimatación con alimento comercial molido (Rodent Lab Chow 5001, Nupec®), los ratones se dividieron aleatoriamente en 2 grupos durante las primeras 14 semanas del experimento; el grupo control sano (n = 24), el cual se alimentó con dieta estándar (DE) y el grupo obeso (n = 72), el cual se alimentó con dieta alta en grasa y fructosa (DAGF, Cuadro 4). La DAGF se preparó con un 34 % de manteca de cerdo, 14 % de fructosa y 40 % de alimento estándar molido (Becerril-Campos *et al.*, 2021). Para mantener el aporte proteico de acuerdo con lo indicado en el etiquetado del alimento comercial, se añadió 9 % de caseinato de calcio. Asimismo, se añadió 1.6 % de salvado de trigo para cumplir con el contenido de fibra, y se incluyó 0.15 % de colato de sodio para favorecer la absorción de lípidos de la dieta. Durante la fase de tratamiento, las dietas se diseñaron para que fueran isocalóricas e isoproteicas, con el objetivo de evitar posibles interferencias en los efectos generados por los tratamientos empleados, de manera que los resultados obtenidos pudieran atribuirse directamente a los tratamientos y no a variaciones en la ingesta calórica o proteica.

La preparación de las dietas se llevó a cabo siguiendo los principios de las buenas prácticas de manufactura. Además, se aplicaron las prácticas establecidas en la NOM-251-SSA1-2009, las cuales abordan las buenas prácticas de higiene en el manejo de alimentos.

Cuadro 4. Contenido nutrimental de la dieta estándar y DAGF.

Nutrientes	Dieta estándar	Dieta alta en grasa y fructosa (DAGF)
Proteínas %	28.5	14.4
Carbohidratos %	58.1	40.5
Lípidos %	13.4	45.0
Kcal/g	3.4	4.7

Una vez finalizada las 14 semanas, los animales correspondientes al grupo obeso

se dividieron en 5 grupos (n = 12); el primer grupo se siguió alimentando con DAGF; el segundo grupo se alimentó con DAGF adicionada con 5 % de semilla de frijol cocido (SF) equivalente a 27.5 g (1/4 de taza) de frijol; el tercer grupo se alimentó con DAGF adicionada con 15 % de SF equivalente a 100 g (1/2 taza) de frijol; el cuarto grupo se alimentó con DAGF adicionada con 10 % de hoja de frijol (HF) y al quinto grupo se realizó un cambio de DAGF a dieta estándar (DE) durante 12 semanas adicionales (Cuadro 5, Figura 3).

La cantidad de semilla cocida de frijol adicionada a las dietas simulan el consumo de leguminosas per cápita del país (5 %) (CEDRSSA, 2020) y la dosis recomendada (15 %) por el Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes junto con la NOM-043-SSA2-2012, respectivamente. El 10 % de hoja de frijol se basa en el consumo de frutas y verduras (equivalente a 400 g diarios) recomendado por la OMS como parte de una dieta correcta y, debido a que el único tratamiento recomendado para la MAFLD es a través de una dieta equilibrada, se incluyó el grupo con cambio de DAGF a DE para simular dichos cambios en los hábitos alimenticios.

Cuadro 5. Grupos de estudio para la evaluación del efecto de la hoja y semilla de frijol cocido en animales con MAFLD

	Grupos	Tratamiento
1	Control	Dieta estándar (DE)
2	DAGF	DAGF
3	Semilla 5 %	DAGF + 5 % SF
4	Semilla 15 %	DAGF + 15 % SF
5	Hoja 10 %	DAGF + 5 % HF
6	Cambio de dieta	Dieta estándar (DE)

Cada caja fue identificada según el grupo experimental correspondiente, y a cada ratón se le asignó un marcado único en la cola utilizando diferentes colores. Es importante destacar que no se ha encontrado evidencia que informe sobre la

toxicidad en roedores del colorante utilizado.

Para confirmar la MAFLD en el modelo animal, se realizó una eutanasia parcial de 12 ratones del grupo obeso y 12 ratones del grupo sano transcurridas las 14 primeras semanas del experimento y se determinaron parámetros bioquímicos en suero, cuantificación de triglicéridos en hígado, mediciones antropométricas e histopatología (Figura 3).

Los animales de los 6 grupos experimentales restantes (n = 12) continuaron en el estudio y al finalizar el periodo de tratamiento se llevaron a cabo las mismas determinaciones mencionadas anteriormente. Además, se midió el daño oxidativo y la peroxidación lipídica, de acuerdo con los procedimientos que a continuación se describen.

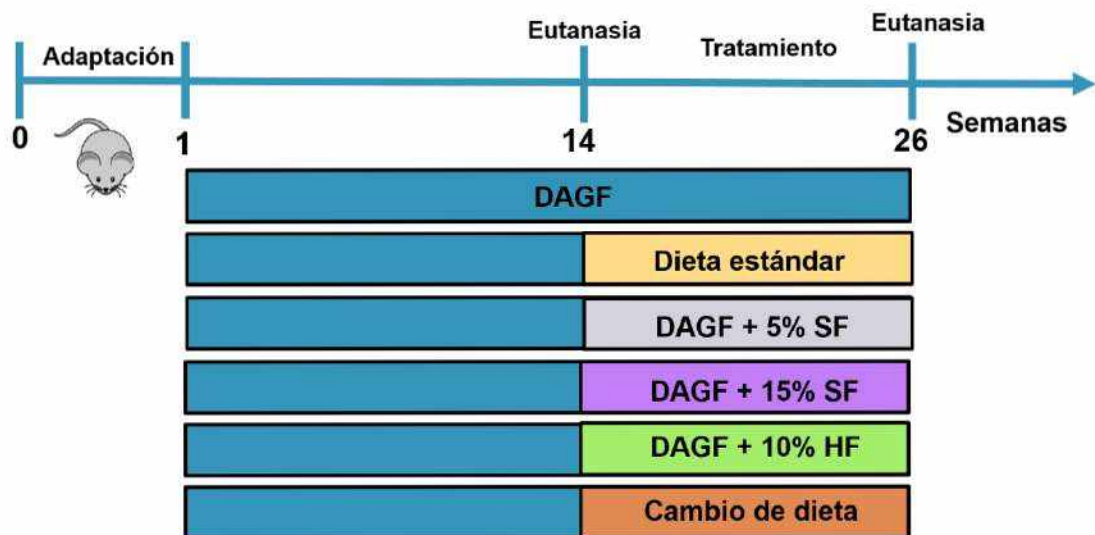


Figura 3. Modelo experimental de MAFLD *in vivo*.

Durante todo el experimento se llevó un registro semanal del peso corporal, consumo de agua y alimento.

Es importante informar que este proyecto forma parte de un proyecto de tesis doctoral, en donde 6 animales de cada grupo (n = 12) se destinaron a las pruebas

de comportamiento y análisis de marcadores en cerebro. Por lo anterior, se informa que en el proyecto integral se extrajeron muestras de sangre, el contenido de colon proximal y los tejidos tracto gastrointestinal, hígado, riñones, tejido adiposo y cerebro.

5.7. Eutanasia y obtención de muestras

Los animales de cada grupo se dividieron en dos partes, a la primera parte se les aplicó eutanasia por exposición a dióxido de carbono (CO₂) con un flujo del 20 % del volumen de la cámara por min, durante 60 s y punción cardiaca de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999. Posteriormente, se removieron los órganos correspondientes de acuerdo con la etapa de eutanasia (Figura 3), los cuales se lavaron con solución fisiológica estéril, se congelaron con nitrógeno líquido y almacenaron a -70 °C. Se reservó una porción de los tejidos en una solución de formaldehído al 10 % para los análisis histológicos.

En la otra mitad de los animales, la eutanasia se realizó utilizando pentobarbital (120 mg/Kg) disuelto en solución fisiológica vía intraperitoneal y punción cardiaca para la colección de sangre. Se bloqueó la circulación de la parte inferior del cuerpo y se perfundió con solución salina y paraformaldehído (4 %) a nivel de la cabeza para asegurar la obtención adecuada del cerebro, ya que se utilizará para estudios posteriores que forman parte de un proyecto de tesis doctoral. Los órganos restantes fueron enjuagados con solución fisiológica estéril, seguidamente congelados utilizando nitrógeno líquido y preservados a -70 °C. Se reservó una porción de los tejidos en una solución de formaldehído al 10 % para los análisis histológicos.

El material quirúrgico empleado en la eutanasia fue sumergido en solución de cloro durante 12 h, seguido de un lavado y esterilización para su posterior reutilización en el laboratorio. Los residuos biológicos provenientes de los ratones no necesarios para análisis y destinados a desecho fueron almacenados en bolsas grandes de color amarillo, marcadas con la etiqueta "desechos patológicos". En

cuanto a las jeringas utilizadas, estas fueron depositadas en un contenedor rojo de polipropileno diseñado específicamente para objetos punzocortantes, con la leyenda "residuos punzocortantes biológico-infecciosos". Ambos tipos de desechos fueron resguardados en un congelador con una temperatura máxima de 4 °C, durante un periodo no superior a 15 días, antes de su posterior transporte e incineración, siguiendo el procedimiento establecido en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

5.8. Evaluación del efecto del consumo de la hoja y la semilla cocida de frijol sobre la esteatosis hepática

Los procedimientos siguientes fueron llevados a cabo de acuerdo con los protocolos previamente estandarizados en el laboratorio para el modelo de esteatosis hepática en animales (Muñoz- Alvarado, 2021).

5.8.1. Análisis histológico del tejido hepático

Se realizaron cortes de tejido con un grosor de 1 x 1 cm, los cuales fueron posteriormente sumergidos en una solución de paraformaldehído al 10 % para su evaluación histopatológica. Los tejidos se fijaron en parafina, se realizaron cortes de 5 µm y se tiñeron con la solución hematoxilina y eosina (H&E). Se capturaron fotografías de las muestras de tejido hepático bajo microscopio a 40X, analizando 5 imágenes por corte por cada animal. La evaluación del grado de esteatosis hepática se llevó a cabo utilizando la clasificación de Brunt, categorizando la esteatosis en los grados siguientes: grado 0, sin grasa; grado 1, hepatocitos grasos ocupando <33 % del parénquima hepático; grado 2, hepatocitos grasos ocupando del 33-66 % del parénquima hepático; grado 3, hepatocitos grasos ocupando >66 % del parénquima hepático (Brunt *et al.*, 1991).

5.8.2. Cuantificación de triglicéridos (TG) en hígado

Las determinaciones de TG en hígado se realizó de acuerdo con el método de Norris y colaboradores (2003). Para la preparación de la muestra se utilizaron 200 mg de tejido y se homogenizó con 350 µL de KOH (30 %) en etanol (2:1) a 55 °C

durante una noche. Posteriormente, se agregaron 650 μL de etanol: agua (1:1) y luego las muestras se centrifugaron a 6,000 g por 5 min. Los sobrenadantes se recuperaron y se mezclaron con 215 μL de MgCl_2 1 M; las muestras se incubaron en hielo durante 10 min y posteriormente se centrifugaron a 6,000 g por 10 min. La cuantificación se llevó a cabo mediante un kit de la marca Spinreact (Barcelona,ESP) y los resultados se expresaron en mg de TG por gramo de tejido hepático (TG/g).

5.8.3. Enzimas de función hepática

Las enzimas hepáticas aspartato aminotransferasa (ALT) y alanina aminotransferasa (AST) fueron analizadas en suero utilizando un kit de la marca Spinreact (Barcelona,ESP). Los resultados se expresaron como unidades por litro (U/L).

5.9. Evaluación del efecto del consumo de la hoja y semilla de frijol sobre las alteraciones metabólicas asociadas al hígado graso

5.9.1. Cuantificación de glucosa en suero

Al momento de la eutanasia, se recolectó la sangre en tubos heparinizados. Luego, se centrifugó 10,000 g durante 10 min para obtener el suero. El suero resultante se distribuyó en varias alícuotas de 500 μL cada una y se almacenó a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el día de las determinaciones bioquímicas.

La determinación de glucosa en suero se llevó a cabo empleando un kit enzimático de la marca Spinreact (Barcelona, ESP). Los resultados se expresaron como mg/dL.

5.9.2. Determinación del perfil de lípidos en suero

En la MAFLD se presenta un estado de dislipidemia, caracterizado por niveles elevados de TG y colesterol en suero. La dislipidemia se considera como uno de los marcadores empleados para el diagnóstico temprano de esteatosis hepática, por lo que la determinación del perfil de lípidos en suero sirve como un indicador de la progresión de la enfermedad.

La determinación de perfil de lípidos (triglicéridos y colesterol total) en suero se llevó a cabo empleando kits enzimáticos de la marca Spinreact (Barcelona, ESP). En cada caso, los resultados se expresaron como mg/dL.

5.10. Evaluación del estrés oxidativo en hígado

Para la evaluación de los marcadores de estrés oxidativo, se siguieron los métodos estandarizados en el laboratorio.

5.10.1. Preparación de homogenados citosólicos

Para la preparación de los homogenados citosólicos, se pesaron 0.25 g de órgano en tubos cónicos Falcon de 15 mL. Luego, se añadieron 2.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7 (Anexo1) y se procedió a homogeneizar la muestra con un pistilo. Posteriormente, los homogenados se centrifugaron a 8,750 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se transfirió a tubos Eppendorf, dividiéndolos en tres partes, los cuales se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

5.10.2. Cuantificación de proteínas en homogenados citosólicos

La cuantificación de proteínas de los homogenados citosólicos se realizó por el método del ácido bicinonínico (Pierce™ BCA™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), empleando albúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés) como estándar para la curva de calibración, con concentraciones de 0 a 1.2 µg/mL.

