

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA**



**Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Tesis**

**“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*”**

**PRESENTA**

**L.N. Laura Muñoz Alvarado**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. Minerva Ramos Gómez**

**Febrero 2021**



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

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”

Opción de titulación

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

LN Laura Muñoz Alvarado

Dirigido por:

Dra. Minerva Ramos Gómez

Dra. Minerva Ramos Gómez

Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez

Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado

Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillán

Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Febrero, 2021

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico recibido durante los dos años cursados de la maestría.

A Carmelita, que siempre me mostró su gran apoyo, paciencia y compromiso para realizar los trámites necesarios, así como por sus consejos y palabras de aliento.

A Richie, porque sin él no hubiera sido posible avanzar con mi proyecto entre más de 100 ratitas y los análisis en el laboratorio, por sacrificar sus fiestas decembrinas y porque además me ayudó con el trabajo sucio de entregar al sacrificio a estos animalitos, a quienes también agradezco haber dado su vida en pos de la ciencia.

A mis compañeras del grupo de nutraceuticos: Sam, Martita, Naye, Jos, Anita y Yunnuen; porque gracias a ellas mi vida en las aulas fue divertida y amena. A Josué y Maggie, mis compañeros de laboratorio, que fueron testigos de mis largas horas de trabajo y desesperación y siempre estuvieron dispuestos a orientarme y ayudarme.

A todos los “Los Rosalíos”, por adoptarme en su laboratorio y por todo su apoyo.

A la Doctora Mine, que amablemente compartió su conocimiento conmigo, me dedicó mucho de su tiempo para la culminación de este proyecto y porque, más allá de lo académico, me dejó ver el gran ser humano que es.

A los miembros de mi comité, en especial a la Dra. Rosalía y al Dr. Castaño, que me apoyaron en lo necesario durante mi proyecto.

## DEDICATORIAS

A Dios, por haberme permitido cumplir mi sueño de estudiar una maestría.

A Mau, mi esposo, por aquel aniversario en que mientras me cantaba con su guitarra por la madrugada yo preparaba una exposición, así como por tantos momentos en que fue víctima de mi estrés y desatención y aun así me apoyó para llegar a este momento, este logro es nuestro. A mi hijo, Emmanuel, que tuvo que aprender a quedarse solo durante mis largas jornadas, pero también aprendió a medir soluciones, limpiar jaulas de ratas y anotar datos en mi bitácora, gracias mi pequeño gran científico.

A mis padres, que siempre creyeron en mí y me apoyaron a la distancia. A mis hermanas, que fueron mi pañuelo de lágrimas y me dieron siempre una palabra de aliento en el momento adecuado.

A mi ángel de la guarda, porque estoy segura que desde donde se encuentra sigue intercediendo por mí y fue parte de que las cosas se dieran para poder culminar esta meta.

Gracias a mi familia, amigos, compañeros y maestros que me ayudaron para que este sueño fuera posible.

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	- 1 -
1. INTRODUCCIÓN .....	- 1 -
2. ANTECEDENTES.....	- 3 -
2.1 Obesidad y sobrepeso.....	- 3 -
Definición .....	- 3 -
Epidemiología .....	- 3 -
Asociación de obesidad y sobrepeso con la esteatosis hepática.....	- 4 -
2.2 Esteatosis hepática no alcohólica.....	- 5 -
Definición y clasificación .....	- 5 -
Diagnóstico .....	- 6 -
Epidemiología .....	- 6 -
Etiopatogenia.....	- 8 -
Manejo terapéutico.....	- 12 -
2.3 Ficus carica .....	- 16 -
Taxonomía .....	- 16 -
Usos tradicionales de <i>Ficus carica</i> .....	- 16 -
Composición nutrimental y fitoquímica del fruto del higo. ....	- 17 -
Propiedades nutraceuticas del fruto del higo .....	- 19 -
3. JUSTIFICACIÓN .....	- 24 -
4. OBJETIVOS.....	- 25 -
4.1 Objetivo general .....	- 25 -
4.2 Objetivos específicos.....	- 25 -

5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 26 -
5.1 Materiales.....	- 26 -
Material vegetal.....	- 26 -
Material biológico .....	- 26 -
5.2 Métodos.....	- 26 -
5.2.1 Preparación de los extractos de higo .....	- 27 -
5.2.2 Identificación y cuantificación de compuestos bioactivos .....	- 28 -
5.2.3 Cuantificación de azúcares reductores por el método DNS.....	- 33 -
5.2.4 Evaluación del efecto del higo y sus extractos en la esteatosis hepática .....	- 34 -
5.2.5 Cálculo de consumo de azúcares simples y de compuestos polifenólicos en los animales de experimentación. ....	- 37 -
5.2.6 Cuantificación de triglicéridos en heces .....	- 38 -
5.2.7 Evaluación microscópica del grado de hipertrofia en adipocitos .....	- 38 -
5.2.8 Medición de parámetros bioquímicos en suero.....	- 39 -
5.2.9 Cuantificación de glucógeno en hígado .....	- 40 -
5.2.10 Cuantificación de triglicéridos en hígado.....	- 41 -
5.2.11 Análisis histológico del tejido hepático .....	- 41 -
5.2.12 Determinaciones antioxidantes en hígado .....	- 41 -
5.3 Análisis estadístico .....	- 45 -
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	- 47 -
6.1 Caracterización del fruto del higo y de sus extractos .....	- 47 -
6.2 Evaluación del efecto del fruto de Ficus carica y sus extractos sobre la esteatosis hepática en un modelo in vivo de obesidad .....	- 53 -
6.2.1 Efectos del consumo de higo y sus extractos sobre el peso corporal de los animales de experimentación.....	- 54 -

6.2.2 Efecto del consumo del higo y sus extractos sobre el peso de hígado y tejido adiposo de los animales de experimentación .....	- 56 -
6.2.3 Efecto del consumo del higo y sus extractos sobre la histología de tejido adiposo visceral de los animales de experimentación.....	- 59 -
6.2.4 Efecto del consumo del higo y sus extractos sobre la histología hepática de los animales de experimentación .....	- 60 -
6.2.5 Efectos del consumo de higo y sus extractos sobre enzimas de función hepática en los animales de experimentación .....	- 63 -
6.2.6 Efectos del consumo de higo y sus extractos sobre el contenido de triglicéridos hepáticos de los animales de experimentación.....	- 64 -
6.2.7. Efecto del higo y sus extractos sobre el contenido de triglicéridos en heces de los animales de experimentación .....	- 65 -
6.2.8 Efectos del consumo de higo y sus extractos sobre parámetros bioquímicos en suero en los animales de experimentación .....	- 67 -
6.2.6 Efecto del higo y sus extractos sobre sobre el contenido de glucógeno hepático en los animales de experimentación .....	- 71 -
6.2.8 Efecto del higo y sus extractos sobre la actividad antioxidante en hígado de los animales de experimentación .....	- 72 -
6.3 Correlaciones entre la capacidad antioxidante del higo y sus extractos y los parámetros bioquímicos en ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa .....	- 75 -
7. CONCLUSIONES .....	- 79 -
8. REFERENCIAS.....	- 81 -
9. ANEXOS .....	- 94 -

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Evaluación diagnóstica de la NAFLD	7
2	Tratamiento farmacológico y no farmacológico de la NAFLD	15
3	Compuestos fitoquímicos presentes en diferentes partes de <i>Ficus carica</i>	18
4	Valor nutrimental de higo deshidratado y fresco	19
5	Polifenoles totales, flavonoides, antocianinas y capacidad antioxidante (TEAC) del higo. Valores de 100 g de fruto, piel y pulpa	21
6	Principales antecedentes relacionados con los beneficios de los fitoquímicos presentes en el higo sobre protección hepática y regulación del sistema antioxidante	23
7	Gradiente de elución para polifenoles.	31
8	Gradiente de elución para carotenoides	32
9	Gradiente de elución para tocoferoles	33
10	Contenido nutrimental de las dietas administradas a los animales de experimentación	34
11	Grupos de estudio <i>in vivo</i> para la evaluación del efecto de <i>Ficus carica</i> y sus extractos en esteatosis hepática	35
12	Caracterización proximal del higo deshidratado	48
13	Rendimiento de extractos de higo	48
14	Contenido de azúcares reductores en higo deshidratado y sus extractos	49
15	Cuantificación de compuestos fitoquímicos totales de higo deshidratado y sus extractos	51
16	Caracterización del extracto de etanol por UPLC-MS-TQ-S	52
17	Caracterización del extracto de hexano por UPLC-MS-TQ-S	53
18	Consumo de energía, azúcares simples y compuestos polifenólicos de los animales de experimentación	56
19	Grado de esteatosis hepática por grupo de experimentación analizado	61

20	Efecto del consumo de higo y sus extractos en animales de experimentación sobre colesterol total, colesterol HDL, TG y glucosa	69
21	Actividad de enzimas antioxidantes CAT Y GST y del cofactor GSH en hígado de los animales de experimentación	73
22	Variables con efecto significativo sobre actividad antioxidante en el modelo animal de experimentación, medidas por los métodos PLS y LMS	75
23	Coeficientes de los modelos de PLS y LMS para la evaluación de la actividad antioxidante en hígado del modelo animal de experimentación	76

Dirección General de Bibliotecas de la UJAO

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución patológica de la NAFLD	5
Figura 2. Patogénesis de la esteatosis hepática no alcohólica	10
Figura 3. Modelo animal de experimentación	36
Figura 4. Peso corporal de animales alimentados con dieta alta en grasa y fructosa (DAGF) y dieta estándar (DE)	54
Figura 5. Peso corporal de peso de animales alimentados con DAGF II y tratados con higo y extractos de etanol y hexano base de higo en diferentes concentraciones	55
Figura 6. Peso de hígado (total y relativo) de los animales de experimentación	57
Figura 7. Peso de tejido adiposo visceral, suprarrenal, epididimal y total de los animales de experimentación	58
Figura 8. Índice de adiposidad de los animales de experimentación	59
Figura 9. Hipertrofia de tejido adiposo expresado como peso del tejido(g)/área de célula ( $\mu\text{m}^2$ ) de los animales de experimentación	60
Figura 10. Imágenes representativas de tejido hepático de los diferentes grupos de experimentación	62
Figura 11. Hallazgos histológicos hepáticos de los animales de experimentación del grupo higo 70%	62
Figura 12. Enzimas de función hepática de los animales de experimentación	63
Figura 13. Contenido hepático de TG de los animales de experimentación	65
Figura 14. Contenido de triglicéridos en heces de los animales de experimentación	66
Figura 15. Insulina en suero de animales de experimentación tratados con higo y sus extractos	70
Figura 16. Contenido de glucógeno hepático de los animales de experimentación	71

## RESUMEN

La esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD), una complicación de la obesidad, se caracteriza por acumulación anormal de lípidos. El estrés oxidativo (EO) causa daño hepatocelular en la NAFLD que desencadena su progresión debido a la peroxidación lipídica y a un decremento de los sistemas antioxidantes, la cual se puede prevenir a través de la terapia antioxidante. El higo se ha usado como tratamiento de enfermedades hepáticas debido a su contenido de fitoquímicos con actividad antioxidante; sin embargo, no existe evidencia científica que demuestre su efecto protector contra NAFLD. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del consumo del fruto del higo y sus extractos sobre la regulación del EO asociado a NAFLD en un modelo *in vivo*. En base al rendimiento, se obtuvo un extracto de etanol (EE) y uno de hexano (Hexano) por maceración fraccionada a partir del higo. Posteriormente, el higo y los extractos EE y Hexano se caracterizaron por métodos colorimétricos y, parcialmente, por UPLC MS-QTOF. EE contiene fitoquímicos polares, principalmente fenoles, y Hexano contiene fitoquímicos no polares, principalmente fitoesteroles. Tras alimentar a ratas Wistar durante 13 semanas con dieta alta en grasa y fructosa (DAGF), se administraron los extractos EE y Hexano vía intragástrica (400 y 800 mg/kg peso), y el fruto seco molido (21 y 70%), más DAGF, por 8 semanas. Los animales alimentados con higo al 70% fueron los más afectados, con un perfil lipídico desfavorable, mayor acumulación de triglicéridos hepáticos y actividad antioxidante hepática disminuida. Los animales tratados con EE800 mg/kg consumieron más compuestos polifenólicos, acumularon menos triglicéridos hepáticos, elevaron su respuesta hepática antioxidante, disminuyeron niveles de transaminasas, y mejoraron su perfil lipídico. En conclusión, los extractos mostraron mejores resultados respecto al consumo de higo. Los análisis multivariados no resultaron predictivos entre parámetros bioquímicos y respuesta antioxidante en el modelo animal.