Para la lectura de las muestras se realizaron diluciones apropiadas de los citosoles con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6.5 (Anexo 2), de acuerdo con las determinaciones antioxidantes que se describen a continuación. Posteriormente, se colocaron 50 µL del citosol diluido en una placa de 96 pozos, se agregaron 200 µL de la solución de trabajo para la determinación de proteína (Anexo 3) y se incubaron por 30 min a 37 °C. Después de este tiempo, la absorbancia se midió a una longitud de onda de 562 nm en un lector de microplacas (modelo Varioskan Flash, marca Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en µg/mL.

5.10.3. Determinación de glutatión reducido (GSH)

La concentración de grupos tioles totales (GSH total) se determinó por el método Ellman (1959), basado en la habilidad de grupo SH para reducir el ácido 5,5'-ditiobis dinitro benzoico (DTNB) a ácido 5-thio-2-nitrobenzoico (TNB).

Los niveles de GSH en las muestras se calcularon mediante la interpolación de la absorbancia en la curva de calibración previamente realizada, que incluyó concentraciones desde 0 a 100 μM . Para la realización de la curva estándar de GSH, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: Solución amortiguadora Tris-EDTA pH 8.2 (Anexo 4), solución de trabajo inicial para la curva estándar de GSH (Anexo 5), metanol y solución de DTNB 2.46 mM (Anexo 6). La reacción se inició con la adición del último reactivo y se incubó durante 5 min. Las muestras se leyeron inmediatamente por espectrofotometría a una λ de 412 nm a 25 °C. Los resultados se expresaron en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína.

En los homogenados citosólicos se precipitó la proteína con el siguiente procedimiento: en un tubo Eppendorf se adicionaron 120 μL de agua destilada, 150 μL de citosol concentrado y 30 μL de ácido tricloro acético (TCA) al 20 % (Anexo 7); a continuación, se dejó reposar por 30 min a 4 °C y luego se centrifugó a 8,750 g por 5 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a nuevos tubos Eppendorf. De este nuevo tubo se tomaron 50 μL para colocarse en una placa de 96 pozos. Se añadieron los reactivos en el siguiente orden: 150 μL de solución amortiguadora Tris-EDTA pH 8.2, 80 μL de metanol y 20 μL de DTNB. Las muestras se incubaron por 5 min y se leyeron inmediatamente con las mismas condiciones que la curva de calibración.

5.10.4. Determinación de la enzima glutatión S- transferasa (GST)

El método se fundamenta en la reacción catalizada por la enzima GST entre GSH y el sustrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzenueno), que posee un amplio rango para detectar diversas isoenzimas (Habig *et al.*, 1974). Se define una unidad de GST como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de CDNB-GSH conjugado por

minuto, según la metodología propuesta por Habig y colaboradores (1974).

Para la lectura de las muestras se realizaron diluciones adecuadas de los citosoles (equivalentes a las diluciones utilizadas en la determinación de proteína, y cuyo cambio en la absorbancia entre el min 2 y el min 1 estuviera dentro de intervalos de valores de 0.05 a 0.09). Se tomaron 50 μL de estas diluciones y se colocaron en una placa de 96 pozos, se agregaron 100 μL de la solución de trabajo de GSH 3 mM (Anexo 8) y se adicionaron 150 μL de la solución de trabajo CDNB de 2 mM (Anexo 9) en cada pozo. La formación del conjugado CDNB-GSH por la enzima de GST se monitoreó inmediatamente por espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm a 25 °C en un periodo de 2 min de reacción obteniendo lecturas cada 20 s.

Los resultados se expresaron en nmol de producto formado por mg de proteína por minuto, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{nmol/mg} \times \text{min} = (\Delta (\text{abs min 2} - \text{abs min 1})) / (\text{mg de proteína} (0.0096))$$

Donde:

Abs min 2: Absorbancia a 340 nm en el minuto 2 de reacción.

Abs min 1: Absorbancia a 340 nm en el minuto 1 de reacción.

mg proteína: miligramos de proteína de la muestra.

0.0096: es el coeficiente de extinción de CDNB ($\mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5.10.5. Determinación de la actividad de la enzima catalasa (CAT)

La actividad de CAT se midió por el método de Aebi (1984). Se realizaron diluciones apropiadas de los citosoles con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7 (Anexo 1).

Para esta determinación, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: en una celda de cuarzo se colocaron 1,700 μL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7, 300 μL de citosol diluido y 1 mL de H_2O_2 30 mM (Anexo 10). Las muestras se midieron de inmediato en un espectrofotómetro, dado que la reacción

inicia con la adición de H₂O₂. Se monitoreó la disminución en la absorbancia con una frecuencia de mediciones cada 5 s por un tiempo de corrida de 30 s basados en la velocidad de descomposición del H₂O₂ a 240 nm a 25 °C.

La actividad de CAT se expresó en unidades/mg de proteína usando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad CAT} = \frac{(\Delta\text{abs/min}) (\text{Vol. total}) (\text{Factor dilución})}{(\text{Vol. muestra}) (\text{Min}) (0.0436)}$$

Donde:

Vol. total: 3 mL

Vol. muestra: 0.30 mL

Min: 0.5

0.0436: Coeficiente de extinción de H₂O₂ (mM⁻¹ cm⁻¹)

5.10.6. Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de GPx se evaluó mediante el método de Plagia y Valentine (1976). Este método se basa en la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG), catalizado por la enzima GPx. El ciclo se completa con la conversión de GSSG a GSH mediante la acción de la enzima glutatión reductasa (GR) y NADPH.

Para la determinación, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: se colocaron en placas de 96 pozos 100 µL de solución amortiguadora de reacción Tris-EDTA pH 8 (Anexo 11), 50 µL de cocktail de GSH/GR (Anexo 12), 50 µL de muestra con la dilución apropiada (cuya absorbancia inicial se encuentre entre 0.8 y 1.2 y las pendientes sean negativas) y 50 µL NADPH 1.5 mM (Anexo 13). Justo antes de realizar la lectura, se adicionaron 50 µL de hidroperóxido de cumeno 3 mM (Anexo 14). Las mezclas se midieron de inmediato por espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm a 25 °C, con una frecuencia de mediciones cada 9 s por un tiempo de 2 min.

La actividad de GPx (unidades/mL) se calculó adaptando los cálculos de mg de

proteína con la cantidad de mL de muestra, usando la siguiente ecuación:

$$\mu\text{mol/mg} \times \text{min} = \frac{[(\text{Pendiente de la muestra}) - (\text{Pendiente del blanco de reacción})]}{(0.02018) (\text{mg de proteína})}$$

Donde:

0.02018: Coeficiente de absortividad molar de NADPH ($\text{nM}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

mg de proteína: mg de proteína de la muestra considerando el factor de dilución.

5.10.7. Índice de peroxidación lipídica

El índice de peroxidación lipídica en tejido hepático se determinó mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Aguilar-Díaz y Borges., 2020). Se tomaron 200 μL de homogenado citosólico y se adicionó 1 mL de solución de trabajo [ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.375 % , ácido tricloro acético (TCA) al 15 % y ácido clorhídrico al 2.1 %]. Las muestras se incubaron a 90 °C durante 20 min y se enfriaron por 8 min en agua a 18 °C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 8,750 g durante 10 min. Se tomaron 270 μL de sobrenadante y se colocaron en una placa de 96 pozos y la absorbancia se midió a 532 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresan por extrapolación con una curva de calibración de MDA (mg).

5.11. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el análisis proximal y fitoquímico de la hoja y la semilla cocida de frijol se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE). Los datos del estudio *in vivo* se expresaron como la media \pm error estándar (EE). En todos los casos se empleó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey-Kramer para la comparación de medias ($P < 0.05$). El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó a través del programa R, versión 3.6.0 y para los gráficos se empleó el programa estadístico Graphpad Prims 8 (Graphpad Software, USA).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización de la hoja y semilla cocida de frijol

6.1.1. Composición proximal de la hoja y semilla cocida de frijol

Diversos estudios sugieren el consumo de frijol para el control de enfermedades relacionadas con alteraciones en el metabolismo de lípidos (Ganesan *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2021). Dichos beneficios se han atribuido a su alto contenido en fibra dietaria y a la presencia de compuestos bioactivos principalmente compuestos fenólicos (Ciudad-Mulero *et al.*, 2020). Por lo tanto, para evaluar el contenido de estos compuestos se llevó a cabo la determinación de macronutrientes en la hoja y semilla cocida de frijol.

En el Cuadro 6 se presenta la composición proximal de las harinas de hoja y semilla cocida de frijol en base seca, en donde se puede observar que tanto la hoja como la semilla presentaron diversos componentes nutricionales, destacando el contenido de proteínas y carbohidratos hasta en un 26 y 62 %, respectivamente. Los carbohidratos representan el macronutriente más abundante en ambas harinas y, dentro de sus componentes, la fibra dietaria predomina hasta en un 33 %, en donde la semilla presentó un mayor contenido de fibra soluble, la cual se relaciona con la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Estudios previos realizados en modelos animales han informado que los AGCC intervienen en la regulación del metabolismo de lípidos y pueden mejorar la obesidad y la esteatosis hepática causada por la dieta (He *et al.*, 2020).

Los resultados del contenido de proteínas y carbohidratos coinciden con lo reportado por otros autores, quienes han encontrado una composición que va del 19 al 30 % y del 50 al 68 %, respectivamente, en harina de frijol cocido en diferentes variedades de frijol común (Bayo Madero, Pinto Durango, Flor de Mayo, Negro Querétaro). Dentro de estas variedades, Flor de Mayo presentó el valor más alto de dichos nutrientes (Ovando-Martínez *et al.*, 2011; Sánchez-Arteaga *et al.*, 2015; Herrera-Hernández *et al.*, 2018; Santiago-Ramos *et al.*, 2018).

Cuadro 6. Composición proximal de la hoja y semilla cocida de frijol

Parámetro	Hoja (%)¹	Semilla cocida (%)¹
Proteína	26.91 ± 1.01	21.93 ± 4.10
Lípidos	0.97 ± 0.60	1.61 ± 0.10
Carbohidratos	41.03 ± 0.37	62.34 ± 2.60
Fibra dietaria	Total	27.20 ± 1.60
	Soluble	2.10 ± 1.93
	Insoluble	25.10 ± 1.60

Los datos se expresan como la media ± desviación estándar (n = 3).

¹ El contenido proximal se determinó en base seca.

El contenido de fibra dietaria total (FDT) en la variedad Eugenia fue menor a lo reportado por Vergara-Castañeda y colaboradores (2010), quienes encontraron una composición de FDT de 41.2 % para la variedad Bayo Madero. Esta diferencia podría atribuirse principalmente a la variabilidad en los cultivares de frijol. Por otro lado, los valores de fibra soluble e insoluble fueron similares a lo reportado por otros autores para diferentes variedades de frijol cocido (Pinto Durango, Azufrado, Negro y Bayo Madero), con valores del 3 al 15 % para fibra soluble y de 15 a 35 % para fibra insoluble (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008; Campos-Vega *et al.*, 2009; Ramírez-Jiménez *et al.*, 2014; Treviño-Mejía *et al.*, 2016).

6.1.2. Composición fitoquímica de la hoja y semilla cocida de frijol

Los resultados de la cuantificación de compuestos fitoquímicos de la hoja y de la semilla cocida se muestran en el Cuadro 7. La concentración de compuestos fenólicos totales y flavonoides para la hoja de frijol se encuentran dentro de los valores reportados por Reyes-Martínez y colaboradores (2014), quienes evaluaron la composición fitoquímica de la hoja en algunas variedades de frijol común (Negro San Luis, Flor de Mayo, Pinto Durango y Bayo Madero), reportando una concentración de compuestos fenólicos totales de 0.96-5.60 mg EAG/g de harina y de flavonoides entre 0.28-1.03 mg ECat /g de harina.

Por otro lado, el contenido de compuestos fenólicos totales en la semilla cocida fue casi 3 veces superior a lo reportado por Lomas-Soria y colaboradores (2015), quienes encontraron 0.45 mg EAG/g de harina para el frijol cocido variedad Flor de Mayo; sin embargo, el contenido de flavonoides y taninos condensados de la variedad Eugenia fue menor con lo reportado por estos autores (1.99 y 3.59 mg ECat/g de harina, respectivamente). Estas diferencias pueden atribuirse principalmente al método de secado empleado, ya que en estudios posteriores se ha comparado el efecto de varios métodos de secado (secado con aire caliente, secado al sol, liofilización) sobre la composición fenólica en leguminosas, entre estas técnicas se encontró que el secado por liofilización exhibe un mayor contenido de compuestos fenólicos totales (Li *et al.*, 2023).

Cuadro 7. Composición fitoquímica de la hoja seca y la semilla cocida de frijol

Parámetro	Hoja	Semilla cocida
Compuestos fenólicos totales (mg EAG/g de harina)	4.75 ± 0.25	1.25 ± 0.06
Flavonoides (mg ECat/g de harina)	2.43 ± 0.98	0.67 ± 0.22
Taninos condensados (mg ECat/g de harina)	1.27 ± 0.17	0.22 ± 0.02

Los datos se expresan como la media ± desviación estándar (n = 3).

EAG: equivalente de ácido gálico, ECat: equivalente de catequina.