**PALABRAS CLAVES:** NAFLD, higo, obesidad, estrés oxidativo.

## SUMMARY

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is an obesity complication, characterized by an abnormal lipids accumulation. OS is one of the main mechanisms of hepatocellular damage in NAFLD that causes its progression due to lipid peroxidation and a decrease in antioxidant systems. Antioxidant therapy can prevent such progression. The fig fruit has been used as a treatment for liver diseases due to its content of phytochemicals with antioxidant activity, however, there is no scientific evidence regarding its protective effect against NAFLD. The aim of this study was to evaluate the effect of fig fruit consumption (*Ficus carica*) and its extracts on the oxidative stress regulation associated with NAFLD in an *in vivo* model. Based on its yield, we obtained an ethanol extract (EE) and a hexane extract (hexane) by fractional maceration from the fig fruit. The fig and its extracts were characterized by colorimetric methods and, partially, by UPLC MS-QTOF. EE contains polar phytochemicals, mainly phenols, and hexane contains non-polar phytochemicals, mainly phytosterols. Wistar male rats were fed with high fructose high fat diet (HFHF) for 13 weeks, subsequently, the extracts EE and Hexane (400 and 800 mg per kg of body weight) were given orally by gavage and also the ground dry fruit (21 and 70%), plus HFHF diet, for eight weeks more. Rats fed with fig (70%) were the most affected, they had a bad lipid profile, more intrahepatic triglycerides, and low hepatic antioxidant activity. Rats treated with EE800 mg/kg consumed more polyphenolic compounds, had less hepatic triglycerides and higher antioxidant response. As conclusion, the extract consumption showed better results than fig. According to the multivariate analyses some biochemical parameters and the antioxidant response in this animal model are significative but not predictive.

KEY WORDS: NAFLD, fig fruit, obesity, oxidative stress.

## 1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad de curso crónico que tiene como origen una cadena causal compleja de etiología multifactorial, donde interactúan factores genéticos, sociales, económicos y ambientales, así como estilos de vida. En México, el aumento del peso excesivo (sobrepeso y obesidad) a lo largo de casi dos décadas sitúa al país entre los que tienen mayores prevalencias a nivel mundial (Rivera *et al.*, 2013).

Uno de los principales problemas de la obesidad es el desarrollo de otras patologías como la esteatosis hepática, que forma parte de las enfermedades del hígado graso no alcohólico (NAFLD por sus siglas en inglés), la cual se caracteriza por una acumulación de grasa, principalmente en forma de triglicéridos (TG), debido a mecanismos entre los que se incluyen: lipólisis de tejido adiposo visceral o subcutáneo, ingesta dietética elevada de lípidos y carbohidratos simples, disminución de la oxidación de ácidos grasos (AG), incremento de la lipogénesis *de novo* y disminución de la secreción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), con el consecuente aumento de estrés oxidativo en la mitocondria y el retículo endoplásmico (RE) (Sanyal, 2005; Fabrini *et al.*, 2008; Nassir *et al.*, 2015).

Hasta el momento no existe un tratamiento estandarizado de la NAFLD y su progresión se ha controlado a través del manejo de los componentes separados y factores de riesgo de este desorden, tales como la obesidad, la hiperlipidemia y la diabetes. En pacientes con NAFLD, la terapia antioxidante, a través de fitoquímicos de la dieta, puede ser potencialmente útil para prevenir el desarrollo de esta enfermedad, así como su progresión a esteatohepatitis y fibrosis (Angulo y Lindor, 2005).

Diversas investigaciones han evidenciado que los higos (*Ficus carica*) secos contienen una de las concentraciones más altas de polifenoles. Entre los compuestos identificados se incluyen flavonoides, antocianinas, ácidos fenólicos, cumarinas, tocoferoles, fitoesteroles, saponinas y triterpenoides (Solomon *et al.*, 2006; Badgujar *et al.*, 2014). Sin embargo, existe poca evidencia del efecto biológico

del fruto (Badgujar *et al.*, 2014). En este sentido, en la medicina tradicional se ha reportado el uso del fruto del higo para tratar algunas enfermedades hepáticas, así como en estudios científicos con ratas alimentadas con dieta alta en grasas para normalizar los niveles de enzimas hepáticas (transaminasas) y proteínas totales (albúmina) y los niveles de colesterol y estrés oxidativo (Afzal *et al.*, 2009; Bawazeer y Qahl, 2016; Belguith *et al.*, 2016).

Si bien, no existe información que sustente el efecto del fruto del higo y de extractos obtenidos a partir del mismo sobre el estrés oxidativo en la esteatosis hepática, los estudios indican que este fruto contiene fitoquímicos que podrían proteger de dicha enfermedad. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto del consumo del fruto del higo y de sus extractos sobre la regulación del estrés oxidativo asociado a la esteatosis hepática no alcohólica en un modelo *in vivo*.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Obesidad y sobrepeso**

#### **Definición**

La obesidad, incluyendo al sobrepeso como estado premórbido, es una enfermedad de curso crónico que tiene como origen una cadena causal compleja, de etiología multifactorial, donde interactúan factores genéticos, sociales, económicos y ambientales, así como estilos de vida. Se caracteriza por un aumento en los depósitos de grasa corporal y, por ende, ganancia de peso; causados por un balance positivo de energía (Rivera *et al.*, 2013). Sin embargo, los individuos obesos no sólo se caracterizan por la cantidad de grasa que almacenan, sino también por su distribución regional dentro del cuerpo, lo cual influye en el riesgo a desarrollar comorbilidades, tales como: hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, así como algunas neoplasias en mama, endometrio, colon, próstata e hígado, entre otros padecimientos (NOM-174-SSA1-1998; WHO, 2000; NOM-008-SSA3-2017).

#### **Epidemiología**

En 2014, más de 640 millones de adultos (14%) a nivel mundial eran obesos (IARC, 2018); para ese mismo año, la prevalencia de sobrepeso en América Latina y El Caribe fue de 58% y de 23% para obesidad (Graf y Cecchini, 2018).

En México, el aumento inusitado del peso excesivo (sobrepeso y la obesidad) a lo largo de casi dos décadas sitúa al país entre los que tienen mayores prevalencias a nivel mundial (Rivera *et al.*, 2013), colocándose en el segundo lugar en peso excesivo en adultos y el cuarto lugar en niños entre los países integrantes de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE), según el reporte "Obesity Update" publicado en 2017. A nivel mundial, el país ocupa el primer lugar en obesidad infantil y el segundo en obesidad de adulto (UNICEF, 2018).

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de medio camino (ENSANUT MC) llevada a cabo en 2016, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad ( $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) en adultos de 20 o más años de edad fue de 71.2%, siendo mayor en las mujeres (75.6%) que en los hombres (69.4%).

### **Asociación de obesidad y sobrepeso con la esteatosis hepática**

Debido a que la historia natural de la diabetes tipo 2 y la obesidad convergen en varios factores etiológicos tales como inactividad física, urbanización y dieta hipercalórica rica en hidratos de carbono, ambas patologías aumentan su prevalencia a un ritmo acelerado. Tanto la diabetes tipo 2 como la obesidad están asociadas con la resistencia a la insulina, la cual se caracteriza por una capacidad disminuida de la insulina de llevar a cabo sus funciones fisiológicas normales; sin embargo, la mayoría de los individuos obesos, a pesar de tener resistencia a la insulina, no desarrollan hiperglicemia (Wilcox, 2005; Goblan *et al.*, 2014).

Por otro lado, la obesidad y la insulinoresistencia participan en la fisiopatología de un alto porcentaje de casos con dislipidemias. La obesidad es causa de sobreproducción de VLDL, así como aumento sérico de TG y de lipoproteínas de baja densidad (LDL), y de una disminución de las concentraciones de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Rivera *et al.*, 2013).

La obesidad, la diabetes, la resistencia a la insulina, la dislipidemia e hipertensión, que juntos se conocen como síndrome metabólico, se han identificado como factores de riesgo clínico asociados a la esteatosis hepática (Boyce *et al.*, 2010; Nassir *et al.*, 2015). Sin embargo, el aumento del IMC es el factor más estrechamente relacionado con la prevalencia de la esteatosis hepática (Fabbrini *et al.*, 2010).

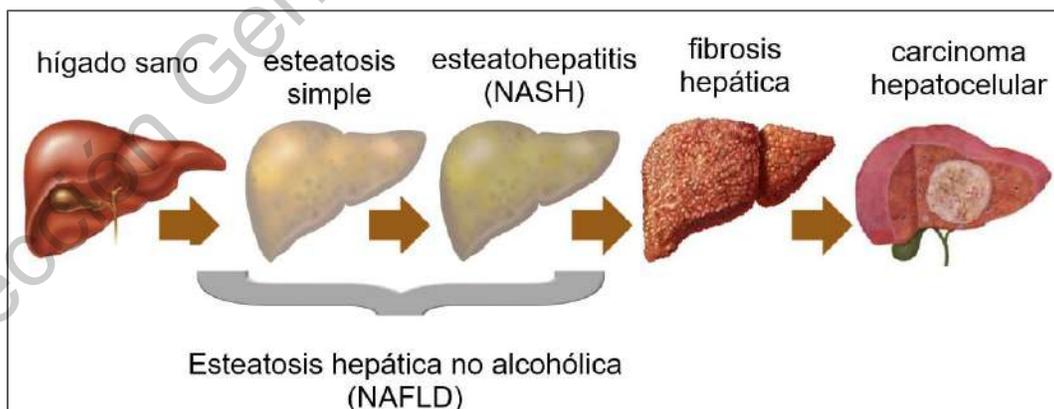
## 2.2 Esteatosis hepática no alcohólica

### Definición y clasificación

La NAFLD se caracteriza por una acumulación de grasa, principalmente en forma de TG intrahepáticos, de al menos 5% del peso del hígado o 5% de hepatocitos que contengan vacuolas lipídicas, en la ausencia de factores secundarios contribuyentes tales como ingesta excesiva de alcohol, infección viral o tratamiento farmacológico (Fabbrini *et al.*, 2010; Mashav y Shibolet, 2010; Nassir *et al.*, 2015).

La esteatosis hepática se clasifica en base al porcentaje de vacuolas o gotas lipídicas (GL) dentro de los hepatocitos, de la siguiente manera: Grado 0 o saludable < 5%, grado 1 o intermedio 5-33%, grado 2 o moderado 34-66% y grado 3 o severo > 66% (Angulo, 2002; Qayyum *et al.*, 2012).

La NAFLD representa un espectro que va desde la esteatosis simple hasta la esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés), la cual se caracteriza por inflamación e iniciación de fibrosis (Figura 1). La distinción entre estas enfermedades es importante, ya que la esteatosis simple tiene pocas probabilidades de evolucionar a complicaciones hepáticas graves y es reversible, mientras que NASH podría progresar a cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular de manera irreversible (Betterman *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Evolución patológica de NAFLD (Adaptado de Baffy, 2015).

## **Diagnóstico**

La mayoría de los pacientes con NAFLD no presentan signos y síntomas que se asocien a enfermedad hepática al momento del diagnóstico, aunque algunos reportan fatiga y malestar o distensión del lado derecho del abdomen superior. La hepatomegalia (aumento patológico del tamaño del hígado) es uno de los hallazgos físicos frecuentes en la mayoría de los pacientes (Angulo, 2002).

La NAFLD se diagnostica generalmente por estudios de imagen y por histología (Mashav y Shibolet, 2015). Si bien, existen marcadores no invasivos disponibles para la evaluación diagnóstica de los pacientes con sospecha de esteatosis hepática (Cuadro 1), la biopsia hepática sigue siendo el estándar de oro para confirmar o excluir el diagnóstico de la enfermedad, analizar la presencia de fibrosis y la integridad estructural de los hepatocitos (Tiniakos *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2012; Hardy *et al.*, 2016).

## **Epidemiología**

La prevalencia de NAFLD varía en función de la definición, la población estudiada y los métodos diagnósticos; se estima una prevalencia mundial de entre 20 y 30% (Mashav y Shibolet, 2015); así mismo, esta enfermedad está presente en el 70% de los individuos con sobrepeso, 70% de los sujetos diabéticos y arriba del 90% en obesos (Nassir *et al.*, 2015).

En México se desconoce con exactitud la prevalencia de la enfermedad; sin embargo, un estudio llevado a cabo en 2006 por Cervera y colaboradores reporta una prevalencia general del 17.4 %; mientras que, Lizardi y colaboradores (2012) mencionan una prevalencia del 82.9% en pacientes con síndrome metabólico, y un último estudio, realizado por Briseño y colaboradores (2018), mostró una prevalencia global de 49.19%.