6.1.3. Perfil de compuestos fenólicos por UPLC-ESI-MS/MS

La identificación y cuantificación del perfilado de compuestos fenólicos se realizó en un UPLC-ESI-MS/MS (Cuadro 8). La semilla cocida presentó como compuestos mayoritarios los ácidos quínico, benzoico y ferúlico; mientras que, en la hoja predominaron los ácidos cumárico y caftárico. En estudios realizados por otros autores se han identificado los ácidos *p*-hidroxibenzoico (0.30-16.30 µg/g), cafeico (3.08-11.3 µg/g), cumárico (0.40-16.87 µg/g) y ferúlico (0.91-21.39 µg/g) como

ácidos fenólicos principales en la semilla cocida para diferentes variedades de frijol (Negro, Flor de Mayo, Flor de Junio y Peruano) coincidiendo con lo reportado en nuestro estudio (Díaz-Batalla *et al.*, 2006; López *et al.*, 2013; Lomas-Soria *et al.*, 2015; Telles *et al.*, 2017;). En cuanto a su actividad biológica, se ha comprobado que los ácidos fenólicos presentan actividad antioxidante y antihiperlipidémica que se asocia a un riesgo reducido de obesidad, diabetes y esteatosis hepática (Alam *et al.*, 2016; Melo *et al.*, 2017; Yen *et al.*, 2020). Yoon y colaboradores (2021) reportaron que la administración de ácido cumárico (10 mg/kg) durante 16 semanas redujo el tamaño de los adipocitos, la acumulación de grasa hepática y los niveles plasmáticos de glucosa en animales alimentados con una dieta alta en grasas.

Dentro de los flavonoides, la quercetina 3-O- β -glucurónido fue el componente mayoritario tanto en la hoja como en la semilla, seguido de la catequina y la rutina. Existe evidencia que demuestra que la quercetina es uno de los componentes más abundantes detectados en el frijol común y puede representar hasta el 26 % del total de compuestos fenólicos presentes (Yang *et al.*, 2018). Estudios en modelos animales han demostrado que la quercetina ejerce sus efectos antioxidantes inhibiendo la producción de peróxidos lipídicos, como el MDA, y promoviendo la actividad de las enzimas antioxidantes (Yi *et al.*, 2021). En otro estudio en un modelo *in vitro*, Shi y colaboradores (2021) reportaron los efectos inhibidores de un extracto de frijol rico en compuestos fenólicos (150 μ g/mL) sobre la acumulación de lípidos en los adipocitos; según los resultados de la caracterización fitoquímica, el ácido ferúlico, el ácido *p*-cumárico y la quercetina fueron los principales compuestos en el extracto. Por lo que, estos antecedentes sugieren que los compuestos fenólicos contribuyen a las propiedades antiobesogénicas y antihiperlipidémicas del frijol.

Como parte integral de este proyecto, en el equipo de trabajo se están llevando a cabo investigaciones adicionales con el objetivo de establecer correlaciones más específicas entre los compuestos identificados en la semilla y la hoja de frijol y los efectos observados, para proporcionar una comprensión más detallada de los mecanismos que respaldan los beneficios observados en relación con la MAFLD.

Cuadro 8. Caracterización de la hoja y la semilla cocida de frijol por UPLC-ESI-MS/MS

Compuesto	Tr (min)	Transición principal	Hoja µg/g de extracto	Semilla cocida µg/g de extracto
Ácidos fenólicos				
Ácido quínico	0.61	191.20 > 85.06	97.44 ± 7.08	953.10 ± 24.88
Ácido cinámico	2.48	147.17 > 103.08	72.41 ± 13.00	ND
Ácido caftárico	3.20	311.27 > 179.09	207.21 ± 22.20	ND
Ácido 4-hidroxibenzoico	3.62	137.04 > 93.05	106.59 ± 2.18	13.28 ± 4.58
Ácido cumárico	3.88	163.24 > 135.08	1283.81 ± 110.87	7.50 ± 0.15
Ácido ferúlico	4.30	193.24 > 134.04	95.53 ± 11.82	ND
Ácido cafeico	4.51	179.19 > 135.08	ND	0.61 ± 0.12
Ácido cumárico	5.67	163.24 > 119.08	ND	4.82 ± 1.03
Ácido ferúlico	5.96	193.24 > 134.04	ND	17.69 ± 0.52
Ácido 2-hidroxibenzoico	6.36	137.04 > 93.05	96.76 ± 10.79	11.19 ± 2.11
Ácido benzoico	6.81	121.10 > 77.10	49.55 ± 0.54	24.31 ± 3.69
Flavonoides				
Catequina	4.14	288.97 > 245.06	ND	86.06 ± 5.53
Epicatequina	5.05	288.97 > 245.06	ND	36.42 ± 3.06
Rutina	6.37	609.04 > 270.94	971.18 ± 73.19	9.74 ± 0.04
Taxifolina	6.37	303.03 > 285.00	ND	1.98 ± 0.51
Quercetina 3-O-β - glucurónico	6.47	476.92 > 300.99	6892.20 ± 99.42	206.29 ± 19.14
Quercetina 3-O- glucósido	6.47	463.36 > 300.42	73.05 ± 7.53	2.78 ± 0.75
Kaempferol 3-O- glucósido	7.06	447.30 > 284.24	11.24 ± 0.10	3.65 ± 0.68
Quercetina	8.57	300.95 > 150.96	ND	2.62 ± 0.24
Apigenina	9.47	269.27 > 117.04	ND	4.64 ± 1.46

Los resultados se presentan como la media ± desviación estándar (n = 2).

Tr: tiempo de retención, ND: no detectado.

6.2. Inducción de la MAFLD en un modelo *in vivo*

Para inducir la enfermedad del hígado graso asociado a la disfunción metabólica (MAFLD, por sus siglas en inglés) se emplearon 96 ratones macho de la cepa C57BL/6 y se formaron 2 grupos: el grupo sano (n = 24), alimentado con dieta estándar (DE), y el grupo enfermo (n = 72), alimentado con dieta alta en grasa y fructosa (DAGF). Se ha reportado que los modelos de esteatosis hepática inducidos por una DAGF provocan un fenotipo similar a la enfermedad humana, caracterizado por la obesidad, hiperglicemia e hiperlipidemia (Gauthier *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2017), lo que confirma el estado metabólico presente en la MAFLD.

Para confirmar la esteatosis hepática en el modelo animal se realizó una eutanasia parcial de 12 ratones del grupo DAGF y 12 ratones del grupo DE transcurridas las 14 primeras semanas del experimento.

La obesidad está estrechamente relacionada con la MAFLD y se ha informado que la MAFLD se encuentra presente en el 51 % de los pacientes con obesidad (Gutiérrez-Cuevas *et al.*, 2021); por lo que, lo primero que se evaluó en este estudio fue la ganancia de peso entre los animales alimentados con DE y DAGF. Como se esperaba, el grupo alimentado con DAGF obtuvo una mayor ganancia de peso corporal (11 %) respecto a la de los animales alimentados con DE ($P < 0.05$) (Figura 4), confirmando el desarrollo de obesidad en este grupo, ya que en modelos animales se ha reportado que cuando existe una diferencia del más del 10 % en el peso corporal entre los animales alimentados con una dieta alta en grasas respecto al peso de los animales sanos, se desarrolla obesidad (Hariri & Thibault, 2010).

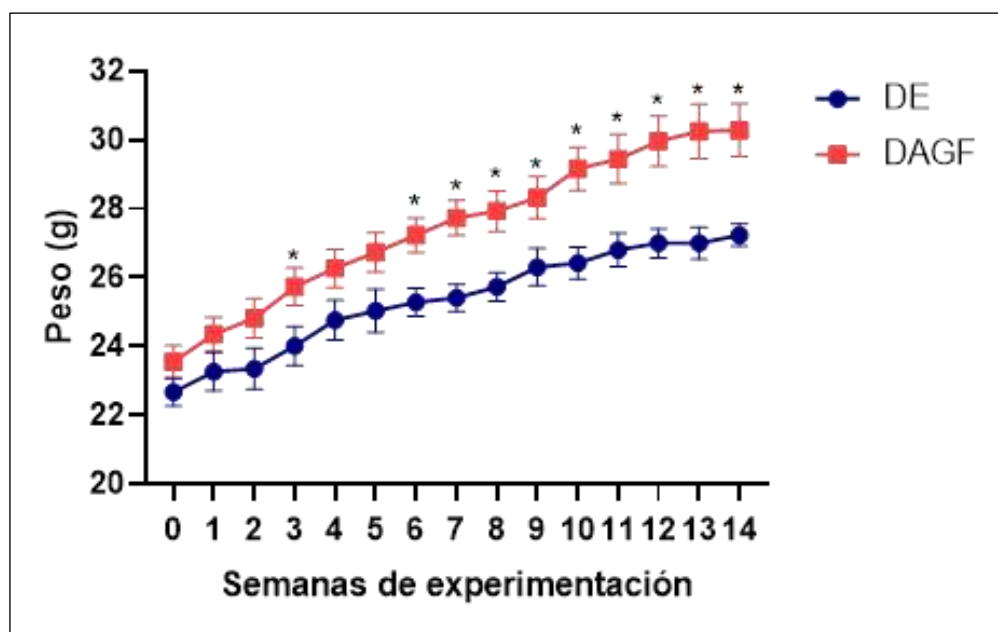


Figura 4. Peso corporal de los animales alimentados con dieta estándar y dieta alta en grasa y fructosa durante 14 semanas.

Los datos se expresan como la media \pm EE (n = 24 para DE, n = 72 para DAGF). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa con respecto al grupo DE mediante la prueba t de Welch. DE: dieta estándar, DAGF: dieta alta en grasa y fructosa.

La MAFLD se identifica macroscópicamente por una acumulación excesiva de lípidos en el hígado. Como se puede observar en el Cuadro 9, el grupo DE no presentó esteatosis hepática, ya que la infiltración de grasa fue menor al 5 %; mientras que, los hígados de los animales del grupo DAGF presentaron una mayor acumulación de gotas lipídicas medianas y pequeñas en las células del parénquima y desarrollaron esteatosis grado I y II (Figura 5).

Cuadro 9. Grado de esteatosis hepática en ratones alimentados con DE y DAGF

Grupos	Grado de esteatosis *				Total
	0	I	II	III	
DE	2	1			3
DAGF		1	2		3

DE: dieta estándar, DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. * En base a la clasificación de Brunt.

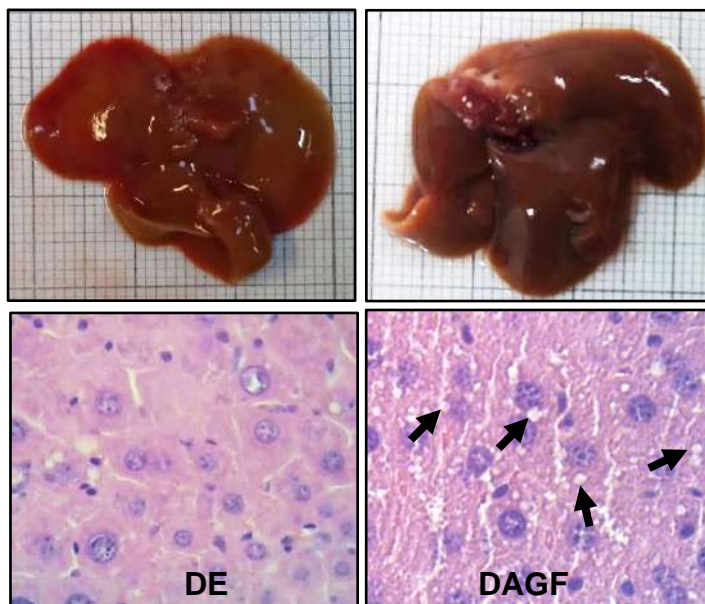


Figura 5. Histología hepática de los animales alimentados con DE y DAGF teñidos con H&E (aumento 40x). DE: dieta estándar, DAGF: dieta alta en grasa y fructosa.

Los resultados anteriores se pueden corroborar con la cuantificación de TG en hígado (Cuadro 10), donde se observa que los animales del grupo enfermo presentaron un mayor contenido de TG hepáticos, hasta en un 53 % en comparación al grupo DE ($P < 0.05$), lo que confirma la esteatosis hepática en el grupo DAGF. Estos resultados son similares a lo reportado en otros estudios realizados en modelos animales, en donde se ha observado el incremento y la acumulación de TG en hígado hasta en un 60 %, comparado con los valores de los animales alimentados con dieta estándar, debido a que las dietas ricas en grasas y carbohidratos promueven la acumulación de lípidos hepáticos (Oosterveer *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2023). En otro estudio realizado por Li y colaboradores (2022), también se observó un aumento de 56 y 15% de TG hepáticos y enzimas de daño hepático (AST), respectivamente, en ratones alimentados con una dieta alta en grasa (60 % de calorías provenientes de grasa) durante 15 semanas.

También se evaluó la actividad de las enzimas AST y ALT, ya que las concentraciones séricas elevadas de estas enzimas se emplean para el diagnóstico de enfermedades hepáticas (Sattar *et al.*, 2014). Como se muestra en el Cuadro 10, el grupo DAGF presentó un aumento significativo en la actividad sérica de ambas enzimas en comparación con los valores del grupo DE ($P < 0.05$), lo que indica un mayor daño hepático causado por el consumo de la DAGF. Lo anterior se pudo corroborar con lo reportado en otros estudios, en donde ratones alimentados con dietas altas en grasa presentaron un aumento de AST y ALT hasta en un 25 y 30 %, respectivamente (Song *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022).

Cuadro 10. Contenido de triglicéridos hepáticos y enzimas de daño hepático en los animales de experimentación.

	DE	DAGF
Triglicéridos hepáticos (mg/g tejido)	3.10 ± 0.18	4.75 ± 0.23 *
Enzimas de daño hepático (U/L)		
AST	128.04 ± 2.06	142.33 ± 2.47 *
ALT	70.88 ± 2.89	87.31 ± 1.88 *

Los datos se expresan como la media ± EE (n = 8 para DE, n = 10 para DAGF). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa con respecto al grupo alimentado con DAGF ($P < 0.05$), mediante la prueba t de Welch. DE: dieta estándar, DAGF: dieta alta en grasa y fructosa.