**Cuadro 1.** Evaluación diagnóstica de la NAFLD

<b>Tipo de evaluación</b>	<b>Pruebas realizadas</b>	
<b>Evaluación clínica</b>	Exploración física Exclusión de ingesta excesiva de alcohol Exclusión de otras causas de hígado graso de etiología no alcohólica	Peso, talla, IMC Anamnesis Historia clínica para detectar antecedentes de infecciones virales y autoinmunes, enfermedades hereditarias, fármacos, toxinas y nutrición parenteral.
<b>Marcadores séricos e índices bioquímicos</b>	Pruebas bioquímicas	Alanino amino transferasa (ALT) Aspartato amino transferasa (AST) Fosfatasa alcalina (ALP)
	Marcadores directos e indirectos de inflamación y fibrosis Modelos matemáticos que incluyen variables clínicas y analíticas	Citoqueratina 18 (M30 y M65) Proteína C reactiva SteatoTest (BioPredictive), Fibrospect y “NAFLD fibrosis score” (NFS).
<b>Pruebas de imagen</b>	Ultrasonografía Tomografía computarizada (TC) Resonancia magnética nuclear (RMN) Nuevas técnicas de imagen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Elastografía de transición FibroScan®</li> <li>• Espectroscopia por resonancia magnética de protones (ERM)</li> <li>• Fuerza de radiación acústica de impulsos (ARFI) o elastosonografía</li> <li>• Elastografía por resonancia magnética</li> </ul>	
<b>Biopsia hepática</b>	El diagnóstico histológico se realiza a través del estadiaje semicuantitativo de Brunt, que nos indica el grado de esteatosis macrovesicular de la siguiente forma: 0: no existe 1: < 33 % 2: 33-66 % 3: > 66 %	

Fuente: Wieckowska & Feldstein, 2008; Martínez-Domínguez *et al.*, 2013; Mashav & Shibolet, 2015.

La NAFLD es una enfermedad dominante en el género masculino; aunque los mecanismos diferenciales de género son desconocidos, éstos pueden estar relacionados al efecto protector de los estrógenos contra el desarrollo de esteatosis. La prevalencia de NAFLD incrementa con la edad y se ha observado un riesgo asociado a etnias, siendo la hispana la que presenta mayor predisposición a desarrollar la enfermedad (Mashav y Shibolet, 2015).

Datos alarmantes indican que NAFLD está también presente en 3-10% de niños con peso normal y en 50% de los niños obesos. Además, estudios sugieren que las anormalidades metabólicas pueden empezar en etapas tempranas de la vida intrauterina y causar NAFLD en niños (Nassir *et al.*, 2015).

### **Etiopatogenia**

El hígado desempeña un papel central en el metabolismo de lípidos (Choi y Diehl, 2010; Zhang *et al.*, 2018); dentro de él, los AG pueden tener varios destinos metabólicos:

- Pueden oxidarse dentro de la mitocondria a cuerpos cetónicos
- Pueden experimentar oxidación dentro de los peroxisomas
- Pueden oxidarse por el sistema del citocromo P450
- Pueden ser reesterificados a TG o usados para la síntesis de otros lípidos (Sanyal, 2005).

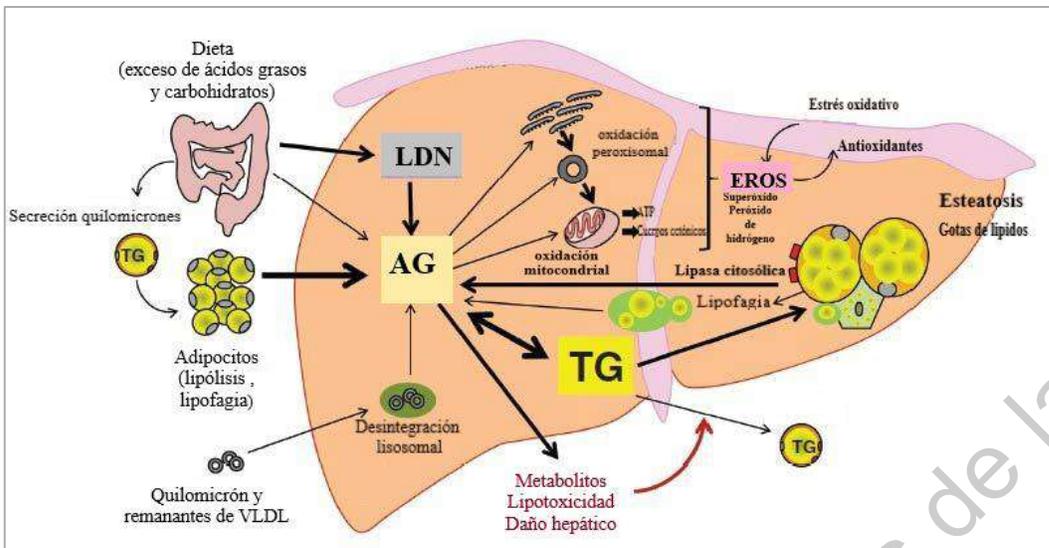
El hígado no acumula normalmente TG; sin embargo, bajo condiciones de estrés, tales como obesidad y dieta alta en carbohidratos y grasas, se suscita un metabolismo anormal que ocasiona que los lípidos se almacenen (Nassir *et al.*, 2015). Existen varios mecanismos que pueden conducir al desarrollo de hígado graso (Fabbrini *et al.*, 2008), los principales son: 1) incremento en el aporte de AG, debido a la lipólisis de tejido adiposo visceral o subcutáneo y a la ingesta dietética elevada; 2) disminución de la oxidación de AG; 3) incremento de la lipogénesis de *novo* (LDN) y 4) disminución de la secreción hepática de VLDL (Sanyal, 2005; Mashav y Shibolet, 2015).

En el contexto de la resistencia a la insulina, el exceso de AG fluye a través del hígado después de la lipólisis en el tejido adiposo, de la degradación lisosomal de los restos de proteínas ricas en TG, de la lipofagia y de la LDN; producto de una dieta alta en carbohidratos (especialmente fructosa). Los AG también se derivan de los remanentes de lipoproteínas y de los quilomicrones resultantes de la absorción intestinal de grasas. La acumulación de AG en el hígado ocurre entonces, como resultado del desbalance entre la tasa de entrada y la remoción de TG (Liu y Czaja, 2013).

Una adecuada oxidación de los AG previene su acumulación en el hígado; sin embargo, la oxidación excesiva de estas biomoléculas da origen a la presencia de estrés oxidativo y a la reducción de las defensas antioxidantes (Malaguarnera *et al.*, 2009). El modelo de lipotoxicidad de la lesión hepática sugiere que los AG se transforman en metabolitos activos capaces de orquestar el daño hepatocelular, es decir, estrés del RE, inflamación, necrosis y apoptosis, característicos de la esteatohepatitis no alcohólica (Figura 2) (Wang *et al.*, 2013).

### **El estrés oxidativo en NAFLD**

El hígado está compuesto de células parenquimatosas especializadas, los hepatocitos, que se encargan de convertir sustancias nocivas y tóxicas en sustancias inertes que son excretadas por la bilis, tiene más de 500 funciones y, por lo tanto, es un órgano altamente susceptible del daño provocado por especies reactivas. Cuando el balance de óxido-reducción (redox) entre la generación de especies reactivas y los mecanismos de defensas antioxidantes se daña y los niveles de productos de oxidación exceden la capacidad de los sistemas antioxidantes normales, las especies reactivas dañan las macromoléculas celulares y se produce estrés oxidativo (Nissar & Tasduq., 2015; Keshari *et al.*, 2017).



**Figura 2.** Patogénesis de la esteatosis hepática no alcohólica

El exceso de **AG** fluye a través del hígado después de la lipólisis en el tejido adiposo, de la lipofagia y de la **LDN**. Los **AG** se oxidan en las mitocondrias y, parcialmente, en los peroxisomas y el retículo endoplásmico liso (**RE**). La formación de especies reactivas de oxígeno (**EROS**), peróxido de hidrógeno y superóxido, así como el estrés oxidativo, son controlados por sistemas antioxidantes específicos. Los **AG** se esterifican con glicerol para formar **TG**, los cuales representan un sistema de almacenamiento de lípidos en el hígado, que eventualmente conducen a la formación de gotas de lípidos y esteatosis. Las lipasas citosólicas pueden transferir **AG** adicionales de las gotas de lípidos al grupo de ácidos grasos.

Adaptado de Wang *et al.* (2013)

El estrés oxidativo se define como un desbalance entre oxidantes y antioxidantes, a favor de los primeros, permitiendo una disrupción de la señalización de óxido – reducción y daño molecular (Sies, 2018). La comprensión de los mecanismos del estrés oxidativo, su regulación y su acción en el desarrollo de la NAFLD es de vital importancia.

En los mamíferos, se ha desarrollado un sofisticado sistema antioxidante para mantener la homeostasis redox en el hígado, en el cual tanto el sistema enzimático como el no enzimático, son esenciales para la respuesta celular para poder controlar el estrés oxidativo (Gambino *et al.*, 2012).

El estrés oxidativo se considera uno de los mecanismos patológicos que da como resultado el inicio y la progresión de diversas enfermedades hepáticas. En el hígado, las células de Kupffer, las células estrelladas y las células endoteliales están

potencialmente más expuestas o son más sensibles a las moléculas relacionadas con el estrés oxidativo. En las células estrelladas hepáticas, se desencadena la proliferación y síntesis de colágeno por la peroxidación lipídica causada por el estrés oxidativo, lo cual conduce a la aparición de fibrosis. En las células de Kupffer, se puede producir una variedad de citocinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF), inducidas por el estrés oxidativo, lo que podría aumentar la inflamación y la apoptosis, provocando que la fibrosis pueda progresar a carcinoma hepatocelular (Sha Li *et al.*, 2005).

Las mitocondrias, el retículo endoplásmico y los peroxisomas en las células parenquimatosas pueden producir especies reactivas, activando al receptor activado por proliferadores peroxisómicos alfa (PPAR $\alpha$ ), un factor de transcripción que regula la expresión de genes de oxidación de AG en el hígado (Van Raalte *et al.*, 2004). Por ejemplo, dado que el ensamble y secreción de las VLDL requiere la función de la apolipoproteína B (apo B) y de la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTTP), el daño producido por estrés oxidativo puede tener por consecuencia un defecto en la apoB o en la MTTP e impedir que se exporten lípidos del hígado y, como consecuencia, provocar que se desarrolle esteatosis hepática (Nassir *et al.*, 2015; Hardy *et al.*, 2016).

Nrf2 (factor nuclear eritroide 2) es un factor de transcripción que actúa como mediador central de la respuesta adaptativa al estrés oxidativo; así mismo, este factor regula la expresión de genes antioxidantes y citoprotectores. La activación de Nrf2 protege a las mitocondrias del estrés oxidativo a través de una variedad de mecanismos que dependen de diferentes circunstancias, como el aumento de los niveles de antioxidantes, la protección contra la apertura de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial, el mantenimiento del estado redox mitocondrial, que mejora la biogénesis mitocondrial al promover la transcripción del factor nuclear respiratorio 1 (Nrf1). La activación de Nrf2 podría facilitar el metabolismo de los AG en el hígado al regular directamente los genes relacionados con el metabolismo de éstos (Shai Li *et al.*, 2005).

Se ha propuesto que Nrf2 puede retrasar la progresión de la NAFLD a NASH a través de la inducción de enzimas citoprotectoras, minimizando los efectos deletéreos del estrés oxidativo (Chartoumpakis y Kensler, 2015). Estudios realizados en ratones *Nrf2*<sup>-/-</sup> alimentados con dieta deficiente en metionina y colina (DMC) mostraron niveles bajos de glutatión reducido (GSH) y elevados de glutatión oxidado (GSSG), así como una actividad reducida de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), aumentando probablemente la sensibilidad de los tejidos de los ratones *Nrf2*<sup>-/-</sup> al daño oxidativo y mostrando un fenotipo más pronunciado de acumulación de TG hepáticos, inflamación y fibrosis (Chowdhry *et al.*, 2010; Sugimoto *et al.*, 2010).

Se han evaluado varias enzimas antioxidantes como indicadores de la progresión de NAFLD en varios modelos experimentales, principalmente en roedores, entre las que se incluyen: SOD, CAT, glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), así como el antioxidante no enzimático GSH (Ore *et al.*, 2019). Ho y colaboradores (2004) sugirieron que la actividad antioxidante de CAT es dependiente del tipo de tejido y modelo de daño tisular mediado por sustancias oxidantes, siendo el hígado el órgano con mayor actividad, respecto al cerebro, corazón, riñón y pulmones; por lo cual, dicha enzima es clave para la defensa antioxidante causada por el peróxido de hidrógeno en el tejido hepático.

La reducción de la defensa antioxidante juega un papel clave en la promoción del estrés oxidativo en pacientes con NAFLD (Leclercq, 2004). Piao y colaboradores (2017) demostraron un aumento en los depósitos de grasa hepática en ratones knockout de CAT (CKO), al administrarles una dieta alta en grasas, en sólo dos semanas. Su-Kyung y colaboradores (2019) emplearon el mismo modelo de ratones y sus resultados sugieren que la CAT hepática previene el desarrollo de hígado graso, posiblemente a través de la eliminación del peróxido de hidrógeno.

### **Manejo terapéutico**

La NAFLD es menos benigna de lo que se cree, ya que los pacientes pueden permanecer con esteatosis simple por varios años, o bien, avanzar rápidamente a NASH, fibrosis y, posteriormente, carcinoma hepatocelular (Haas *et al.*, 2015).

Hasta el momento no existe un tratamiento estandarizado de la NAFLD (Cuadro 2), y tampoco existe consenso sobre cuál es el más adecuado para cada paciente y el momento de comenzarlo (Martin *et al.*, 2013). Sin embargo, las recomendaciones apuntan a limitar el uso de terapia farmacológica dirigida a aquellos pacientes con NASH, ya que en los pacientes con NAFLD sin signos de daño hepático y fibrosis se ha controlado la progresión de la enfermedad a través del manejo de los componentes separados y factores de riesgo de este desorden, tales como obesidad, hiperlipidemia y diabetes (Mashav y Shivolet, 2015).

Los cambios en la dieta en combinación con actividad física pueden inducir mejoras sustanciales en la esteatosis hepática, inflamación y fibrosis (Mashav y Shivolet, 2015). Así mismo, a través de la restricción calórica los pacientes pueden mejorar los niveles sanguíneos de transaminasas (enzimas hepáticas que funcionan como marcadores de lesión hepática) y de insulina hasta alcanzar rangos de normalidad (Martín, 2013). Los resultados son casi universales en adultos obesos y niños después de una reducción de peso. El grado de infiltración de grasa usualmente disminuye con la pérdida de peso en la mayoría de los pacientes, alrededor de 500 g por semana en niños y 1600 g por semana en adultos; sin embargo, el grado de esteatohepatitis y fibrosis puede empeorar (Angulo, 2002).

Las intervenciones farmacológicas con triterpenoides, compuestos que se encuentran en el fruto del higo, pueden considerarse como una opción terapéutica y preventiva en el futuro, ya que estos compuestos son activadores de la vía Nrf2-Keap1 (principal vía reguladora de las respuestas citoprotectoras al estrés oxidativo), al modificar los residuos de cisteína en la proteína represora Keap1 y promover la traslocación de Nrf2 al núcleo (Chartoumpekis y Kensler, 2015).

En pacientes con NAFLD, la terapia antioxidante puede ser potencialmente útil para prevenir la progresión de esteatosis a esteatohepatitis y fibrosis (Angulo y Lindor, 2005). Los antioxidantes que han sido evaluados en los pacientes con NAFLD incluyen:

- Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), el consumo de 300 mg/d durante un año disminuyó el grado de esteatosis, inflamación y fibrosis detectados por biopsia hepática (Angulo & Lindor, 2005).
- Vitamina E (1000 UI/d) + vitamina C (1000 UI/d), su consumo durante 6 meses mejoró el grado de fibrosis, pero no hubo diferencia significativa en enzimas de función hepática (Angulo & Lindor, 2005).
- Coenzima Q, el consumo de 100 mg/d en cápsulas mejoró varios parámetros bioquímicos y antropométricos, así como disminución de AST y varias citocinas derivadas del tejido adiposo (Spahis *et al.*, 2017).
- Betaína, un metabolito natural de la colina, administrado en solución anhidra (20 g/d durante 1 año) disminuyó los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) y de aspartato aminotransferasa (AST), en un 39 y 38 %, respectivamente (Abdelmalek *et al.*, 2001).
- N-acetilcisteína, un profármaco de glutatión que aumenta los niveles de glutatión en hepatocitos, se administró en una dosis de 1 g/d durante 3 meses y disminuyó de manera significativa los niveles de ALT (14 %) (Angulo & Lindor, 2005).

Algunos estudios *in vitro* coinciden con el hecho de que, en la NAFLD, los compuestos polifenólicos reducen la acumulación de TG inducidos por un exceso de AG o por altas concentraciones de glucosa. Los mecanismos en los que dichos estudios concuerdan son la inhibición de la lipogénesis y la promoción del catabolismo de los AG. Respecto a estudios *in vivo* se ha concluido que los polifenoles pueden prevenir parcialmente la esteatosis hepática asociada con la obesidad a través de la modulación de la expresión de genes de adipocinas, mediado por la reducción de los niveles de leptina y el incremento de adiponectina en el tejido adiposo, lo cual se ve reflejado en una menor acumulación de lípidos hepáticos y en tejido adiposo (Rodríguez-Ramiro *et al.*, 2016).

Los extractos herbales de la medicina tradicional, usualmente obtenidos de plantas nativas de cada región, se han usado en varios trastornos clínicos por años. En el pasado, debido a la falta de tecnologías analíticas avanzadas, se desconocían los

mecanismos por los cuales dichos extractos podían tratar o curar ciertas enfermedades; sin embargo, los avances tecnológicos han permitido que ciertos extractos herbales cobren importancia como tratamiento de enfermedades. Algunos extractos herbales chinos son usados en el tratamiento clínico de la NAFLD, sugiriendo la facultad de estos para inhibir la progresión de la enfermedad. Los compuestos bioactivos de dichos extractos incluyen el resveratrol, polisacáridos de una frutilla llamada *Lycium barbarum*, dioscina, fracción polifenólica de la bergamota (un fruto similar al limón), la capsaicina y la S-alilmercaptocisteína (SAMC) del ajo (Liu *et al.*, 2017).

## **Cuadro 2.** Tratamiento farmacológico y no farmacológico de la NAFLD

### *Tratamiento no farmacológico*

-Cambios en el estilo de vida: dieta y ejercicio

- Evitar sedentarismo
- Dieta equilibrada y rica en fibra vegetal
- Ejercicio físico continuado
- Evitar pérdida brusca de peso

-Cirugía bariátrica

### *Tratamiento farmacológico*

-Tratamiento de resistencia a la insulina

-Fármacos que inducen la pérdida de peso

*Hipolipemiantes: estatinas*

*Agentes citoprotectores y antioxidantes*

- Ácido ursodesoxicólico
- Tocoferol: vitamina E
- N-Acetilcisteína
- Betaína

*Bloqueantes de los receptores de angiotensina II (ARA II)*

*Otras opciones terapéuticas en investigación*

- Antibióticos y probióticos
- Agonistas del receptor X farnesoide (FXR)
- Flebotomías y terapia quelante de hierro
- Suplementos de omega 3

*Trasplante hepático*

Fuente: Haas *et al.*, 2015; Mashav y Shibolet, 2015; Lyn *et al.*, 2016.

Existen varias especies vegetales en la naturaleza que son ricas en fitoquímicos, como los antes mencionados, por lo cual podrían tener un uso potencial para el tratamiento de la esteatosis hepática.

### 2.3 *Ficus carica*

#### Taxonomía

Reino: plantae, división: magnoliófitas, clase: magnoliópsidas, orden: urticales, familia: moraceae, género: ficus, especie: carica.

El género *Ficus* (Moraceae) constituye uno de los géneros más amplios de angiospermas, con más de 800 especies de árboles, epífitas y arbustos en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Existen varias especies de *Ficus* y numerosas variedades, con una diversidad genética significativa; sin embargo, *Ficus carica* Linn, o mejor conocido como árbol de higo o higo, es el miembro más popular de dicho género. Aunque es nativo de la zona del Himalaya, Bengala e India central, el higo se ha cultivado exitosamente alrededor del mundo (Badgujar *et al.*, 2014).

#### Usos tradicionales de *Ficus carica*

*Ficus carica* se ha usado ampliamente en la medicina tradicional desde tiempos antiguos. Se ha empleado para tratar desórdenes del sistema endócrino (diabetes), sistema respiratorio (asma y resfriado), aparato digestivo (enfermedades del hígado, úlceras y vómitos), aparato reproductor (dolor menstrual) y enfermedades infecciosas de la piel, tales como sarna y gonorrea (Badgujar *et al.*, 2014).

Las hojas del higo son conocidas como remedio de la diabetes en España y suroeste de Europa; en India se estila masticar las hojas como tratamiento para la ictericia, así como para desórdenes del hígado y el bazo. La savia de las hojas se usa tópicamente para tratar verrugas, picaduras de insectos y pinchazos de espinas. El fruto del higo se ha usado en la medicina tradicional como laxante, debido a su alto contenido de azúcares y mucílagos. La pulpa tiene propiedades emolientes y

antiinflamatorias (tomado de Nicotra *et al.*, 2010). En India, se consume el fruto del higo como auxiliar en las enfermedades hepáticas y del bazo (Mawa *et al.*, 2013).

Respecto al uso del fruto del higo en enfermedades hepáticas, Afzal y colaboradores (2009) realizaron un estudio etnobotánico en Pakistán, donde colectaron plantas nativas y documentaron los testimonios de los pobladores respecto al uso medicinal, reportando así la utilización de los higos para curar las enfermedades del hígado.

### **Composición nutrimental y fitoquímica del fruto del higo.**

*Ficus carica* es ampliamente cultivado por su fruto comestible, el higo, el cual es frecuentemente desecado para su posterior comercialización. Los higos son una de las fuentes más altas de calcio y fibra. De acuerdo con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), los higos secos son más ricos en fibra, cobre, manganeso, magnesio, potasio, calcio y vitamina K, comparados con los higos frescos (Cuadro 4) (Badgujar *et al.*, 2014).

Los higos secos contienen una de las concentraciones más altas de polifenoles respecto a los frutos de consumo común, como uvas, arándanos y zarzamoras. Comparado con los higos, el vino tinto y el té, que son fuentes reconocidas de polifenoles, son relativamente bajos en estos compuestos (Kaliskan, 2015).

Las investigaciones científicas han permitido el aislamiento de varios compuestos fitoquímicos, tales como fitoesteroles, antocianinas, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, compuestos fenólicos, alcoholes alifáticos, compuestos volátiles y otra clase de metabolitos secundarios de *Ficus carica* (Solomon *et al.*, 2006; Badgujar *et al.*, 2014).

**Cuadro 3.** Compuestos fitoquímicos presentes en diferentes partes de *Ficus carica*

Parte de la planta	Tipo de fitoquímico	Ejemplo
<b>Hojas</b>	Flavonoides	Quercetina, luteolina, biocanina-A, luteolina-6C-hexosa-8C-pentosa, rutinósido de apigenina, rutinósido de kaempferol, rutinósido de quercetina, glucósido de quercetina, acetilglucósido de quercetina.
	Ácidos orgánicos	Ácidos oxálico, cítrico, málico, quínico, shikímico y fumárico
	Compuestos fenólicos	3-CQA (3-O-ácido cafeoilquínico), 5-CQA (5-O- ácido cafeoilquínico), Q-3-Glu (quercetin 3-O-glucósido), Q-3-rut (quercetin-3-rutinósido), ácido ferúlico, psoraleno, bergapteno, pirogálico, fenol, 3-5 dimetoxi, cumárico, pinocembrina, galangina, cinámico, quercetina y pinostrobrina
	Triterpenoides	Bauerenol, acetato de lupeol, acetato de calotropenil, metil maslinato y ácido oleanólico
<b>Savia</b>	Fitoesteroles	Betulol, lupeol, lanosterol, acetato de lupeol, $\beta$ -amirina, $\beta$ -sitoesterol y $\alpha$ -amirina
	Ácidos grasos	Ácido mirístico, ácido pentadecíclico, ácido palmítico, ácido margárico, cis-10-ácido heptadecenoico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido elaídico, ácido linoleico, ácido araquidónico, ácido heneicosílico y ácido behénico
	Aminoácidos	Leucina, triptófano, fenilalanina, lisina, histidina, asparagina, alanina, glutamina, serina, glicina, ornitina, tirosina y cisteína
	Compuestos volátiles	Pentanal, hexanal, heptanal, benzaldehído y octanal 7, 1-butanol-3-metilo, 1-butanol-2-metilo, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-heptanol, feniletil alcohol, fenilpropil alcohol, 6-metil-5hepten-2-uno, monoterpenos $\alpha$ -tujeno, $\alpha$ -pineno, $\beta$ -pineno, limoneno, terpinoleno, eucaliptol, cis-linalol óxido, linalol y epoxilinalol, sesquiterpenos $\alpha$ -guaiano, $\alpha$ -bourboneno, $\beta$ -cariofileno, trans- $\alpha$ -bergamoteno, $\alpha$ -cariofileno, T-muroleno, germacreno D, cadineno y $\alpha$ -calacoreno.
<b>Piel</b>	Esteroles	6-O-acil- $\beta$ -D-glucosil- $\beta$ -sitoesteroles
<b>Fruto</b>	Antocianinas	3-ramnoglucósido de cianidina, 3-glucósido de cianidina, 3,5-diglucósido de cianidina, 3-rutinósido de cianidina, 3-glucósido de pelargonidina, dímero de 3-glucósido de cianidina, 3-glucósido (epi)catequina, 3-rutinósido de (epi)catequina, 5 diglicósido, carboxipirano cianidina-3-rutinósido, cianidina-3-malonilglicosil-glucósido, pelargonidin-3-gluósido, pelargonidin-3-rutinósido, pelargonidin-3-rutinósido, peonidin-3 rutinósido, cianidin-3-maloniglicósido y epicatequina

Adaptado de Badgujar *et al.*, 2014.