Comparado con los valores de referencia para ratones con dieta estándar reportado por Mazzacara y colaboradores (2008), los niveles de ambas enzimas en los animales del grupo DE presentaron un ligero incremento en nuestro estudio comparado con lo reportado por dichos autores, quienes encontraron valores para AST y ALT en un rango de 60-110 U/L y 45-60 U/L, respectivamente. Los resultados anteriores podrían atribuirse a diversos factores como el procedimiento de las muestras, el equipo y los métodos utilizados para los análisis, entre otros (Otto *et al.*, 2016).

La hiperglicemia y la dislipidemia, que forman parte del síndrome metabólico, se consideran factores de riesgo estrechamente relacionados con la MAFLD. Por lo tanto, dichos parámetros también son empleados comúnmente para el diagnóstico de esteatosis hepática tanto en humanos como en modelos animales (Van Herck *et al.*, 2017; Friedman *et al.*, 2018). En el Cuadro 11 se presentan los resultados de la determinación de glucosa, TG y colesterol total en suero, en donde los animales alimentados con DAGF presentaron valores mayores de estos parámetros bioquímicos hasta en un 55, 27 y 21%, respectivamente, comparado con los valores de los animales alimentados con DE ($P < 0.05$).

Cuadro 11. Parámetros bioquímicos en suero de animales alimentados con DE y DAGF.

Parámetros (mg/dL)	DE	DAGF
Glucosa	134.90 ± 4.96	209.20 ± 3.07 *
Triglicéridos	94.57 ± 1.53	120.12 ± 7.53*
Colesterol	101.51 ± 2.73	122.97 ± 3.37*

Los datos se expresan como la media ± EE (n = 8 para DE, n = 10 para DAGF). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa con respecto al grupo alimentado con DAGF ($P < 0.05$), mediante la prueba t de Welch. DE: dieta estándar; DAGF: dieta alta en grasa y fructosa.

Una vez confirmado el modelo de esteatosis hepática bajo los parámetros evaluados anteriormente se inició con los tratamientos, los cuales se mencionan a continuación.

6.3. Efecto de la hoja y semilla cocida de frijol sobre la esteatosis hepática

En esta etapa del proyecto se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la esteatosis hepática, por lo que primero se llevó a cabo el análisis histológico en hígado. En la Figura 6b se presentan las micrografías de secciones de hígado del grupo DAGF, donde se observan numerosas vacuolas lipídicas y hepatocitos con esteatosis macrovesicular. En cuanto a los tratamientos, el grupo con hoja de frijol

10 % mostró un menor grado de acumulación de gotas lipídicas (Figura 6c) en comparación con el grupo DAGF. De manera similar, Becerril-Campos y colaboradores (2023) observaron que ratas alimentadas con DAGF suplementada con hoja de frijol (10 %) durante 13 semanas no presentaron esteatosis hepática (infiltración de grasa menor al 5 %); mientras que, el grupo sin tratamiento presentó una acumulación de grasa hepática macrovesicular menor o igual al 33 %, indicando que el consumo de la hoja de frijol previno el riesgo de desarrollar esteatosis grado I.

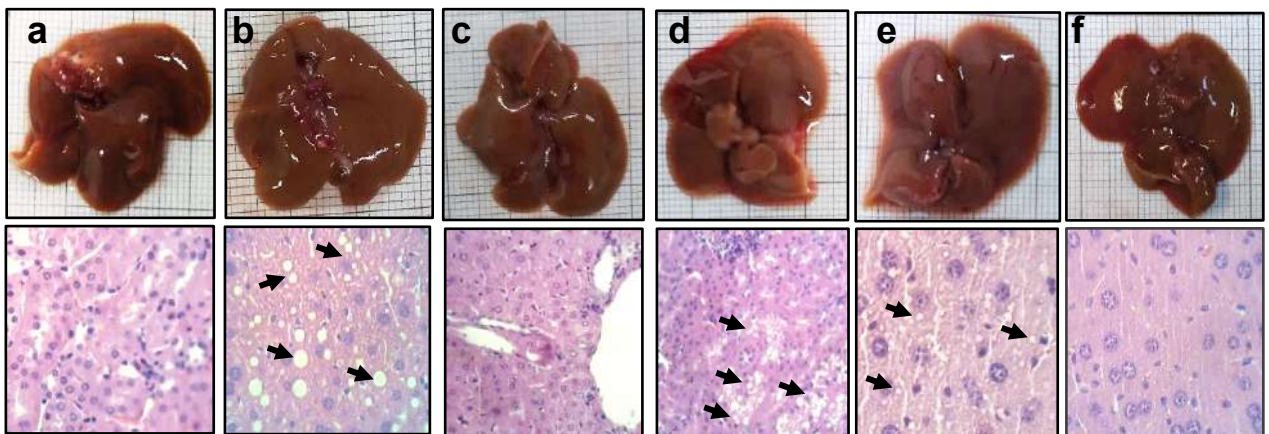


Figura 6. Histología hepática de los animales alimentados con DAGF y tratados con hoja y semilla de frijol.

Hígados teñidos con H&E (aumento 40x). Las flechas indican las gotas de grasa dentro de los hepatocitos. a) dieta estándar, b) DAGF, c) DAGF suplementada con HF 10 %, d) DAGF suplementada con SF 5 %, e) DAGF suplementada con SF 15 %, f) SDP. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa, HF: hoja de frijol, SF: semilla de frijol, SDP: cambio de dieta.

El grupo tratado con semilla de frijol 15 % también mostró un mejor efecto sobre la acumulación de gotas lipídicas (Figura 6e) y el grado de esteatosis, ya que como se observa en el Cuadro 12, el 75 % de los animales de este mismo grupo presentó esteatosis grado I de tipo microvesicular, a diferencia del grupo alimentado con semilla de frijol 5 %, en donde el 50 % de los animales de este grupo desarrolló esteatosis grado II y III de tipo macrovesicular. Diversos autores sugieren que los efectos benéficos del frijol contra la esteatosis hepática dependen principalmente de la dosis consumida. En este sentido, Feng y colaboradores (2023) informaron de

una reducción en la acumulación de lípidos hepáticos en ratones alimentados con una dieta alta en grasa suplementada con frijol cocido (20 %) durante 12 semanas. Dichos autores sugieren el 20 % de frijol cocido como una dosis eficaz para la prevención de la esteatosis hepática inducida por una dieta alta en grasas, basándose en un nivel alcanzable y fisiológicamente relevante de ingesta de leguminosas en humanos, como se sugiere en las guías de alimentación.

Cuadro 12. Grado de esteatosis hepática en ratones alimentados con DAGF y tratados con semilla y hoja de frijol.

Grupos	Grado de esteatosis *				Total n
	0	I	II	III	
DE	3	1			4
DAGF		1		1	2
HF 10 %	2		1		3
SF 5 %		2	1	1	4
SF 15 %		3	1		4
SDP		4		1	5

DE: dieta estándar, DAGF: dieta alta en grasa y fructosa, HF: hoja de frijol, SF: semilla de frijol, SDP: cambio de dieta. * En base a la clasificación de Brunt.

En cuanto al contenido de TG en hígado, los resultados indican que los animales alimentados con DAGF presentaron un alto contenido de TG hepáticos, hasta en un 62 %, comparado con el grupo control DE; mientras que, los grupos tratados con hoja de frijol 10% y semilla al 15 % mostraron una concentración significativamente menor de TG hepáticos comparado con el grupo DAGF ($P < 0.05$) (Figura 7). Como era de esperar, el grupo con el cambio de dieta también presentó una disminución significativa de estos compuestos.

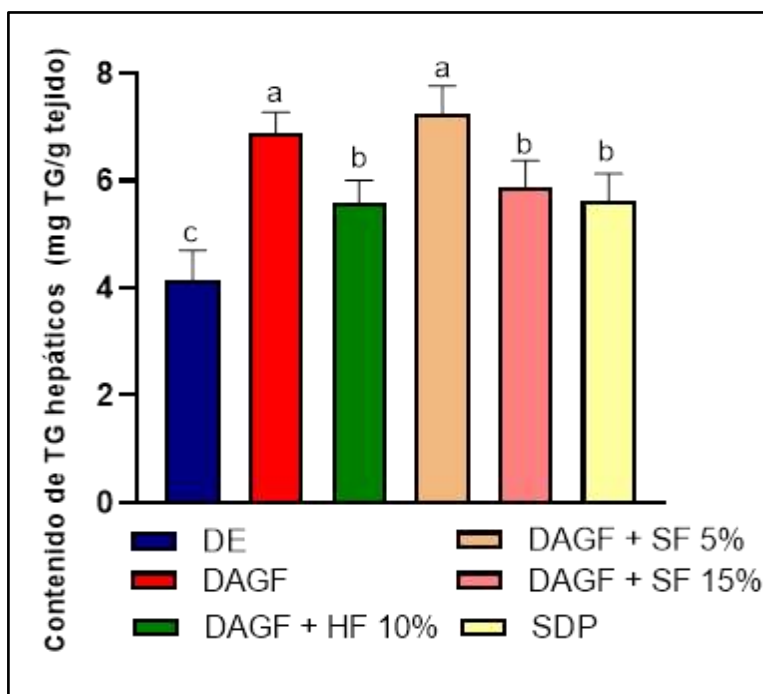


Figura 7. Contenido de TG hepáticos de animales alimentados con DAGF y tratados con hoja y semilla de frijol

Los datos se expresan como la media \pm DE (n = 6). Letras distintas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (P < 0.05), mediante la prueba de Tukey. DE: dieta estándar, DAGF: dieta alta en grasa y fructosa, HF: hoja de frijol, SF: semilla de frijol, SDP: cambio de dieta.

Estos resultados coinciden con otros estudios realizados en modelos animales, donde se ha observado una disminución en los niveles de TG hepáticos (15-30 %) inducidos por dietas altas en grasa y carbohidratos y suplementadas con semilla de frijol en concentraciones de 20 a 35 % (Kim *et al.*, 2016; Lutsiv *et al.*, 2023). Es posible que este efecto se deba a una disminución en la lipogénesis *de novo* en hígado, ya que algunos autores han sugerido que los compuestos fenólicos presentes en el frijol como la quercetina, la catequina y el ácido *p*-cumárico tienen la capacidad de inhibir la expresión del factor de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroides 1c (SREBP-1c), el cual regula la expresión de genes implicados en la síntesis *de novo* de ácidos grasos (Ganesan & Xu, 2017; Yi *et al.*, 2021).

Como se observa en la Figura 8a, ningún grupo tratado mostró diferencia significativa en los niveles séricos de la enzima AST, respecto al grupo DAGF. Caso contrario se vio reflejado en los niveles de la enzima ALT (Figura 8b), donde los grupos tratados con hoja de frijol 10 % y cambio de dieta presentaron una disminución significativa en comparación con el grupo DAGF ($P < 0.05$), lo que indica que estos tratamientos ejercieron un mejor efecto hepatoprotector en la esteatosis.

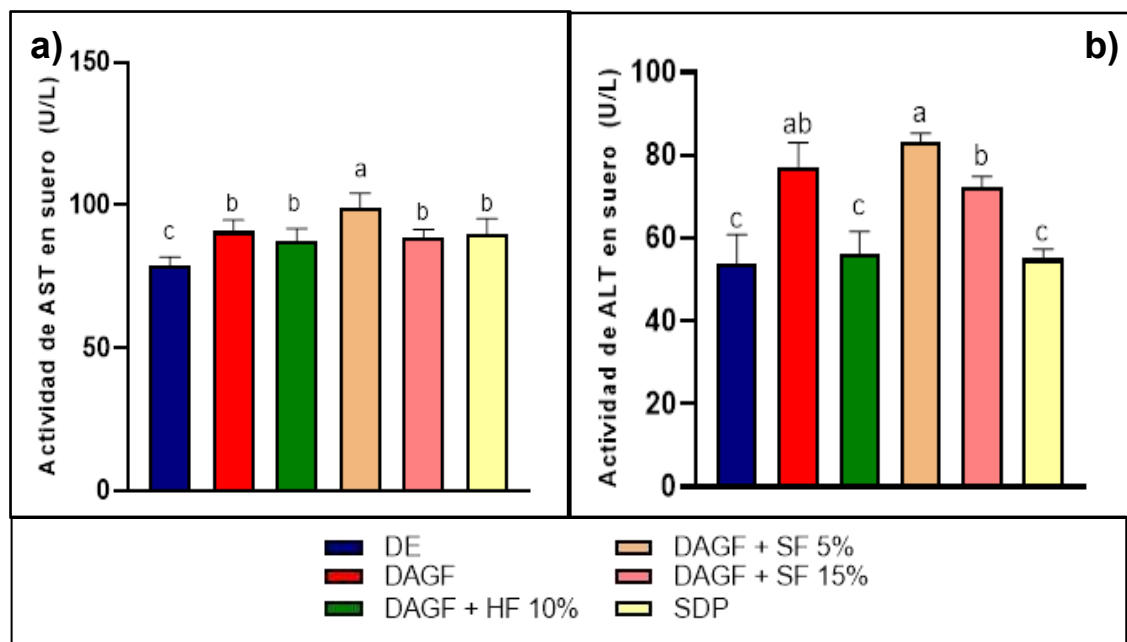


Figura 8. Enzimas transaminasas en suero de animales alimentados con DAGF y tratados con hoja y semilla de frijol.