Solomon y colaboradores (2006) evaluaron el contenido de antocianinas, polifenoles, flavonoides y capacidad antioxidante de seis variedades de higo:

Mission, chechik, brown Turkey, Bursa, Brunswick y Kadota, cuyos resultados se muestran en el Cuadro 5. Los resultados indican que la variedad dark Mission contiene los niveles más altos de polifenoles, flavonoides y antocianinas, y exhibe la capacidad antioxidante más alta respecto al resto de las especies evaluadas; el motivo está relacionado con la alta intensidad de su coloración, dado que la piel es la mayor fuente de antocianinas y fenoles.

**Cuadro 4.** Valor nutrimental de higo deshidratado y fresco por porción de 100 g.

Nutrimento	Higo deshidratado	Higo fresco maduro
Agua (%)	30.10	79.10
Energía (kcal)	249.00	74.00
Proteína (g)	3.30	0.80
Grasas (g)	0.90	0.30
Carbohidratos (g)	63.90	19.20
Fibra (g)	9.80	2.90
Ceniza (g)	1.90	0.70
Calcio (mg)	162	35
Fósforo (mg)	67.00	14.00
Hierro (mg)	2.00	0
Tiamina (mg)	0.09	0.06
Riboflavina (mg)	0.08	0.05
Niacina (mg)	0.60	0.40
Vitamina C (mg)	1.00	2.00
Vitamina A (mg)	0	7.00
AG monoinsaturados (g)	0.16	0.07
AG poliinsaturados (g)	0.34	0.14
Potasio (mg)	680.00	232
Sodio (mg)	10.00	1.00
Zinc (mg)	0.60	0.20
Magnesio (mg)	68.00	0
Vitamina B6 (mg)	0.10	0.10
Porción comestible (%)	100	99

Fuente: Menchú & Méndez, 2012.

### Propiedades nutraceuticas del fruto del higo

Aunque se conoce del uso de *Ficus carica* en la medicina tradicional, los mecanismos moleculares asociados a las propiedades farmacológicas de las hojas y la savia del higo se han estudiado recientemente; producto de dichas investigaciones se tienen reportes de la actividad antioxidante, hemostática, antidiabética e hipolipemiante de las hojas de *Ficus carica*. Por el contrario, aún

existe poca evidencia respecto al efecto biológico del fruto en enfermedades hepáticas.

Flaishman y colaboradores (2008) realizaron una revisión bibliográfica de los efectos anticancerígenos de los polifenoles del higo, tanto naturales como secos, debido a su efecto antioxidante, capacidad para neutralizar radicales libres y propiedades antiproliferativas. Uno de los primeros estudios citados en dicha revisión fue el de Ullman y colaboradores (1952), donde se reporta que, al inyectar pequeñas dosis de látex de higo a ratones con sarcoma inducido por benceno, se inhibía el crecimiento del tumor e incluso los tumores pequeños desaparecieron. También citan el trabajo realizado por Wang y colaboradores (2003), quienes observaron la inhibición de una línea celular de cáncer por compuestos aislados de los higos.

Vinson y colaboradores (2005) realizaron un estudio clínico de diseño aleatorio cruzado, en el cual administraron 240 mL de refresco Sprite® (control) ó 240 mL de Sprite® más una porción de 40 g de higos deshidratados, en una sola toma, a un grupo de personas sanas. Posteriormente, se midió la capacidad antioxidante del plasma de los participantes a las 0, 1, 2, 4 y 6 horas después de la ingesta, y se encontró que el consumo de refresco en el grupo control redujo significativamente la capacidad antioxidante del plasma; mientras que, el consumo de la bebida acompañada de higo aumentó la capacidad antioxidante neta del plasma por 4 horas, superando el estrés oxidativo provocado por el consumo de Sprite®.

Bawazeer y Qahl (2016) evaluaron el efecto del consumo del fruto de higo molido con agua (2 mL/kg de peso) y de una mezcla de fruto molido (2 mL/kg de peso) con aceite de oliva (2 mL/kg) sobre funciones hepáticas en NAFLD en un modelo de ratas hiperlipidémicas, las cuales mostraron una disminución en sus niveles de enzimas hepáticas (AST, ALT y ALP), respecto a las ratas hiperlipidémicas sin tratamiento, e incrementaron proteínas totales y albúmina séricas con los tratamientos de higo y de higo más aceite de oliva, es decir, la mezcla mejoró la función hepática en las ratas con esteatosis hepática e hiperlipidemia.

**Cuadro 5.** Polifenoles totales, flavonoides, antocianinas y capacidad antioxidante (TEAC) del higo.

Variedad de higo	Polifenoles totales (mg GAE/100g)	Flavonoides totales (mg de (+) catequina/100 g)	Antocianinas totales (mg de C-3-G/100 g)	TEAC ( $\mu$ mol de te/100 g)
<b>FRUTO</b>				
“Brown-turkey”	58.1	3.6	1.3	120.7
“Mission”	281.1	21.5	10.9	716.3
“Chechick”	80.6	15.9	1.8	192.1
“Bursa”	56.0	2.7	0.3	100.3
“Brunswick”	50.0	2.3	Sin datos	69.5
“Kadota”	48.6	2.1	Sin datos	25.0
<b>PIEL</b>				
“Brown-turkey”	141.1	13.4	6.5	302.2
“Mission”	463.0	45.6	27.3	1987.0
“Chechick”	164.2	42.9	7.7	602.5
“Bursa”	123.0	10.1	41.0	292.5
“Brunswick”	65.5	3.8	0.7	101.2
“Kadota”	41.7	2.2	Sin datos	82.0
<b>PULPA</b>				
“Brown-turkey”	42.9	1.6	0.1	79.3
“Mission”	100.6	5.7	0.3	357.5
“Chechick”	36.5	4.5	0.1	88.4
“Bursa”	73.7	3.2	0.1	107.8
“Brunswick”	37.0	1.6	Sin datos	36.5
“Kadota”	59.1	2.1	Sin datos	20.8

\*GAE = Equivalencias de ácido gálico, C-3-G = cianidina-3-glicósido, TEAC = capacidad antioxidante. Adaptado de: Solomon *et al.* (2006).

El trabajo realizado por Belguith y colaboradores (2016) mostró que el extracto etanólico del higo (400 mg/kg de peso, administrado diariamente durante 8 semanas) tiene un efecto hipocolesterolémico y antioxidante en tejido hepático, renal y cardíaco de ratas alimentadas con dieta alta en grasa, lo cual comprobaron a través de la medición de la actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en dichos órganos. El efecto benéfico se atribuyó a los compuestos fenólicos, especialmente a la vitexina, al ácido dihidroxibenzoico, al ácido dipentósido y a la quercentina-3-rutinósido. En un modelo de ratas con esteatosis hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) se comprobó la efectividad de la quercetina, uno de los principales flavonoides contenidos en el fruto del higo, como reductor de la lipoperoxidación (Esrefoglu *et al.*, 2017). Por otro lado,

los ésteres de fitoesterol (PSES) atenuaron la esteatosis hepática en un modelo de NAFLD en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, los cuales se suplementaron en leche desnatada a diferentes dosis (0.05, 0.10 y 0.15 g/kg peso) una vez al día durante 12 semanas consecutivas. Al término del estudio se observó una disminución de colesterol total y del colesterol LDL; así mismo, se normalizaron los niveles de ALT y AST, el contenido hepático de grasa y la morfología histopatológica en los animales de experimentación (Song *et al.*, 2017).

Las investigaciones citadas anteriormente (Cuadro 6) muestran que varios de los fitoquímicos presentes en el fruto del higo ejercen actividad antioxidante e hipolipemiante y presentan efectos benéficos en la esteatosis hepática en modelos animales. Existe sólo un estudio que reporta los beneficios del consumo de un extracto etanólico de higo sobre el estado antioxidante del hígado y, aunque se sabe que algunos componentes no polares pueden tener beneficios sobre la esteatosis hepática en ratas, se desconoce si aquellos contenidos en el higo son capaces de exhibir el mismo beneficio, ya sea a través de un extracto o del fruto completo; por lo cual resulta necesario estudiar los beneficios que pudieran tener sobre el estrés oxidativo asociado a la esteatosis hepática no alcohólica, en un modelo animal de obesidad.

**Cuadro 6.** Principales antecedentes relacionados con los beneficios de los fitoquímicos presentes en el higo sobre protección hepática y regulación del sistema antioxidante.

<b>Autor y año</b>	<b>Modelo implementado</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis y vía de administración</b>	<b>Principales hallazgos</b>
<b>Vinson et al., 2005</b>	10 personas consumieron 240 mL de Sprite® en ayunas	Consumo de higo deshidratado junto con 240 mL de Sprite® y consumo de Sprite nuevamente a las 4 hrs	40 g de higo deshidratado Calmyrna y Mission en un diseño aleatorio cruzado	Los higos produjeron un incremento en la capacidad antioxidante neta en plasma por cuatro horas, después del consumo de Sprite®
<b>Bawazeer &amp; Qahl; 2016</b>	Ratas Wistar alimentadas con dieta alta en colesterol con una dosis de 15 g/100 g de peso corporal (dieta hiperlipidémica)	Dieta hiperlipidémica + higo empapado Dieta hiperlipidémica + higo empapado + aceite de oliva. 16 semanas	2 ml de higo molido/kg de peso, por sonda gástrica 2 ml de higo molido/kg de peso + 2 ml de aceite de oliva/ kg de peso por sonda gástrica	Ambos tratamientos redujeron significativamente los niveles de AST respecto al control hiperlipidémico e incrementaron los niveles de proteínas totales y albúmina
<b>Belguith et al., 2016</b>	Ratas Wistar alimentadas con dieta alta en grasa	Dieta alta en grasa suplementada con extracto etanólico de higo por 8 semanas	400 mg/kg de peso	Disminución de los niveles de colesterol total, TG y LDL e incremento de HDL, respecto al control obeso. Mejora del estado antioxidante a través de la disminución de la lipoperoxidación y regulación del sistema antioxidante.
<b>Esrefoglu et al., 2017</b>	Ratas Wistar tratadas con CCl <sub>4</sub>	Administración de CCl <sub>4</sub> + Quercetina por 10 días	Quercetina disuelta en etanol al 5%, 25 mg/kg/d vía intraperitoneal	Daños histopatológicos significativamente más bajos respecto al grupo control, al reducir la apoptosis hepática. La producción de malondialdehído fue menor en el grupo tratado, reduciendo la lipoperoxidación.
<b>Song et al., 2017</b>	Ratas Sprague-Dawley alimentadas con dieta alta en grasa	Administración de fitoesteroles vía orogástrica	Leche descremada suplementada con fitoesteroles en 3 dosis: 0.05 g/100 g de peso, 0.10 g/kg de peso y 0.15 g/100 g de peso	Las ratas tratadas con fitoesteroles, en todas las dosis, mostraron niveles más bajos de LDL respecto al control. El contenido hepático de lípidos y las histologías muestran menor área esteatótica, en todos los tratamientos

### 3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas del sobrepeso y la obesidad es el desarrollo de patologías como la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD), la cual se caracteriza por una acumulación anormal de grasa, principalmente en forma de TG en gotas lipídicas (GL).

Hasta el momento no existe un tratamiento estandarizado de la NAFLD. Se ha controlado la progresión de la enfermedad a través del manejo de los componentes separados y factores de riesgo de este desorden, tales como la obesidad, la hiperlipidemia y la diabetes. Así mismo, se ha observado que la terapia antioxidante puede ser potencialmente útil para prevenir la progresión de esteatosis a esteatohepatitis y fibrosis, a través de la atenuación del estrés oxidativo producido por la obesidad y sus comorbilidades.

La evidencia sugiere que el fruto del higo tiene múltiples fitoquímicos, tales como compuestos fenólicos, cumarinas y fitoesteroles, que pueden tener un efecto biológico positivo en la salud; sin embargo, no existe información que sustente el efecto benéfico de su consumo sobre la esteatosis hepática. Por lo tanto, en este proyecto se evaluó el efecto del consumo de este fruto y de sus extractos sobre la regulación del estrés oxidativo asociado a la esteatosis hepática no alcohólica en un modelo *in vivo*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del consumo del fruto del higo (*Ficus carica*) y de sus extractos sobre la regulación del estrés oxidativo asociado a la esteatosis hepática no alcohólica en un modelo *in vivo*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar el perfil fitoquímico del fruto del higo y de sus extractos con diferente polaridad.
- Evaluar el efecto del fruto de *Ficus carica* y sus extractos sobre la esteatosis hepática en un modelo *in vivo* de obesidad a través de:
  - Determinación de parámetros bioquímicos en suero.
  - Cuantificación de triglicéridos en hígado.
  - Histología hepática.
- Evaluar el efecto del consumo del higo y sus extractos sobre la actividad antioxidante en el hígado.
- Estudiar correlaciones entre la actividad antioxidante inducida por el consumo de higo y sus extractos y los parámetros bioquímicos del estudio *in vivo*, para después sugerir posibles relaciones causales.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Materiales**

#### **Material vegetal**

Se utilizaron higos deshidratados, secados al sol con un contenido de humedad de  $23.1\% \pm 0.6$ , variedad turca, los cuales fueron adquiridos en la comercializadora Exkal SA de CV.