Los datos se expresan como la media \pm DE ($n = 6$). Letras distintas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos ($P < 0.05$), mediante la prueba de Tukey. DE: dieta estándar, DAGF: dieta alta en grasa y fructosa, HF: hoja de frijol, SF: semilla de frijol, SDP: cambio de dieta, ALT: alanina aminotransferasa, AST: aspartato aminotransferasa.

6.4. Efecto de la hoja y semilla cocida de frijol sobre las alteraciones metabólicas asociadas a la esteatosis hepática

Entre las alteraciones metabólicas relacionadas a la esteatosis hepática se incluyen la obesidad, la hiperglicemia y la dislipidemia. Por lo que en esta etapa del proyecto se evaluaron los efectos como tratamiento de la hoja y la semilla cocida sobre dichas alteraciones. En la Figura 9 se presentan los resultados del peso corporal de los animales durante la etapa de tratamiento. Se puede observar que, a las 26 semanas de experimentación, los animales del grupo DAGF conservaron la ganancia del peso corporal (10 %) respecto a los animales del grupo control DE ($P < 0.05$). En el caso del grupo tratado con hoja de frijol 10 %, se puede observar que después de la segunda semana de tratamiento los animales comenzaron a perder peso y, al finalizar las 12 semanas de tratamiento, este grupo presentó una pérdida de peso del 9 % comparado con el grupo DAGF.

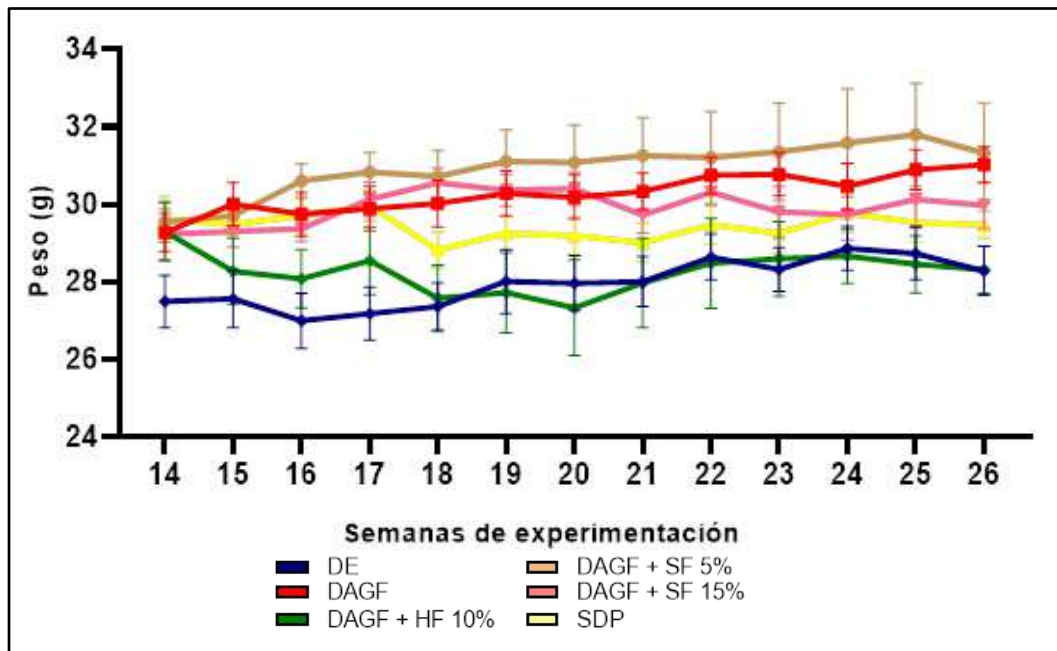


Figura 9. Peso corporal de los animales alimentados con DAGF y tratados con hoja y semilla de frijol durante las 12 semanas de tratamiento.

DE: dieta estándar, DAGF: dieta alta en grasa y fructosa, HF: hoja de frijol, SF: semilla de frijol, SDP: cambio de dieta.

En cuanto a los grupos tratados con semilla cocida, el grupo con frijol adicionado al 5 % no presentó reducción del peso corporal; mientras que, el grupo con el 15 % de semilla de frijol presentó una menor ganancia de peso (5 %) respecto al grupo DAGF ($P < 0.05$) y, como era de esperar, el grupo con el cambio de dieta también mostró la menor ganancia del peso corporal. Tan y colaboradores (2021) observaron que la suplementación de frijol cocido (20 %) en un modelo animal con una dieta alta en grasa (46 % de calorías provenientes de grasa) durante 13 semanas disminuyó la ganancia del peso corporal comparado con el grupo alimentado únicamente con la dieta alta en grasa. Por su parte, Thompson y colaboradores (2023) reportaron sobre el efecto antiobesogénico del frijol en un modelo de obesidad en ratones. En este experimento, los ratones se sometieron a una dieta alta en grasas y suplementada con harina de frijol cocido en tres concentraciones diferentes (17.5, 35 y 70 %) durante un periodo de 14 semanas. Los resultados mostraron una disminución en el aumento del peso corporal y una supresión en la acumulación de grasa a medida que se aumentaba la cantidad de frijol en la dieta. Estos hallazgos realizados con un enfoque preventivo respaldan lo establecido de que mayores concentraciones de frijol tienen un impacto más favorable en el peso corporal de los animales con MAFLD.

Por otro lado, se llevó a cabo la evaluación de los niveles de glucosa, TG y colesterol total en el suero, dado que la elevación de estos parámetros contribuye a la progresión de MAFLD. Los resultados presentados en el Cuadro 13 muestran que el grupo DAGF presentó un incremento significativo (46 %) en los niveles de glucosa comparado con el grupo control DE. Por otro lado, se observó una disminución significativa de los niveles de glucosa en el resto de los grupos experimentales en comparación con los valores del grupo DAGF. Estos hallazgos coinciden con investigaciones previas realizadas en modelos animales de prevención, las cuales indican que la inclusión de frijol cocido en dietas ricas en grasas y carbohidratos puede reducir los niveles de glucosa en suero hasta en un 35 % en comparación con los grupos que no recibieron frijol en su dieta (Zhao *et al.*, 2021; Feng *et al.*,

2023; Pérez-Ramírez *et al.*, 2023). Existe evidencia que indica que el efecto hipoglucémico del frijol podría atribuirse a los carbohidratos no digeribles, como la fibra dietaria soluble e insoluble que, junto con la producción de AGCC, previenen niveles elevados de glucosa, así como a los compuestos fenólicos debido a sus efectos inhibidores sobre la actividad de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa (Hayat *et al.*, 2014; Ramírez-Jiménez *et al.*, 2014; Chávez-Mendoza & Sánchez, 2017; Ganesan & Xu, 2017).

En cuanto al perfil lipídico, los animales del grupo DAGF mostraron un aumento de hasta un 42 % en los niveles de TG y un 21% en los niveles de colesterol total en comparación con los valores observados en los animales alimentados con la DE. En el caso del grupo tratado con hoja de frijol se observó una reducción significativa en los niveles de TG séricos, aunque no se registró ningún efecto significativo en los niveles de colesterol total respecto al grupo DAGF ($P < 0.05$). Este mismo efecto también se vio reflejado en los grupos tratados con semilla de frijol en ambas concentraciones (Cuadro 13).

Cuadro 13. Parámetros bioquímicos evaluados en ratones alimentados con DAGF y tratados con hoja y semilla cocida de frijol.

Tratamiento	Glucosa (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)
DE	156.96 \pm 1.32 ^c	99.49 \pm 3.95 ^d	98.35 \pm 0.95 ^d
DAGF	228.98 \pm 4.07 ^a	141.11 \pm 4.24 ^a	119.66 \pm 3.43 ^{ab}
DAGF + HF 10 %	161.55 \pm 3.46 ^c	110.71 \pm 7.30 ^c	114.39 \pm 3.51 ^b
DAGF + SF 5 %	171.54 \pm 1.41 ^b	127.02 \pm 3.26 ^b	120.93 \pm 1.60 ^a
DAGF + SF 15 %	168.29 \pm 3.77 ^b	112.26 \pm 9.04 ^c	114.58 \pm 5.56 ^b
SDP	159.81 \pm 3.80 ^c	106.76 \pm 7.66 ^{cd}	104.94 \pm 4.21 ^c

Los datos se expresan como la media \pm DE (n = 8). Letras distintas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos ($P < 0.05$), mediante la prueba de Tukey. DE: dieta estándar, DAGF: dieta alta en grasa y fructosa, HF: hoja de frijol, SF: semilla de frijol, SDP: cambio de dieta.

En base a la integración de los resultados, este estudio reveló una correlación positiva entre el contenido de TG hepáticos y los niveles séricos de glucosa ($r = 0.87$, $P < 0.05$). La literatura respalda la propuesta de que el aumento en la lipogénesis *de novo*, utilizando los carbohidratos de la dieta como sustrato, junto con los ácidos grasos provenientes del tejido adiposo y la dieta, contribuyen a la acumulación de TG hepáticos (Shao *et al.*, 2020; Gutiérrez-Cuevas *et al.*, 2021). De manera interesante, en este estudio se observó que el contenido de TG hepáticos se asoció con un mayor grado de esteatosis (grado III) ($r = 0.86$, $P < 0.05$). Por el contrario, los animales tratados con hoja de frijol mostraron una reducción significativa en los niveles de TG séricos (18 %) en comparación con el grupo enfermo DAGF, lo que a su vez se reflejó en un menor grado de esteatosis. Este efecto también se evidenció en los grupos tratados con semilla de frijol en ambas concentraciones (5 y 15 %).

Diversos autores han reportado el efecto hipotrigliceridémico del frijol debido a su composición fitoquímica, principalmente por su contenido en flavonoides y ácidos fenólicos. Estos compuestos desempeñan un papel crucial en la regulación del metabolismo de lípidos al disminuir la lipogénesis *de novo* y aumentar la oxidación de ácidos grasos (Thompson *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2022; Lutsiv *et al.*, 2023). Pérez-Ramírez y colaboradores (2023) observaron una disminución de TG séricos en ratas alimentadas con una DAGF tratadas con semilla de frijol cocido a una concentración del 10 % durante 6 meses; así mismo, estos autores también realizaron un estudio *in vitro* para demostrar el efecto de los extractos de frijol cocido sobre la expresión de genes asociados al metabolismo de lípidos, observando la regulación negativa de la lipogénesis y la regulación positiva de la β -oxidación de ácidos grasos en los adipocitos, lo que puede asociarse con su efecto hipotrigliceridémico. Entre los compuestos fitoquímicos identificados en el frijol que podrían asociarse con este efecto se encuentran la catequina, la epicatequina, la hesperidina, el ácido elágico, así como también la soyasaponina A3.

Estudios clínicos han indicado que los pacientes con esteatosis hepática

acompañada de obesidad, diabetes o dislipidemia tienen más probabilidades de tener resultados hepáticos adversos con una tasa de progresión a fibrosis del 22 al 60 % (Liu *et al.*, 2022). Por lo que resulta crucial abordar estos trastornos metabólicos como parte del manejo de esta enfermedad hepática. Por lo anterior, los resultados de este estudio sugieren que los animales tratados con hoja de frijol 10 % fueron los que presentaron una mayor protección contra el desarrollo de MAFLD.

Otro de los factores que contribuyen fuertemente en la progresión de MAFLD es el estrés oxidativo (EO). Se ha demostrado que el aumento en la generación de EROs puede inducir la peroxidación lipídica, lo que a su vez conduce a la inflamación y la fibrogénesis mediante la activación de las células hepáticas estrelladas, lo que fomenta la progresión de MAFLD a fibrosis y, en última instancia, a carcinoma hepatocelular (Hong *et al.*, 2021). Por lo tanto, en estudio, también se analizaron varios marcadores de estrés oxidativo que se detallan a continuación.

6.5. Efecto de la hoja y semilla cocida de frijol sobre marcadores de estrés oxidativo en tejido hepático

El hígado cuenta con sistemas de defensa antioxidante, tanto enzimáticos como no enzimáticos, diseñados para contrarrestar los efectos de las EROs y mantener la homeostasis celular. Sin embargo, la acumulación excesiva de grasa inducida por la exposición a una DAGF puede conducir a la disfunción mitocondrial, lo que, a su vez, da lugar a la sobreproducción de EROs, desencadenando el EO (Masarone *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2022).

Para evaluar el efecto de la hoja y semilla cocida de frijol sobre el estado redox en la MAFLD se analizó la actividad de las enzimas glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT), así como los contenidos de MDA (producto derivado de la lipoperoxidación) y glutatión reducido (GSH) en hígado.

GST y GPx son enzimas multifuncionales que, a través de sus diferentes actividades, protegen los tejidos de los efectos tóxicos de algunas EROs, así como

de los productos nocivos de la peroxidación lipídica. Generalmente, la enzima GST interviene en la reducción de hidroperóxidos orgánicos utilizando GSH como donante y cataliza la formación de conjugados entre GSH y una amplia variedad de compuestos electrofílicos, como carcinógenos, toxinas y fármacos (Czuczejko *et al.*, 2019). Por otro lado, la enzima GPx cataliza la reducción de varios hidroperóxidos, incluyendo peróxidos lipídicos mediante la oxidación de GSH (Marín-García., 2014).

En este estudio se evidenció una correlación negativa entre el sobrepeso u obesidad con la actividad de las enzimas GST y GPx ($r = -0.94$ y $r = -0.84$, respectivamente, $P < 0.05$), lo que podría sugerir que en un estado de obesidad los sistemas antioxidantes se encuentran disminuidos debido al aumento del EO. En este sentido se encontró una correlación positiva entre el sobrepeso u obesidad con los niveles de MDA hepáticos ($r = 0.90$, $P < 0.05$). De igual manera, Nadal-Casellas y colaboradores (2010) demostraron en un modelo de obesidad en ratas que el consumo de una dieta alta en grasas durante 26 semanas aumenta la peroxidación lipídica en el hígado incrementando los niveles de MDA.

De manera interesante, en nuestro estudio se encontró una correlación negativa entre el contenido de MDA, los niveles de TG séricos y TG hepáticos con la actividad de la enzima GST ($r = -0.82$, $r = -0.80$ y $r = -0.83$, respectivamente, $P < 0.05$). En particular, los animales tratados con hoja de frijol mostraron un aumento significativo del 12 y 46 % en las enzimas GST y GPx, respectivamente (Cuadro 14), lo que indica una mayor capacidad antioxidante y posiblemente una reducción en la peroxidación lipídica, como se refleja en la disminución de los niveles de MDA (Figura 10a). Estos resultados, en conjunto, apuntan hacia una mejora en la MAFLD.

En contraste, en los demás tratamientos, donde la actividad de las enzimas no mostró diferencias significativas en comparación con el grupo DAGF ($P < 0.05$), podría sugerir que estos tratamientos tuvieron un menor impacto en la actividad antioxidante y, por ende, en la protección hepática en comparación con el grupo tratado con hoja de frijol. Es importante destacar que esta interpretación se basa en la correlación observada, y es posible que existan otros mecanismos involucrados

que no hayan sido considerados en este análisis. Actualmente, en nuestro equipo de trabajo, se están llevando a cabo otros estudios para profundizar en la comprensión de los efectos asociados con estos tratamientos.

Cuadro 14. Marcadores de estrés oxidativo evaluados en hígado de animales alimentados con DAGF y tratados con hoja y semilla de frijol.

Tratamiento	GST (nmol/mg prot)	GPx (nmol/min x mg prot)	CAT (U/mg prot)
DE	268.21 ± 15.80 ^{ab}	17.26 ± 2.59 ^{ab}	97.78 ± 6.26 ^a
DAGF	243.30 ± 13.65 ^{bc}	14.65 ± 2.53 ^b	114.16 ± 6.03 ^a
DAGF + HF 10 %	274.14 ± 5.04 ^a	21.50 ± 2.52 ^a	108.30 ± 6.08 ^a
DAGF + SF 5 %	239.82 ± 13.32 ^c	13.11 ± 2.32 ^b	100.05 ± 4.29 ^a
DAGF + SF 15 %	252.75 ± 18.94 ^{ab}	14.33 ± 3.15 ^b	110.92 ± 5.64 ^a
SDP	262.54 ± 6.72 ^{ab}	15.49 ± 2.10 ^b	107.78 ± 14.23 ^a

Los datos se expresan como la media ± DE (n = 6). Letras distintas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (P < 0.05), mediante la prueba de Tukey. DE: dieta estándar, DAGF: dieta alta en grasa y fructosa, HF: hoja de frijol, SF: semilla de frijol, SDP: cambio de dieta.

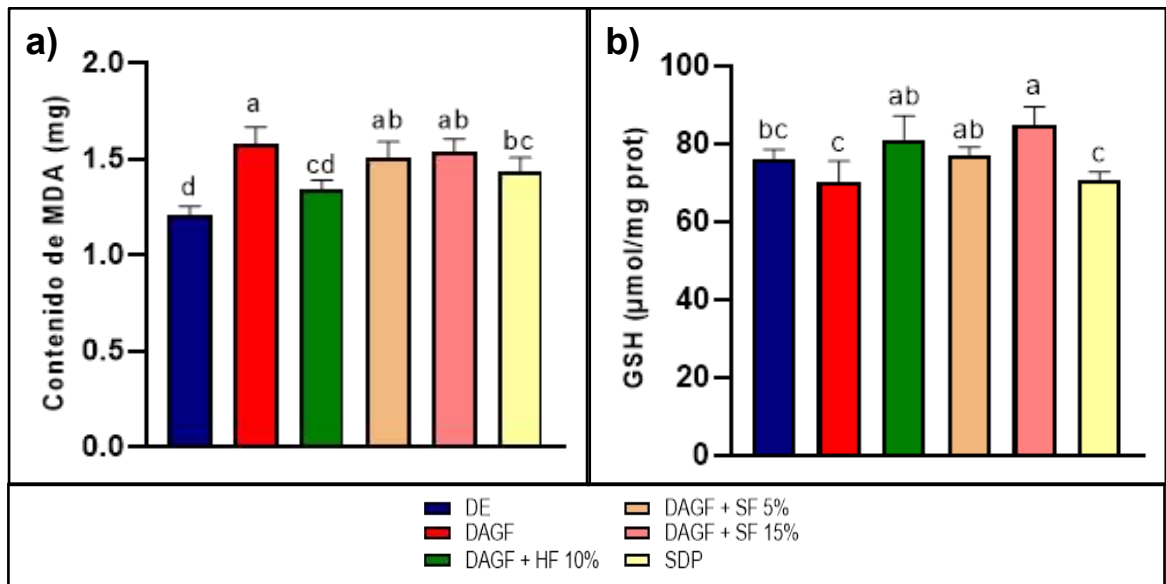


Figura 10. Efecto de la hoja y semilla cocida de frijol sobre el contenido de MDA y GSH en animales con MAFLD.

Los datos se expresan como la media \pm DE (n = 6). Letras distintas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (P < 0.05), mediante la prueba de Tukey. DE: dieta estándar, DAGF: dieta alta en grasa y fructosa, HF: hoja de frijol, SF: semilla de frijol, SDP: cambio de dieta

Por otra parte, las concentraciones de GSH aumentaron significativamente del 6 % al 17 % en los grupos tratados con hoja de frijol y semilla de frijol en ambas concentraciones (5 y 15 %) respecto a la del grupo DAGF (P < 0.05, Figura 10b). Estos resultados son relevantes ya que el GSH se considera el amortiguador redox celular más importante y el principal defensor contra el estrés oxidativo, debido a que elimina directamente las EROs y las especies reactivas de nitrógeno (ERNs) y funciona como sustrato en la actividad de las enzimas GPx y GST (Vairetti *et al.*, 2021). Estudios previos han demostrado que los compuestos con actividad antioxidante como la quercetina, la rutina y los ácidos ferúlico y cumárico pueden inducir la actividad de enzimas antioxidantes y aumentar los niveles de GSH en animales con esteatosis hepática, lo cual resulta beneficioso en la MAFLD (Hsu *et al.*, 2009; Jain & Surana, 2016; Yang *et al.*, 2019).

En cuanto a la actividad de CAT, como se puede observar en el Cuadro 14, fue estadísticamente similar en todos los grupos experimentales. Cabe destacar que, aunque no existe diferencia significativa entre grupos, podemos observar que los animales de la DAGF presentaron niveles más elevados de la actividad hepática de CAT en comparación al grupo control DE. Estudios clínicos han informado que las concentraciones o actividades de algunos marcadores de estrés oxidativo como la enzima CAT se encuentran elevados en pacientes con MAFLD, esto se explica como respuesta adaptativa al estrés oxidativo (Conde de la Rosa *et al.* , 2022). La actividad de la enzima CAT está asociada con la descomposición de hidroperóxidos, especialmente H_2O_2 , por lo que el aumento de su actividad corrobora aún más la sobreproducción de EROs que sustenta el estrés oxidativo en pacientes con MAFLD.

CONCLUSIONES

Dentro de los tratamientos evaluados en este estudio, la suplementación con la hoja de frijol demostró tener un mejor impacto sobre la esteatosis hepática. Este tratamiento se asoció con una disminución significativa en la infiltración de grasa hepática, la concentración de TG en hígado y la actividad sérica de la enzima ALT. Por el contrario, la suplementación con semilla de frijol 15 % únicamente logró reducir el contenido de TG hepáticos; mientras que, la semilla de frijol 5 % no mostró mejoras significativas en la esteatosis.

Con este estudio se pudo ratificar la asociación entre las alteraciones metabólicas (obesidad, dislipidemia e hiperglicemia) sobre la esteatosis hepática, confirmando que estos parámetros metabólicos desempeñan un papel crucial en la progresión de la enfermedad. Por lo que es esencial abordar estos trastornos metabólicos como parte integral del manejo de esta patología.

Dentro de los marcadores de estrés oxidativo evaluados en este estudio, cabe destacar que la hoja de frijol fue el único tratamiento capaz de incrementar la actividad de las enzimas GPx y GST, lo que podría sugerir que este tratamiento tuvo un mejor impacto en la actividad antioxidante y posiblemente una reducción en la peroxidación lipídica.

En general, los resultados presentados en este trabajo señalan que la ingesta de hoja de frijol 10 % no solo mejoró la esteatosis hepática inducida por la DAGF, sino que también ejerció una mayor protección contra el estrés oxidativo, ejerciendo así una defensa más efectiva contra el desarrollo de MAFLD. Sin embargo, se requieren más estudios para comprender de manera más precisa el mecanismo de acción de la hoja de frijol en relación con la MAFLD.

REFERENCIAS

- Acosta-Gallegos, J., Hernández, Y., Sánchez-García, B., Hernández, F., Hernández, M., Pérez, R., & Chavira, M. (2010). Flor de mayo Eugenia, new bean cultivar for irrigated and rainfall conditions in Central Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 1: 751-757.
- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 105: 121-126.
- Aguilar-Díaz, J. & Borges, CR. (2020). Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Journal of Visualized Experiments*. 159: 61122.
- Alam, MA., Subhan, N., & Hossain, H. (2016). Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition & Metabolism*. 1327.
- Armutcu, F., Akyol, S., Ucar, F., Erdogan, S., & Akyol, O. (2013). Markers in nonalcoholic steatohepatitis. *Advances in Clinical Chemistry*. 61: 67-125.
- Becerril-Campos, AA., Ramos-Gómez, M., De Los Ríos-Arellano, EA., Ocampo-Anguiano, PV., González-Gallardo, A., Macotela, Y., García-Gasca, T., & Ahumada-Solórzano, SM. (2023). Bean leaves ameliorate lipotoxicity in fatty liver disease. *Nutrients*. 15(13): 2928.
- Becerril-Campos, A.A., Ocampo-Anguiano, P.V., & Ahumada-Sólorzano, S.A. (2021). Efecto protector de hoja de frijol en el desarrollo de hígado graso no alcohólico. *Revista Nthe*. 01-11.
- Bechmann, L. P., Hannivoort, R. A., Gerken, G., Hotamisligil, G. S., Trauner, M., & Canbay, A. (2012). The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of Hepatology*. 56(4): 952-964.
- Bence, K. K., & Birnbaum, M. J. (2021). Metabolic drivers of non-alcoholic fatty liver disease. *Molecular Metabolism*. 50: 101-143.

- Bennink, M., & Rondini, E. (2012). Nutrition and human health benefits of dry beans and pulses. *Dry Beans and Pulses Production, Processing and Nutrition*. 335-357.
- Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J. A., & Auguet, T. (2014). Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 7: 221-239.
- Bessone, F., Razori, M. V., & Roma, M. G. (2019). Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 76(1): 99-128.
- Bourges, H., & Vargas, L. (2015). La cocina tradicional y la salud. *Revista Digital Universitaria*. 16(5): 1-11.
- Briseño-Bass, P., Chávez-Pérez, R., & López-Zendejas, M. (2019). Prevalencia y relación de esteatosis hepática con perfil lipídico y hepático en pacientes de chequeo médico. *Revista de Gastroenterología de México*. 84(3): 290-295.
- Brouwers, M. C. G. J., Cantor, R. M., Kono, N., Yoon, J. L., van der Kallen, C. J.H., Bilderbeek-Beckers, M. A. L., van Greevenbroek, M. M. J., Lusi, A. J., & de Bruin, T. W. A. (2006). Heritability and genetic loci of fatty liver in familial combined hyperlipidemia. *Journal of Lipid Research*. 47(12): 2799-2807.
- Brick, M., Kleintop, A., Echeverria, D., Kammlade, S., Brick, L., Osorno, J., McClean, P. (2022). Dry Bean: A protein-rich superfood with carbohydrate characteristics that can close the dietary fiber gap. *Frontiers in Plant Science*. 13: 914412.
- Brunt, E. M., Janney, C. G., Di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A., & Bacon B.R. (1999). Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *American Journal of Gastroenterology*. 94: 2467-2474.
- Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 65(8): 1038-1048.