#### **Material biológico**

Se emplearon 56 ratas macho Wistar con pesos entre 200 - 230 g, de aproximadamente 7-8 semanas, clínicamente sanas, que se adquirieron del bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Al llegar a las instalaciones se verificó el sexo de las ratas, el peso y la constancia de salud.

Se alojaron dos ratas por jaula ( $187 \text{ cm}^2$  de ancho y 18 cm de alto) de acero inoxidable, las cuales tienen un clip a prueba de escape y permiten la entrada de aire y luz. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad ( $50 \pm 10\%$ ), ciclos de 12 h de luz-obscuridad, temperatura adecuada ( $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), ventilación constante y condiciones aceptables de limpieza; las cuales consistieron en un lavado diario de bebederos, comederos, pisos y charolas de recolección; además de un lavado de jaulas y paredes cada tercer día (NOM-O62-Z00-1999).

### **5.2 Métodos**

El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro y se sometió al Comité de bioética de la facultad para su evaluación (JPQ-OFIC.-140/19).

Para la preparación de las dietas a base de higo, los frutos se secaron a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 5-7 días en un horno de aire forzado marca Memmert (Schwabach, Alemania), hasta una humedad final de  $13.3 \pm 1.5\%$ ; posteriormente, las muestras se molieron en un procesador de alimentos marca nutribullet y el tamaño de

partícula se homogenizó con un tamiz de numeración 100. Durante la manipulación de la muestra se utilizaron guantes de nitrilo estériles, cofia para cubrir el cabello, cubre bocas para evitar la contaminación de la muestra, además se aplicaron las prácticas establecidas en la NOM-251-SSA1-2009 relacionadas con la buena práctica de higiene en el manejo de alimentos.

## **5.2.1 Preparación de los extractos de higo**

Todos los disolventes usados en las extracciones fueron grado masas y se empleó agua desionizada para la preparación del extracto etanólico.

### **5.2.1.1 Extracto de hexano**

Se procesaron 100 g de higo deshidratado picado ( $23.1\% \pm 0.6$  de humedad) con 300 mL de hexano en una licuadora Oster, hasta obtener una pasta homogénea; el producto se vertió en un frasco con tapa de rosca de 1 L, se cubrió con aluminio y se mantuvo en maceración a temperatura ambiente durante 3 días, con agitación intermitente. Posteriormente se separó el residuo del líquido con manta de cielo, y el líquido se filtró a través de un papel filtro de poro fino. Posteriormente, se evaporó hasta quitar toda la humedad en un evaporador rotatorio al vacío, marca Buchi R-100 (Labortechnik AG), a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 150 rpm, y se llevó a baño maría hasta llegar a peso constante.

### **5.2.1.2 Extracto de diclorometano**

El residuo sólido obtenido del extracto de hexano se secó a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante una hora y posteriormente se mezcló con 300 mL de diclorometano, se colocó en un frasco de vidrio de 1 L con tapa de rosca y se mantuvo en maceración con agitación intermitente durante 3 días; se filtró con el mismo procedimiento del extracto de hexano y se rotoevaporó bajo las mismas condiciones. Finalmente, se llevó a baño maría hasta la completa evaporación del solvente.

### **5.2.1.3 Extracto de etanol**

El residuo que se obtuvo de la maceración previa se secó durante una hora a 45° C y posteriormente se mezcló con 300 mL de etanol al 70%, se vertió en un frasco con tapa de rosca de 1 L, se cubrió con aluminio y se mantuvo en maceración a temperatura ambiente durante 7 días, con agitación intermitente. Transcurrido dicho lapso, se separó el residuo del líquido con manta de cielo, y se filtró a través de un papel filtro de poro fino. Posteriormente, se evaporó hasta quitar toda la humedad en un evaporador rotatorio al vacío, marca Buchi R-100 (Labortechnik AG), a 35 °C y 200 rpm, y se llevó a baño maría hasta llegar a peso constante. Este procedimiento se realizó por triplicado y en cada extracto se cuantificó el contenido de compuestos bioactivos.

Una vez que los extractos se caracterizaron, se mezclaron en un solo frasco para homogenizar la muestra a administrarse a los animales de experimentación, y se almacenaron en un frasco ámbar hasta su uso dentro de un desecador a 4 °C para prevenir el daño oxidativo.

### **5.2.2 Identificación y cuantificación de compuestos bioactivos**

Se realizaron las cuantificaciones de los diferentes compuestos bioactivos que se han reportado para higo y sus extractos, a través de métodos colorimétricos.

Para realizar dichas determinaciones en el fruto, se realizó una extracción de acuerdo a lo reportado por Hassan y colaboradores (2011), con 0.5 g del fruto seco molido ( $13.3 \pm 1.5\%$  humedad) y 20 mL de una solución metanol/agua (50:50), llevada a pH 2 con HCl. La mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó durante 10 min a 1500 g y 4 °C, para recuperar el sobrenadante. Se adicionaron 20 mL de una solución acetona/agua (70:30) al residuo y se centrifugó a 1500 g, durante 10 min a 4 °C, para recuperar el sobrenadante. Posteriormente se mezclaron los dos sobrenadantes para determinar el contenido de fitoquímicos y para evaluar la capacidad antioxidante del fruto.

En el caso de los extractos, éstos se concentraron en un SpeedVac™ y posteriormente se reconstituyeron en el solvente requerido en cada técnica.

El contenido de fenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico/g muestra seca) se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y colaboradores (1998). En una microplaca se colocaron 20 µL de la muestra, 5 µL de agua destilada y 12.5 µL del reactivo Folin-Ciocalteu 1 N. La placa se agitó durante 5 min y posteriormente se adicionaron 62.5 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% en cada pozo. Se dejó reposar durante 20 min, protegida de la luz y finalmente se leyó a 760 nm. Los resultados se interpolaron en una curva estándar de ácido gálico y se expresan como mg equivalentes de ácido gálico (mg eq. AG/100 g de producto seco).

La determinación de flavonoides totales se realizó a través del método descrito por Doman y colaboradores (2005). Se mezclaron 50 µL de la muestra, 180 µL de agua destilada y 20 µL de una solución de 10 g/L de 2-aminoetil difenilborato. La absorbancia se determinó a 404 nm y los resultados se interpolaron en una curva estándar de rutina y se expresaron como mg equivalentes de rutina/100 g muestra seca.

La cuantificación de carotenoides se realizó mediante el método espectrofotométrico propuesto por Olives y colaboradores (2006), donde los resultados se expresaron en mg equivalentes de β-caroteno/g muestra seca. La extracción se realizó en condiciones de protección a la luz colocando 0.5 g de muestra seca molida en 20 mL de una solución hexano/acetona/etanol (2:1:1 v/v/v), dicha mezcla se agitó durante 30 min y se adicionaron 3 mL de agua destilada.

Para la separación de fases, la muestra se dejó en reposo, posteriormente se recuperó la fase orgánica superior y se almacenó en condiciones de obscuridad. Se repitió el procedimiento de extracción en la fase orgánica recuperada. Finalmente, se mezclaron ambas fases orgánicas, se leyó la absorbancia a 446 nm y el contenido de carotenoides se determinó mediante la Ley de Lambert-Beer y se expresan como mg equivalentes de β-caroteno/100 g de fruto.

$$\beta \text{ caroteno} = \frac{\text{Absorbancia} * \text{Peso Molecular} * \text{Factor dilución}}{\text{Coeficiente extinción molar } (\epsilon) * \text{Distancia}}$$

Peso molecular: 536.8726 g/mol

$\epsilon$ : 24.686 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

Distancia: 1 cm

Para la cuantificación de fitoesteroles se utilizó el método colorimétrico descrito por Prado y colaboradores (2013). Se tomó una muestra de 50 mg y se pesó en un tubo de vidrio previamente pesado y seco. Se saponificó a 80 °C durante una hora con 5 mL de KOH 0.5 M en metanol. La fracción no saponificada se separó agregando 1 mL de agua y 2 mL de hexano. Se transfirió una alícuota de 0.6 mL de la fase superior de hexano a un tubo de ensayo con un flujo de aire constante y una temperatura de 45 °C para la evaporación del disolvente. El material insaponificado se disolvió en 40 mL de isopropanol y, después de la mezcla en vórtice, se adicionaron 3 mL del reactivo enzimático para el colesterol (PP-colesterol- Gold Analisa, cat. 460); la muestra se incubó a 35 °C durante 15 min. Después del período de incubación la intensidad del color se midió a 500 nm. Los resultados se interpolaron en una curva estándar de  $\beta$ -sitosterol y se expresan como mg equivalentes de  $\beta$ -sitosterol/100 g de fruto.

Cabe mencionar que todas las técnicas de cuantificación se aplicaron para los dos extractos y para el fruto, y una vez que se identificó la presencia de las familias de los compuestos fitoquímicos se procedió a realizar el análisis de las muestras por UPLC-MS-TQ-S.

#### **5.2.2.1 Identificación y cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides**

El análisis del contenido de polifenoles se realizó en un sistema ACQUITY UPLC® (Waters Corp., Mildford, MA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas en tándem Xevo TQ - S triple cuadrupolo (Waters Corp.), con una interfase de ionización por electrospray (ESI). Las separaciones cromatográficas se realizaron

en una columna ACQUITY UPLC-BEH C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) a 35 °C, usando agua/ácido fórmico 7.5 m para la fase (A) y acetonitrilo como fase (B) a 0.35 mL/min de flujo y volúmenes de muestra de 2 μL. El gradiente de elución empleado se cita en el cuadro 7. Los datos se recolectaron en modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM). Los datos de escaneo masivo (MS) y MS/MS se adquirieron en modo de ionización negativa. El voltaje del capilar se estableció en 2.5 kV; la temperatura de la fuente en 150 °C; se empleó el nitrógeno como gas de solvatación a 800 L/h y 400 °C, y de cono a 150 L/h. Las transiciones MRM se determinaron a partir de la MS/MS de estándares. El análisis de datos se realizó utilizando el software MassLinx (Waters Corp.).

**Cuadro 7.** Gradiente de elución para polifenoles

<b>Tiempo (min)</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
<b>0</b>	97	3
<b>1.23</b>	91	9
<b>3.82</b>	84	16
<b>11.40</b>	50	50
<b>13.24</b>	97	3
<b>15</b>	97	3

### 5.2.2.2 Identificación y cuantificación de carotenoides

El análisis de carotenoides se realizó en un sistema ACQUITY UPLC® (Waters Corp.) acoplado a un espectrómetro de masas en tándem Xevo TQ - S triple cuadrupolo (Waters Corp.), utilizando el módulo de ionización positiva para la atmósfera -ionización química por presión (APCI+). Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna ACQUITY UPLC® HSS T3 (Waters; 50 × 2.1 mm, tamaño de partícula 1.8 μm), usando agua (89%), isopropanol (5%), acetato de amonio 500 mM (1%) para la fase (A) y acetonitrilo (89%), isopropanol (5%), acetato de amonio 500 mM (1%) como fase (B) a 500 μL/min de flujo y volúmenes de muestra de 2 μL. El gradiente de elución empleado se cita en el cuadro 8. Los datos fueron recolectados en modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM). Los datos de escaneo masivo (MS) y MS/MS se adquirieron en modo de

ionización positiva. La corona se ajustó a 25  $\mu$ A y el flujo de gas cónico a 150 L/h; mientras que, las temperaturas de la sonda y la fuente se ajustaron a 550 y 150  $^{\circ}$ C, respectivamente; también se establecieron el gas nebulizador (7.0 bar) y el flujo de gas de colisión (0.15 mL / min). Las transiciones MRM se determinaron a partir de la MS/MS del estándar. El análisis de datos se realizó utilizando el software MassLinx (Waters Corp.).