- Chen, Z., Tian, R., She, Z., Cai, J., & Li, H. (2020). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 20: 116-141.
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J. A., Guzman-Maldonado, S. H., Paredes-López, O., & Loarca-Piña, G. (2009). Chemical composition and *in vitro* polysaccharide fermentation of different beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*. 74(7): 59-65.
- Campos-Vega, R., Oomah, B.D., Loarca-Piña, G., Vergara-Castañeda, H.A. (2013). Common beans and their non-digestible fraction: Cancer inhibitory activity-an overview. *Foods*. 2(3): 374-392.
- CEDRSSA (2020). Mercado del frijol, situación y prospectiva. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. México. Disponible en: <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/53Mercado%20del%20frijol.pdf>
- Chalasanani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Charlton, M., Cusi, K., Rinella, M., Harrison, S. A., Brunt, E. M., & Sanyal, A. J. (2018). The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 67(1): 328-357.
- Chávez-Mendoza, C., & Sánchez, E. (2017). Bioactive compounds from Mexican varieties of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for health. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*. 22(8):1360.
- Ciudad-Mulero, M., Matallana-González, M. C., Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., & Morales, P. (2020). Antioxidant phytochemicals in pulses and their relation to human health: A Review. *Current Pharmaceutical Design*. 26(16): 1880-1897.
- Conde de la Rosa, L., Goicoechea, L., Torres, S., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J.C. (2022). Role of oxidative stress in liver disorders. *Livers*. 2: 283-314

- Czuczejko, J., Mila-Kierzenkowska, C., Szewczyk-Golec, K. (2019). Plasma α -glutathione S-transferase evaluation in patients with acute and chronic liver injury. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 19: 5850.
- Deshpande, S., & Cheryan, M. (1987). Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *Journal of Food Science*. 52: 332-334.
- Díaz-Batalla, L., Widholm, J. M., Fahey, G. C., Castaño-Tostado, E., & Paredes-López, O. (2006). Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(6): 2045-2052.
- Díaz-Rivas, J. O., Esparza-Carrillo, C., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo, R. F., & Moreno-Jiménez, M. R. (2019). Empleo de un evaporador de película descendente agitada y su efecto sobre el perfil polifenólico de infusiones de salvilla (*Buddleja scordioides*). *Biotechnia*. 21(2): 106–113.
- Ellman, G. L. (1959). A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 74: 443-450.
- Espinosa-Alonso, L. G., Lygin, A., Widholm, J. M., Valverde, M. E., & Paredes-Lopez, O. (2006). Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(12): 4436-4444.
- Feng, Q., Niu, Z., Zhang, S., Wang, L., Dong, L., Hou, D., Zhou, S. (2023). Protective effects of white kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) against diet-induced hepatic steatosis in mice are linked to modification of gut microbiota and its metabolites. *Nutrients*. 13: 3033.
- Feregrino-Pérez, A. A., Berumen, L. C., García-Alcocer, G., Guevara-Gonzalez, R. G., Ramos-Gomez, M., Reynoso-Camacho, R., Acosta-Gallegos, J. A., & Loarca-Piña, G. (2008). Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from

- common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on azoxymethane-induced colon cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(18): 8737-8744.
- Forman, H. J., Zhang, H., Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*. 30: 1-12.
- Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M., Sanyal, A.J. (2018). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature Medicine*. 24(7): 908-922.
- Ganesan, K., & Xu, B. (2017). Polyphenol-rich dry common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their health benefits. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(11): 2331.
- García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., & Martínez, J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: Implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*. 58(9): 537-552.
- Guo, J.; Wang, P.; Cui, Y.; Hu, X.; Chen, F.; Ma, C. (2023). Alleviation effects of microbial metabolites from resveratrol on non-alcoholic fatty liver disease. *Foods*. 12: 94.
- Gutiérrez-Cuevas, J., Santos, A., Armendariz-Borunda, J. (2021). Pathophysiological molecular mechanisms of obesity: a link between MAFLD and NASH with cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 22: 11629.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249(22): 7130-7139.
- Hariri, N., & Thibault, L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews*. 23(2): 270-299.
- Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A., Bashir, S. (2014). Nutritional and health

perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54(5): 580-92.

He, J., Zhang, P., Shen, L., Niu, L., Tan, Y., Chen, L., Zhao, Y., Bai, L., Hao, X., Li, X., Zhang, S., Zhu, L. (2020). Short-chain fatty acids and their association with signalling pathways in inflammation, glucose, and lipid metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(17): 6356.

Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M.G., Vincieri, F.F., Romani. (2006). A. Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chemistry*. 99: 464-469.

Heredia-Ortega, J., Aguilera, T., Resis, M., & Bernal K. (2014). Fibra dietética total: Métodos de determinación en pastas de oleaginosas. *Facultad de Ciencias Naturales UAQ*. 91-102.

Herrera-Hernández, I.M., Armendáriz-Fernández, K.V., Muñoz-Márquez, E., Sida-Arreola J.P., Sánchez, E. Characterization of bioactive compounds, mineral content and antioxidant capacity in bean varieties grown in semi-arid conditions in Zacatecas, Mexico. (2018). *Foods*. 7(12):199.

Hong, T., Chen, Y., Li, X., Lu, Y. (2021). The role and mechanism of oxidative stress and nuclear receptors in the development of NAFLD. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 21: 68-89.

Hsu, C.L., Wu, C.H., Huang, S.L., Yen, G.C. (2009). Phenolic compounds rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat diet in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(2):425-31.

Iniestra-González, J., Gallegos-Infante, J., Rocha, N., Ibarra-Pérez, F., & González-Laredo, R. (2005). Factores antinutricios y actividad antioxidante en variedades mejoradas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia*. 6: 603-610.

Ipsen, D. H., Lykkesfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular*

Life Sciences. 75(18): 3313-3327.

Jain, P.G. & Surana, S.J. (2016). Isolation, characterization and hypolipidemic activity of ferulic acid in high-fat-diet-induced hyperlipidemia in laboratory rats. *EXCLI Journal*. 15:599-613.

Kaya, E. & Yilmaz Y. (2022). Metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD): A multi-systemic disease beyond the liver. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 10(2): 329-338

Khandelwal, R., Dassanayake, A.S., Conjeevaram, H.S., Singh, S.P. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease in diabetes: When to refer to the hepatologist. *World Journal of Diabetes*. 12(9):1479-1493.

Kim, S., Hong, J., Jeon, R., Kim, H. (2016). Adzuki bean ameliorates hepatic lipogenesis and proinflammatory mediator expression in mice fed a high-cholesterol and high-fat diet to induce nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrition Research*. 36(1): 90-100.

Lau, JK., Zhang, X., Yu, J. (2017). Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *Journal of Pathology*. 241(1): 36-44.

Leslie, T., Pawloski, L., Kallman-Price, J., Escheik, C., Hossain, N., Fang, Y., Gerber, L. H., & Younossi, Z. M. (2014). Survey of health status, nutrition, and geography of food selection of chronic liver disease patients. *Annals of Hepatology*. 13(5): 533-540.

Li, S., Liu, F., Wu, M., Li, Y., Song, X., Yin, J. (2023). Effects of drying treatments on nutritional compositions, volatile Flavor compounds, and bioactive substances of broad beans. *Foods*. 12: 2160.

Li, B., Mao, Q., Xiong, R., Zhou, D., Huang, S., Saimaiti, A., Shang, A., Luo, M., Li, H., Li, H., (2022). Preventive effects of different black and dark teas on obesity and non-alcoholic fatty liver disease and modulate gut microbiota in high-fat diet fed mice. *Foods*. 11: 3457.

- Li, M.; Zhang, Z.; Yu, B.; Jia, S.; Cui, B. (2023). Lycium barbarum oligosaccharides alleviate hepatic steatosis by modulating gut microbiota in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Foods*. 12(8):1617.
- Li, S., Tan, H.-Y., Wang, N., Zhang, Z.-J., Lao, L., Wong, C.-W., & Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(11): 26087-26124.
- Liu, Q., Zhao, G., Li, Q., Wu, W., Yan, Z. & Bian, H. (2022). A comparison of NAFLD and MAFLD diagnostic criteria in contemporary urban healthy adults in China: a cross-sectional study. *Gastroenterology*. 22:471.
- Linares, E. & Bye, R. 2017. Especies autóctonas casi olvidadas. *La Jornada del campo*. 122: 2-25.
- Lomas-Soria, C., Pérez-Ramírez, IF., Caballero-Pérez, J., Guevara-Gonzalez, RG., Guevara-Olvera, L., Loarca-Piña, G., Guzman-Maldonado, HS., Reynoso-Camacho, R. (2015). Cooked common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) modulate renal genes in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 26(7):761-8.
- Loomba, R., Rao, F., Zhang, L., Khandrika, S., Ziegler, M. G., Brenner, D. A., & O'Connor, D. T. (2010). Genetic covariance between gamma-glutamyl transpeptidase and fatty liver risk factors: Role of beta2-adrenergic receptor genetic variation in twins. *Gastroenterology*. 139(3): 836-845.
- López, A., El-Naggar, T., Duenas, M., Ortega, T., Estrella, I., Hernández, T., Estrella, I., Hernández, T., Gómez-Serranillos, M.P., Palomino, O.M., Carretero, M.E. (2013). Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*. 138(1): 547–555.
- Lutsiv, T., McGinley, J.N., Neil, E.S., Foster, M.T., Thompson, J. (2023). Thwarting metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) with common bean:

dose- and sex-dependent protection against hepatic steatosis. *Nutrients*. 15(3): 526.

Martínez-Zavala, M., Mora-Avilés, M. A., Anaya-Loyola, M. A., Guzmán-Maldonado, H., Aguilera-Barreyro, A., Blanco-Labra, A., & García-Gasca, T. (2016). Common bean leaves as a source of dietary iron: Functional test in an iron-deficient rat model. *Plant Foods for Human Nutrition*. 71(3): 259-264.

Mashek DG. (2021). Hepatic lipid droplets: A balancing act between energy storage and metabolic dysfunction in NAFLD. *Molecular Metabolism*. 50: 101-115.

Masarone, M., Rosato, V., Dallio, M., Gravina, A.G., Aglitti, A., Loguercio, C., Federico, A., Persico, M. (2018). Role of oxidative stress in pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018:9547613.

Mazzaccara, C., Labruna, G., Cito, G., Scarfo, M., De Felice, M. (2008). Age related reference intervals of the main biochemical and hematological parameters in C57BL/6J, 129SV/EV and C3H/HeJ Mouse Strains. *Plos One*. 3: e3772.

McCarthy, E. M., & Rinella, M. E. (2012). The role of diet and nutrient composition in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 112(3): 401-409.

Melo, TS., Lima, P., Carvalho, K., Fontenele, TM., Solon, FR., & Tome A. (2017). Ferulic acid lowers body weight and visceral fat accumulation via modulation of enzymatic, hormonal and inflammatory changes in a mouse model of high-fat diet-induced obesity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 50:5630.

Mendoza-Sánchez, M., Guevara-González, RG., Castaño-Tostado, E., Mercado-Silva, EM., Acosta-Gallegos, JA., Rocha-Guzmán, NE., Reynoso-Camacho, R. (2016). Effect of chemical stress on germination of cv Dalia bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as an alternative to increase antioxidant and nutraceutical compounds in sprouts. *Food Chemistry*. 1: 212-218.

- Muhammad, A. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease, an overview. *Integrative Medicine: A Clinician's Journal*. 18(2): 42-49.
- Muñoz-Alvarado, L. (2021). Efecto del consumo del fruto del higo (*Ficus carica*) y de sus extractos sobre el estrés oxidativo asociado a la esteatosis hepática no alcohólica en un modelo *in vivo*. *Tesis de maestría*. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro. Disponible en <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/2789>.
- Mitchell, D. C., Webster, A., & Garrison, B. (2022). Terminology matters: Advancing science to define an optimal pulse Intake. *Nutrients*. 14(3): 655.
- Nadal-Casellas, A., Amengual-Cladera, E., Proenza, AM., Lladó, I., Gianotti, M. (2010). Long-term high-fat-diet feeding impairs mitochondrial biogenesis in liver of male and female rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 26(3):291-302.
- Nassir, F., Rector, R. S., Hammoud, G. M., & Ibdah, J. A. (2015). Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis. *Gastroenterology & Hepatology*. 11(3): 167-175.
- Neuschwander-Tetri, B. A. (2010). Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. 52(2): 774-788.
- Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'h, J., Siliart, B., & Dumon, H. (2008). Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 92(3): 272-283.
- Norris, A.W., Chen, L., Fisher, S.J., Szanto, I., Ristow, M., Jozsi, A.C., Hirshman, M.F., Rosen, E.D., Goodyear, L.J., Gonzalez, F.J. (2003). Muscle-specific PPAR γ -deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 112(4): 608–618.
- Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2012, Servicios básicos de salud, promoción y educación para la salud en materia alimentaria. México, 28 de mayo

de 2012.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México, 6 de diciembre de 1999.

Norma Oficial Mexicana NOM-087- ECOL-SSA1-2002, protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológico – infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo. México, 1 de diciembre de 2001.

Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. México, 10 de octubre de 2008.

Ocampo-Anguiano, P. V. (2020). Análisis de la composición y efecto del consumo de hoja de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en ratas Wistar con obesidad y/o diabetes mellitus. *Tesis de maestría*. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro. Disponible en: <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/2618>.

Oosterveer, MH., van Dijk, TH., Tietge, UJ., Boer, T., Havinga, R., Stellaard, F., Groen, AK., Kuipers, F., Reijngoud, DJ. (2009). High fat feeding induces hepatic fatty acid elongation in mice. *Plos One*. 4: 60-66

Otto, GP., Rathkolb, B., Oestereicher, M., Lengger, C., Moerth, C., Micklich, K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wolf, E. (2016). Clinical chemistry reference intervals for C57BL/6J, C57BL/6N, and C3HeB/FeJ mice (mus musculus). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 55(4):375-386.

Ovando-Martínez, M., Osorio-Díaz, P., Whitney, K., Bello-Pérez, L.A., Simsek, S. (2011). Effect of the cooking on physicochemical and starch digestibility properties of two varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under different water regimes. *Food Chemistry*. 129:358–365.

Paredes-López, O., Guevara-Lara, F., & Bello-Pérez, L. (2013). Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. *Fondo de Cultura Económica*, Ciudad de México, México.

Pérez-Ramírez, I., Herrera, M., Mora, F., Ramos-Gómez, M., Martínez- Alarcón, D., Reynoso-Camacho R. (2023). Effect of different pigmented cooked common beans on glucose and lipid metabolism in obese rats and 3T3 L1 cells metabolism in obese rats and 3T3 L1 cells. *Food Bioscience*. 53: 102510.

Pipitone R., Ciccioli C., Infantino G., La Mantia C., Parisi S., Tulone A., Pennisi G., Grimaudo S., Petta S. (2023). MAFLD: A multisystem disease. *Therapeutic advances in Endocrinology and Metabolism*. 28: 14-20.

Plagia, D., & Valentine W. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 70(1), 158-169.

Qayyum, A., Nystrom, M., Noworolski, S. M., Chu, P., Mohanty, A., & Merriman, R. (2012). MRI steatosis grading: Development and initial validation of a color mapping system. *AJR. American Journal of Roentgenology*. 198(3): 582-588.

Ramírez-Jiménez, AK., Reynoso-Camacho, R., Mendoza-Díaz, S., Loarca-Piña, G. Functional and technological potential of dehydrated *Phaseolus vulgaris* L. flours. (2014). *Food chemistry*. 15:161:254-6.

Ramírez-Venegas, G., De Ita-Pérez, DL., Díaz-Muñoz, M., Méndez, I., García-Gasca, T., Ahumada-Solórzano, M., Zambrano-Estrada, X., Vázquez-Martínez, O., Guzmán-Maldonado, H., & Luna-Moreno, D. (2021). Supplementation with *Phaseolus vulgaris* leaves improves metabolic alterations induced by high-fat/fructose diet in rats under time-restricted feeding. *Plant Foods for Human Nutrition*. 76(3): 297-303.

Reyes-Martínez, A., Almaraz, N., Gallardo-Velazquez, T., Torres-Morán, E., González-Elizondo, M. 2014. Evaluation of foliar phenols of 25 Mexican varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as antioxidants and varietal markers. *Natural Product Research*. 28(23): 1-5.

Rodríguez, L., Mendez, D., Montecino, H., Carrasco, B., Arevalo, B., Palomo, I.,

Fuentes, E. (2022). Role of *Phaseolus vulgaris* L. in the prevention of cardiovascular diseases-cardioprotective potential of bioactive compounds. *Plants*. 2:186.

Sánchez-Arteaga, H., Urías-Silvas, J., Espinosa-Andrews, H. & García-Márquez, E. (2015). Effect of chemical composition and thermal properties on the cooking quality of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *CyTA - Journal of Food*. 13(3): 385-391.

SAGARPA (2020). Planeación agrícola nacional 2017-2030. Frijol mexicano. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. México. Disponible en: <https://docplayer.es/83182578-Planeacion-agricola-nacional-frijol.html>

Sánchez-Arteaga, H.M., Urías-Silvas, J.E., Espinosa-Andrews, H. García-Márquez, E. Effect of chemical composition and thermal properties on the cooking quality of common beans (*Phaseolus Vulgaris*). (2015). *CyTA- Journal Of Food*. 13(3): 385-391

Sánchez-Valle, V., Chávez-Tapia, N. C., Uribe, M., & Méndez-Sánchez, N. (2012). Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: A review. *Current Medicinal Chemistry*. 19(28): 4850-4860.

Santiago-Ramos, D., Figueroa-Cárdenas, JD., Véles-Medina, JJ., Salazar, R. (2018). Physicochemical properties of nixtamalized black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *Food chemistry*. 1: 456-46.

Seebacher, F., Zeigerer, A., Kory, N., & Krahmer, N. (2020). Hepatic lipid droplet homeostasis and fatty liver disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 108: 72-81.

Sattar, N., Forrest, E., Preiss, D. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ journal*. 29: 349.

Shao, M., Ye, Z., Qin, Y., Wu, T. (2020). Abnormal metabolic processes involved in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (Review). *Experimental and*

Therapeutic Medicine. 5: 26.

Sherif, Z. A., Saeed, A., Ghavimi, S., Nouraie, S.-M., Laiyemo, A. O., Brim, H., & Ashktorab, H. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and perspectives on US minority populations. *Digestive Diseases and Sciences*. 61(5): 1214-1225.

Shi, Z., Zhang, X., Zhu, Y., Yao, Y., Ren, G. (2021). Natural extracts from white Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Inhibit 3T3-L1 adipocytes differentiation. *Applied Sciences*. 11:167.

Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2017). Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*. 101: 1-16.

Singleton, V., & Rosi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 58-144.

Song, L., Qu, D., Zhang, Q. (2017). Phytosterol esters attenuate hepatic steatosis in rats with non-alcoholic fatty liver disease rats fed a high-fat diet. *Scientific Reports*. 7: 41604.

Suárez-Martínez, S. E., Ferriz-Martínez, R. A., Campos-Vega, R., Elton-Puente, J. E., de la Torre Carbot, K., & García-Gasca, T. (2016). Bean seeds: Leading nutraceutical source for human health. *CyTA - Journal of Food*. 14(1): 131-137.

Tanase, D.M., Gosav, E.M., Costea, C.F., Ciocoiu, M., Lacatusu, C.M., Maranduca, M.A., Ouatu, A., Floria, M. (2020). The intricate relationship between type 2 diabetes mellitus (T2DM), insulin resistance (IR), and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Journal of Diabetes*. 2020:3920196.

Tan, Y., Tam, C.C., Meng, S., Zhang, Y., Alves, P., Yokoyama, W. (2021). Cooked black turtle beans ameliorate insulin resistance and restore gut microbiota in C57BL/6J mice on high-fat diets. *Foods*. 10: 1691.

- Telles, A.C., Kupski, L., & Furlong, E.B. (2017). Phenolic compound in beans as protection against mycotoxins. *Food Chemistry*. 214: 293–299.
- Thompson, H. J., McGinley, J. N., Neil, E. S., & Brick, M. A. (2017). Beneficial effects of common bean on adiposity and lipid metabolism. *Nutrients*. 9(9): 1-12.
- Thompson, H. J., Lutsiv, T., McGinley, N., Fitzgerald, K., Neil, E. (2023). Consumption of Common bean suppresses the obesogenic increase in adipose depot mass: impact of dose and biological sex. *Nutrients*. 15(9): 2015.
- Treviño-Mejía, D., Luna-Vital, A., Gaytán-Martínez, M., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2016). Fortification of commercial nixtamalized maize (*Zea mays* L.) with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) increased the nutritional and nutraceutical content of tortillas without modifying sensory properties. *Journal of Food Quality*. 39(6): 569–579
- Ulloa, J.A., Ulloa-Rosas, P., Ramírez-Ramírez, J., Ulloa-Rangel, B. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente*. 3: 5-9.
- Vairetti, M.; Di Pasqua, L.G.; Cagna, M.; Richelmi, P.; Ferrigno, A.; Berardo, C. (2021). Changes in glutathione content in liver diseases: an update. *Antioxidants*. 10(3):364.
- Van Herck, M.A., Vonghia, L., Francque, S.M. (2017). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease- a starter's guide. *Nutrients*. 9(10):1072.
- Vergara-Castañeda, H.A., Guevara-González, R.G., Ramos-Gómez, M., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Maldonado, H., Feregrino-Pérez, A.A., Oomah, B.D., Loarca-Piña, G., (2010). Non-digestible fraction of cooked bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Bayo Madero suppresses colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-induced rats. *Food & Function journal*. 1: 294-300
- Wang, C., Cui, Y., Li, C., Zhang, Y., Xu, S., Li, X., Li, H., & Zhang, X. (2013). Nrf2 deletion causes “benign” simple steatosis to develop into nonalcoholic

steatohepatitis in mice fed a high-fat diet. *Lipids in Health and Disease*. 12: 2-8.

Wong, W.-K., & Chan, W.-K. (2021). Nonalcoholic fatty liver disease: A global perspective. *Clinical Therapeutics*. 43(3): 473-499.

Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018b). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*. 10(11): 1618.

Yang, H., Yang, T., Heng, C., Zhou, Y., Jiang, Z., Qian, X., Du, L., Mao, S., Yin, X., Lu, Q. (2019). Quercetin improves nonalcoholic fatty liver by ameliorating inflammation, oxidative stress, and lipid metabolism in db/db mice. *Phytotherapy Research*. 33(12): 3140-3152.

Yang, Q.Q., Gan, R.Y., Ge, Y.Y., Zhang, D., Corke, H. (2018). Polyphenols in Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.): Chemistry, analysis, and factors affecting composition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 17: 1518-1539.

Yen, GC., Cheng, HL., Lin, L., Chen, S., Hsu, C. (2020). The potential role of phenolic compounds on modulating gut microbiota in obesity. *Journal of Food and Drug Analysis*. 28(2):195-205.

Yi, H., Peng, H., Wu, X., Xu, X., Kuang, T., Zhang, J., Du, L., Fan, G. (2021). The therapeutic effects and mechanisms of quercetin on metabolic diseases: pharmacological data and clinical evidence. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021: 6678662.

Yoon, D.S., Cho, S.Y., Yoon, H.J., Kim, S.R., Jung, U.J. (2021). Protective effects of *p*-coumaric acid against high-fat diet-induced metabolic dysregulation in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 142:111969.

Younossi, Z., Tacke, F., Arrese, M., Chander Sharma, B., Mostafa, I., Bugianesi, E., Wai-Sun Wong, V., Yilmaz, Y., George, J., Fan, J., & Vos, M. B. (2019). Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 69(6): 2672-2682.

Yu, S., Li, C., Ji, G., Zhang, L. (2021). The contribution of dietary fructose to non-alcoholic fatty liver disease. *Frontiers Pharmacology*. 12: 783393.

Zhao, Q., Hou, D., Fu, Y., Xue, Y., Guan, X., Shen, Q. (2021). Adzuki bean alleviates obesity and insulin resistance induced by a high-fat-diet and modulates gut microbiota in Mice. *Nutrients*. 13(9): 3240.

ANEXOS

Anexo 1. Solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7 (Preparar únicamente el volumen a ocupar en las determinaciones y repeticiones)

- Pesar 1.362 g de NaH_2PO_4 .
- Pesar 2.67 g de Na_2HPO_4 .
- Aforar a 500 mL de H_2O destilada.

Nota: medir pH al 80% de la solución y después aforar.

Anexo 2. Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6.5 (Preparar únicamente el volumen a ocupar en las determinaciones y repeticiones)

- Pesar 4.725 g de NaH_2PO_4 .
- Pesar 2.237 g de Na_2HPO_4 .
- Aforar a 500 mL de H_2O destilada.

Nota: medir pH al 80% de la solución y después aforar.

Anexo 3. Solución de trabajo para determinación de proteína (Preparar únicamente el volumen a ocupar)

- Se miden 10 mL de reactivo A.
- Se agregan 200 μL de reactivo B.

Anexo 4. Solución amortiguadora Tris-EDTA pH 8.2 (Preparar únicamente el volumen a ocupar)

- Pesar 0.744 g de EDTA y aforar a 100 mL (concentración 0.02 M).
- Pesar 3.152 g de TRIS y aforar a 100 mL (concentración 0.2 M).
- Se mezclan con una proporción 1:1

Nota: Medir pH al 80% de la solución y aforar.

Anexo 5. Solución de trabajo inicial GSH (Preparar únicamente el volumen a ocupar)

- Pesar 0.00184 g de GSH.

- Disolver en 10 mL de metanol.

Nota: Se debe almacenar en refrigeración.

Anexo 6. Solución de DTNB 2.46 mM (Preparar únicamente el volumen a ocupar)

- Pesar 0.0243 g de DTNB.
- Disolver en 25 mL de metanol.

Nota: Se debe almacenar en refrigeración.

Anexo 7. Solución de ácido tricloro acético (TCA) al 20 %

Pesar 1.1051 g de TCA

Disolver en 5 mL de agua destilada.

Anexo 8. Solución de trabajo GSH 3 mM

- Preparar una solución “stock” de 150 mM: pesar 0.0461 g de GSH y disolver en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.1 M (Anexo 10).
- Para preparar la solución de trabajo se mezclan 140 μ L de solución “stock” y se añaden 6.86 mL de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.1 M (Anexo 13).

Nota: La solución stock es estable por máximo 4 días; la solución de trabajo es estable por 24 h.

Anexo 9. Solución de trabajo CDNB 2 mM

- Preparar una solución “stock” de 60 mM: pesar 0.0244 g de CDNB y disolver en 2 mL de metanol absoluto.
- Para preparar la solución de trabajo se mezclan 300 μ L de solución “stock” y se añaden 8.7 mL de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.1 M (Anexo 10).

Nota: La solución “stock” es estable por máximo 4 días; la solución de trabajo es estable por 24 h.

Anexo 10. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 30 mM.

- Tomar 340 µL de H₂O₂ al 30% en 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.
- Leer la absorbancia a 240 nm en el espectrofotómetro y verificar la concentración con la siguiente fórmula: [H₂O₂] mM= A₂₄₀/0.0436

Anexo 11. Solución amortiguadora de reacción Tris-EDTA pH 8.

- Se pesan 0.788 g de Tris-HCl (concentración 50 mM).
- Se pesan 0.0186 g de EDTA (concentración 0.5 mM).
- Se afora a 100 mL.

Nota: Se mide el pH al 80% y después se afora.

Anexo 12. Cocktail GSH/GR (25.2 mM GSH, 6 unidades de GR/mL)

- Pesar 0.0774 g de GSH y disolver en 10mL de solución amortiguadora de reacción (Anexo 18).
- Tomar 66 µL de glutatión reductasa (GR).
- Aforar a 1 mL con solución amortiguadora de reacción.

Nota: El cocktail se guardó por separado, agregando 25µL de cada solución al pozo.

Anexo 13. Solución NADPH 1.5 mM

- Se pesan 0.0062 g de NADPH en 5 mL de solución amortiguadora de reacción.

Nota: La solución debe de utilizarse inmediatamente después de que se prepara y no debe congelarse para su reuso.

Anexo 14. Hidroperóxido de cumeno 3 mM.

- Se toman 5.55 µL de hidroperóxido de cumeno al 80% y se afora a 10 mL con H₂O destilada.