**Cuadro 8.** Gradiente de elución para carotenoides

<b>Tiempo (min)</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
<b>0</b>	95	5
<b>0.8</b>	95	5
<b>2</b>	50	50
<b>3.5</b>	95	5
<b>4.5</b>	95	5

### 5.2.2.3 Identificación y cuantificación de tocoferoles

El análisis del contenido de tocoferoles en las muestras se realizó en un sistema ACQUITY UPLC® (Waters Corp.) acoplado a un espectrómetro de masas en tándem Xevo TQ - S triple cuadrupolo (Waters Corp.), utilizando el módulo de ionización positiva para la atmósfera - ionización química por presión (APCI +). Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna ACQUITY UPLC BEH C 18 (Waters; 50  $\times$  2.1 mm, tamaño de partícula 1.7  $\mu$ m), usando agua - ácido fórmico 7.5 m para la fase (A) y metanol ácido fórmico 0.5% como fase (B) a 400  $\mu$ L/min de flujo y volúmenes de muestra de 2  $\mu$ L. El gradiente de elución empleado se cita en el cuadro 9. Los datos de escaneo masivo (MS) y MS/MS se adquirieron en modo de ionización positiva. La corona se ajustó a 25  $\mu$ A y el flujo de gas cónico a 150 L/h, mientras que las temperaturas de la sonda y la fuente se ajustaron a 300 y 150  $^{\circ}$ C, respectivamente, y el gas nebulizador (7.0 bar) y el flujo de gas de colisión (0.15 mL/min). Las transiciones MRM se determinaron a partir de la MS/MS del estándar. El análisis de datos se realizó utilizando el software MassLinx (Waters Corp.).

**Cuadro 9.** Gradiente de elución para tocoferoles

Tiempo (min)	% A	% B
0	15	85
2	10	90
8	0	100
9	15	85

### 5.2.3 Cuantificación de azúcares reductores por el método DNS

Para la cuantificación de azúcares reductores se empleó el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).

Se disolvieron 0.8 g de hidróxido de sodio en 20 mL de agua destilada, posteriormente se adicionaron 15 g de tartrato de sodio-potasio y 0.5 g de DNS. La solución se dejó en agitación durante toda la noche y posteriormente se aforó a 50 mL.

Para la preparación de las muestras, se pesó un gramo de cada muestra y se homogeneizó con 30 mL de etanol (80% v/v), se filtró y se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min. Se utilizó el sobrenadante para la cuantificación, diluyendo la muestra a conveniencia para el análisis cuando fue necesario.

Para la cuantificación se adicionaron 500  $\mu$ L de muestra y 500  $\mu$ L de DNS en un tubo de ensayo de 10 mL, los cuales se colocaron a baño maría a 100 °C durante 5 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y, una vez que la muestra se temperó, se añadieron 5 ml de agua destilada, se agitó y se dejó en reposo durante 15 min. Se leyó la absorbancia de las muestras y el blanco a 540 nm.

La concentración de azúcares reductores se determinó utilizando una curva de calibración de fructosa (0-2.5 g de fructosa/L) y el resultado se expresó como mg equivalentes de fructosa por mL de muestra.

## 5.2.4 Evaluación del efecto del higo y sus extractos en la esteatosis hepática

Después de una semana de aclimatación con alimento comercial Nutricubos (Purina, Querétaro, MEX) y agua potable *ad libitum*, las ratas se dividieron e identificaron aleatoriamente en 2 grupos: i) grupo control sano (n = 8), el cual se alimentó con la dieta estándar y agua *ad libitum*; ii) grupo obeso (n = 48), el cual se alimentó con dieta alta en grasa y fructosa (DAGF) durante 13 semanas (Cuadro 10). La DAGF se preparó con un 22% de manteca de cerdo, 20 % de fructosa y 58% de alimento estándar molido; se agregaron vitaminas y minerales en polvo para normalizar los requerimientos nutrimentales en base a los contenidos reportados en el alimento estándar.

**Cuadro 10.** Contenido nutrimental de las dietas administradas a los animales de experimentación

Tratamiento	Energía aportada por dieta (kcal/100 g alimento)	Hidratos de carbono (%)	Proteínas (%)	Lípidos (%)
DE	343	61.3	26.9	11.8
DAGF	473	44.1	11.1	44.8
DAGF II				
EE 400				
EE 800	424.8	41.9	18.5	39.6
Hexano				
Higo 21%	418.6	43.9	18.1	38
Higo 70%	403.5	49	16.4	34.6

Cada jaula se identificó de acuerdo al grupo experimental y cada rata se marcó con un color diferente en la cola. Cabe mencionar que no se encontró evidencia que reporte la toxicidad en roedores del colorante que se empleó.

Transcurridas las 13 semanas, los animales correspondientes al grupo obeso se subdividieron en 4 grupos de 8 animales y 2 grupos de 7 animales (Cuadro 10), eliminándose un animal de estos dos últimos grupos ya que aumentaron significativamente de peso respecto a los demás animales. Los primeros cuatro grupos se alimentaron con dieta alta en grasa (15% de manteca) y se hidrataron

con agua adicionada con fructosa al 30% (DAGF II), se canularon vía intragástrica con los extractos de etanol y hexano con la dosis correspondiente. Los otros dos grupos se alimentaron con dieta alta en grasa suplementada con higo al 21 y al 70%, y se hidrataron con agua adicionada con fructosa al 30% (Figura 3). Los grupos que no recibieron tratamiento por vía intragástrica se canularon con agua salina. Los diversos tratamientos se administraron durante 8 semanas.

Las dietas experimentales (Cuadro 10) se diseñaron de manera que contuvieran la misma cantidad de kilocalorías y que cumplieran el porcentaje de proteína para el mantenimiento de la masa muscular de las ratas Wistar (>10%). Los porcentajes de higo deshidratado (12% humedad) molido que se incorporaron a las dietas experimentales se establecieron en solicitud a la empresa que financió el proyecto; para normalizar el porcentaje proteico de la dieta con higo al 70% se agregó concentrado de proteína de leche MPC 85 (Dairy Management Inc®), igualmente se agregaron vitaminas y minerales para normalizar los micronutrientes reportados por el alimento estándar.

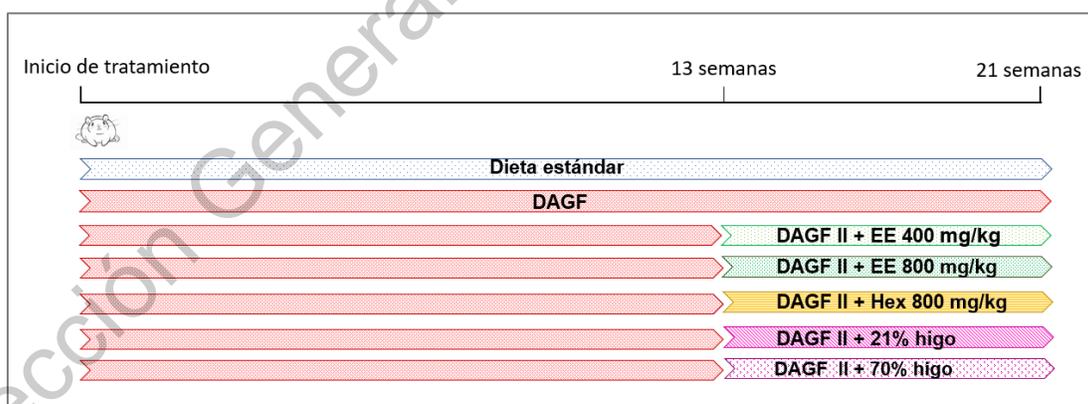
La concentración de los extractos administrada a los animales de experimentación se basó en dosis previamente reportadas por otros autores para administración de extractos (Belguith *et al.*, 2016; Rehman *et al.*, 2016).

**Cuadro 11.** Grupos de estudio *in vivo* para la evaluación del efecto de *Ficus carica* y sus extractos en esteatosis hepática

Grupo	Tratamiento
DE	Dieta estándar + agua
DAGF II	Dieta alta en grasa + agua con fructosa al 30%
EE 400	DAGF II + extracto de etanol 400 mg/kg
EE 800	DAGF II + extracto de etanol 800 mg/kg
Hexano	DAGF II + extracto de hexano 800 mg/kg
Higo 21%	DAGF II + higo al 21%
Higo 70%	DAGF + higo al 70%

Las dietas y el agua se colocaron una vez al día, a la misma hora, permitiendo que lo animales se alimentaran *ad libitum* durante el período experimental.

Cada semana se registró el peso corporal de los animales y su consumo de alimento (por 24 h). Una semana previa al sacrificio, se recolectaron muestras de orina y heces, colocando a los animales individualmente en jaulas metabólicas y colectando sus desechos orgánicos en tubos de polimetilpenteno impermeable que fueron almacenados a -70 °C para análisis posteriores (NOM-062-ZOO-1999). Previo al sacrificio, los animales se sometieron a ayuno durante 8 h, se les aplicó eutanasia a través de decapitación con guillotina. Posteriormente, se removieron los órganos, los cuales se lavaron con solución fisiológica estéril y fría. Para calcular el índice de adiposidad, que se obtiene al sumar los diversos compartimentos del tejido adiposo (visceral, epididimal y suprarrenal), dividirlos entre el peso corporal y multiplicar el resultado por 100, se pesaron los tejidos por separado y posteriormente se sumaron para obtener el total de tejido adiposo. Una fracción de todos los tejidos se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -70 °C, otra fracción se almacenó en una solución amortiguadora de formalina al 10% (pH 7.4) para los análisis histológicos, los cuales estuvieron a cargo de la Dra. Erika de los Ríos, históloga de la facultad de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla, y una segunda evaluación a cargo de la Dra. Xóchitl Zambrano Estrada, responsable del laboratorio de patología diagnóstica veterinaria de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ.



**Figura 3.** Modelo animal de experimentación.

El material quirúrgico utilizado en el sacrificio se remojó con cloro por 12 h, posteriormente se lavó y se esterilizó para su reuso en el laboratorio. Las jeringas utilizadas se colocaron en un bote rojo de polipropileno especial para objetos punzocortantes con la leyenda: “residuos punzocortantes biológico-infecciosos”, el

cual se almacenó en un congelador (-11 °C) durante 15 días hasta su debido transporte por la empresa Ecolservi Industrial S de RL de CV.

Los restos de las ratas no requeridas para análisis y destinadas a desecho se almacenaron en un congelador (-11 °C), en bolsas grandes color amarillo, cuyo aforo fue menor del 80% de su capacidad, se marcaron con la leyenda “desechos patológicos” y se almacenaron durante 15 días hasta su transporte e incineración, que estuvo a cargo de la empresa antes mencionada, la cual garantizó el tratamiento sobre los residuos para la eliminación de los microorganismos que pueden causar daños a la salud, y llevó a cabo la disposición final de los mismos (NOM-087-ECOL-SSA1-2002), entregando como evidencia el manifiesto número 10045.

#### **5.2.5 Cálculo de consumo de azúcares simples y de compuestos polifenólicos en los animales de experimentación.**

Para calcular el consumo de azúcares simples de los animales de experimentación se realizó la sumatoria de la cantidad de azúcares contenidos en la dieta y el extracto que se administró a cada uno de los grupos experimentales. Para la dieta estándar se consideraron los valores reportados en la hoja técnica del alimento (fructosa y glucosa); para el caso del higo molido y los extractos se tomaron en cuenta las cantidades de azúcares reductores reportadas a través de la técnica de DNS. Una vez que se obtuvo el total de azúcares contenidos en la dieta y los extractos, se realizó el cálculo para los gramos de alimento y mililitros de agua con fructosa consumidos por los animales de experimentación, de acuerdo con el registro de consumo de alimento realizado una vez por semana durante las 8 semanas de tratamiento. Finalmente, se realizó un promedio del consumo de azúcares de las 8 semanas. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar.

Para estimar el consumo de compuestos polifenólicos de los animales de experimentación, se tomaron en cuenta las cantidades reportadas de dichos compuestos en el higo y sus extractos por la técnica de Folin-Cioacaltea.

Posteriormente se realizó el cálculo del contenido en la dieta ingerida y en el extracto administrado a los animales de experimentación, de acuerdo con el registro de consumo de alimento realizado una vez por semana durante las 8 semanas de tratamiento y, para el caso del extracto, de la cantidad administrada de acuerdo a la concentración correspondiente al grupo experimental (400 y 800 mg/kg peso). Finalmente, se realizó un promedio del consumo de azúcares de las 8 semanas. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar.

### **5.2.6 Cuantificación de triglicéridos en heces**

La cuantificación de TG en heces se realizó por el método de Folch y colaboradores (1957). Las muestras de heces de los 7 grupos de ratas se secaron durante 12 h a temperatura constante de 55 °C. Una vez secas, se molieron en un mortero. Se colocaron 200 mg de muestra en un tubo Eppendorf, se agregaron 350  $\mu$ L de KOH en etanol (2 partes de etanol por 1 parte de KOH al 30%) y se incubaron 12 h a 55 °C. Posteriormente, la muestra se llevó a un volumen de 1000  $\mu$ L con etanol:agua (1:1) y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min, el sobrenadante se cambió a otro tubo y se llevó a un volumen final de 1200  $\mu$ L con etanol:agua (1:1). En un nuevo tubo se colocó una alícuota de 200  $\mu$ L y se agregaron 215  $\mu$ L de  $MgCl_2$  1M, se agitó con vórtex nuevamente, se dejó sobre hielo durante 10 min y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. Se recuperó el sobrenadante para la cuantificación de TG, la cual se realizó utilizando un kit (Spinnreact ®, México) empleando el método enzimático, leyendo su absorbancia en el espectrofotómetro a 505 nm. La cuantificación se realizó por medio de una ecuación tomando en cuenta el blanco de muestra y el patrón (200 mg/dL), y los resultados se expresaron como mg de TG por g de muestra seca.

### **5.2.7 Evaluación microscópica del grado de hipertrofia en adipocitos**

Se evaluó la hipertrofia de adipocitos en el tejido adiposo abdominal. Se cortaron 3 muestras de tejido de 1 cm x 1 cm de grosor, posteriormente se colocaron en una solución de formalina al 10% para su evaluación histopatológica. Los tejidos se fijaron en parafina, se realizaron cortes con un grosor de 5  $\mu$ m por sección y se

sometieron a tinción con H&E para el examen microscópico. Se tomaron 5 imágenes por animal a 10X y 40X.

Después de realizar la evaluación microscópica de las muestras de tejido adiposo visceral de los animales de experimentación, las imágenes se analizaron en el software ImageJ 1.38 para obtener datos del número y tamaño de los adipocitos. Los resultados se reportaron como la media el error estándar por grupo de experimentación y se normalizaron por gramo de tejido para expresarse como área de célula y peso del tejido(g) /área de célula ( $\mu\text{m}^2$ ).

### **5.2.8 Medición de parámetros bioquímicos en suero**

Al momento del sacrificio, la sangre se colectó en tubos heparinizados; posteriormente, se centrifugaron 10 min a 10,000 rpm para la obtención del suero, el cual se colocó en varias alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  cada una y se congelaron a  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  hasta el día de las determinaciones bioquímicas (Oyedeki *et al.*, 2018).

#### **5.2.8.1 Perfil de lípidos**

Se determinó la concentración de TG, colesterol total y HDL en suero empleando kits de la marca Spinreact ®. Las muestras se procesaron de acuerdo a las instrucciones de uso proporcionadas por el fabricante. Los resultados se expresaron como mg/dL.

#### **5.2.8.2 Enzimas de función hepática**

Las enzimas hepáticas aspartato aminotransferasa (ALT) y alanina aminotransferasa (AST) se determinaron en suero empleando un kit de la marca Spinreact ®. Los resultados se expresaron como

#### **5.2.8.3 Cuantificación de insulina por Elisa**

Las concentraciones de insulina en suero se determinaron por ensayo de microelisa con el kit de insulina EZRMI-13K de Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, DEU), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados se expresan como ng/mL.

### 5.2.9 Cuantificación de glucógeno en hígado

La obtención de glucógeno hepático se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Good y colaboradores (1993). En un tubo de ensaye se colocaron 200 mg de hígado, se añadieron 200  $\mu$ L de hidróxido de potasio al 30% a cada muestra y se colocó el tubo a baño maría durante 20 min. La muestra se dejó enfriar y se agregó 1 mL de etanol, se colocó en hielo hasta que el sedimento se precipitó. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y se retiró el sobrenadante. Al residuo se le agregaron 200  $\mu$ L de hidróxido de potasio al 15% y se agitó con vórtex; se añadió 1 mL de etanol y se enfrió en hielo. El precipitado formado de glucógeno se separó a través de centrifugación con las condiciones antes mencionadas y se removió el sobrenadante. Al tubo con el precipitado de glucógeno se le agregaron 2 mL de agua destilada, se dispersó el precipitado uniformemente y se agregaron 10 mL de reactivo de antrona (2 g de antrona en 1 L de ácido sulfúrico al 95 % (v/v)). Se preparó un blanco (2 mL de agua destilada con 10 mL de reactivo antrona) y un estándar (2 mL de solución estándar de glucosa y 10 mL de reactivo antrona), los cuales recibieron el mismo tratamiento que la muestra. Finalmente, todos los tubos se colocaron a baño maría durante 15 min y luego se temperaron sumergiéndolos en agua fría. Se transfirieron 200  $\mu$ L a una microplaca y se leyó la absorbancia a 620 nm.

La cantidad de glucógeno en la muestra se calculó con la siguiente fórmula (Roe y Dailey, 1966):

$$\frac{DU}{DS} \times 0.1 \times 10 \times \frac{100}{\text{g de tejido}} \times 0.9 = \frac{\text{mg glucógeno}}{100 \text{ g de tejido}}$$

Dónde

DU. Densidad óptica de la muestra

DS. Densidad óptica del estándar

0.1 mg de glucosa en 2 mL de solución

10. Factor de dilución

0.9. Factor para convertir el valor de glucosa a valor de glucógeno

### **5.2.10 Cuantificación de triglicéridos en hígado**

Para la cuantificación de TG en hígado se utilizó el método de Folch y colaboradores (1957), previamente descrito. Los resultados se expresaron como mg de TG por gramo de tejido.

### **5.2.11 Análisis histológico del tejido hepático**

Los tejidos en formalina se embebieron en parafina, se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con la solución de H&E. Las muestras de tejido hepático se observaron y fotografiaron bajo microscopio a 10X y 40X, analizando 5 imágenes por corte por animal. El grado de lesiones histopatológicas en hígado se determinó semicuantitativamente usando la clasificación de Brunt: grado 0, sin grasa; grado 1 hepatocitos grasos ocupando <33 % del parénquima hepático; grado 2 hepatocitos grasos ocupando del 33-66 % del parénquima hepático; y grado 3, hepatocitos grasos ocupando >66 % del parénquima hepático (Brunt *et al.*, 1999).

### **5.2.12 Determinaciones antioxidantes en hígado**

#### **5.2.12.1 Preparación de homogenados citosólicos**

Para las determinaciones de glutatión S-transferasa (GST) en hígado se pesaron 0.5 g de órgano en un tubo cónico Falcon de 15 mL, se añadieron 3 mL de solución amortiguadora Tris/Sacarosa 0.35 M, pH 7 (Anexo 1) y se homogenizaron con la ayuda de un polytrón (Kinematica, CHE) hasta no ver residuos de tejido. Los homogenados se centrifugaron a 8,000 g por 20 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada. Se recuperó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se transfirió a una celda de ultracentrífuga (Beckman Optima L90K, Beckman, USA). Los tubos se ultracentrifugaron a 4 °C a 100,000 g por 1 h. El sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf, dividiéndolo en tres partes, los cuales se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

Para las determinaciones enzimáticas en hígado, se pesaron 0.5 g de órgano en un tubo cónico Falcon de 15 mL, se añadieron 5 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio 50 mM pH 6.5 (Anexo 2), posteriormente se homogenizaron con un polytrón (Kinematica, CHE). Los homogenados se centrifugaron a 8,000 g durante 15 min a 4 °C en una centrífuga (Universal 32 R, Hettich Zentrifugen, DEU). El sobrenadante se colocó en tubos Eppendorf, dividiéndolo en tres partes, los cuales se almacenaron a -70° C hasta su análisis.

#### **5.2.12.2 Cuantificación de proteínas en homogenados citosólicos**

La cuantificación de proteínas de los homogenados citosólicos se realizó por el método del ácido bicinconínico (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 µg/mL 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 3), de acuerdo con las determinaciones antioxidantes que se describen a continuación. Posteriormente, se colocaron 50 µL del citosol diluido en placas de 96 pozos, se agregaron 250 µL de la solución de trabajo para la determinación de proteína (Anexo 4) y se incubaron por una hora a temperatura ambiente o 30 min a 37 °C. Después de este tiempo, la absorbancia de las muestras se midió a una  $\lambda$  de 562 nm en un lector de microplacas modelo Varioskan Flash, marca Thermo Scientific. Los resultados se expresaron en µg/mL.

#### **5.2.12.3 Determinación de la actividad de catalasa (CAT)**

La actividad de CAT se determinó por el método de Aebi (1984). Se realizaron diluciones apropiadas de los citosoles con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7. Se ajustó la concentración de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 mM (Anexo 5) realizando una lectura de la absorbancia a 240 nm en el

espectrofotómetro (Varioskan Flash) y se calculó la concentración con la siguiente fórmula:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] \text{ mM} = A_{240}/0.0436$$

Donde:

- $A_{240}$ : es la absorbancia  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 mM a 240 nm.
- 0.0436: es el coeficiente de extinción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (mM/cm)

Para esta determinación, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: en una celda de cuarzo se colocaron 1700  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7 (Anexo 6), 300  $\mu\text{L}$  de citosol diluido y 1000  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 mM. Las muestras se midieron inmediatamente en el espectrofotómetro, ya que la reacción comienza al agregarse el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y se monitoreó el decremento 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm a 25 °C.

Nota: los citosoles se analizaron dentro de 5 a 10 min de su dilución.

La actividad de CAT se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$[\text{Actividad CAT}] = (\Delta\text{abs}/\text{min}) (\text{vol total})(\text{factor dilución}) / ((\text{vol muestra})(\text{min})(0.0436))$$

Donde:

- Vol total = 3 mL
- Vol muestra = 0.30 mL
- Minuto = 0.5 min
- 0.0436 = coeficiente de extinción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (mM/cm).

Los resultados se expresaron en unidades/mg de proteína.

#### 5.2.12.4 Determinación de la actividad de glutatión S-transferasa (GST): CDNB

El método se basa en la reacción catalizada por la enzima GST entre GSH y el sustrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenceno), el cual tiene un amplio intervalo para detectar las diferentes isoenzimas. Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de CDNB-GSH conjugado por minuto (Habig *et al.*, 1974).

Para la lectura de las muestras se prepararon diluciones apropiadas de los citosoles (iguales a las diluciones utilizadas en determinación de proteína y cuyo cambio en la absorbancia del min 2 y min 1 se encontró en intervalos de valores de 0.05 a 0.09). Se tomaron 50  $\mu$ L de estas diluciones y se colocaron en placas de 96 pozos, se agregaron 100  $\mu$ L de la solución de trabajo de GSH 3 mM (Anexo 7) e inmediatamente se adicionaron 150  $\mu$ L de la solución de trabajo CDNB de 2 mM (Anexo 8) en cada pozo. La formación del conjugado CDNB-GSH por la enzima de GST se monitoreó inmediatamente por espectrofotometría a una  $\lambda$  de 340 nm a 25 °C en un periodo de 2 min de reacción en el lector de microplacas modelo Varioskan Flash, obteniendo lecturas cada 20 segundos. Los resultados se expresaron en nmol de producto formado por mg de proteína por minuto, de acuerdo a la siguiente ecuación:

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

Donde:

Abs min 2: es la absorbancia a 340 nm en el minuto 2 de reacción.

Abs min1: es la 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 ( $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### **5.2.12.5 Determinación de la concentración del cofactor glutatión reducido (GSH)**

La concentración de GSH 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 interpolando la absorbancia de las muestras en la curva de calibración que se realizó previamente de una concentración 0 a 100  $\mu\text{M}$ .

Para elaborar la curva estándar de GSH, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: Solución amortiguadora Tris-EDTA pH 8.2 (Anexo 9) solución de trabajo inicial para la curva estándar de GSH (Anexo 10), metanol y solución de DTNB 2.46 mM (Anexo 11). La reacción se inició con la adición del último reactivo y se incubó por 5 min. Las muestras se midieron inmediatamente por espectrofotometría a una  $\lambda$  de 412 nm a 25 °C en el lector de microplacas modelo Varioskan Flash. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína.

Para las muestras se emplearon los citosoles concentrados (sin diluir), a los cuales se les precipitó previamente la proteína con el siguiente procedimiento: En un tubo Eppendorf se adicionaron 120  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 150  $\mu\text{L}$  de citosol concentrado y 30  $\mu\text{L}$  de ácido tricloro acético (TCA) al 20 %, a continuación, se incubaron por 30 min a 4 °C y luego se centrifugaron a 8000 g por 5 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en nuevos tubos Eppendorf. De este nuevo tubo se tomaron 50  $\mu\text{L}$  para colocarse en placas de 96 pozos. Se adicionaron los reactivos en el siguiente orden: 150  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora Tris-EDTA pH 8.2, 80  $\mu\text{L}$  de metanol y 20  $\mu\text{L}$  de DTNB; se incubaron por 5 min y se midieron inmediatamente con las mismas condiciones que la curva de calibración.

### **5.3 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en los perfiles fitoquímicos se expresaron como medias  $\pm$  desviaciones estándar (DE) y se empleó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar los resultados. Los datos del estudio *in vivo* se expresaron como la media

± desviación estándar (DE).; seguido de una prueba de Dunnett para la comparación de medias ( $\alpha=0.05$ ) respecto al grupo control DAGF II.

La asociación cuantitativa entre parámetros bioquímicos y la capacidad antioxidante del higo y sus extractos se realizó a través de dos tipos de análisis multivariado: mínimos cuadrados parciales o PLS, por sus siglas en inglés, y regresión lineal múltiple o LMS, por sus siglas en inglés.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó a través del programa R, versión 3.6.0.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Caracterización del fruto del higo y de sus extractos

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el higo deshidratado se considera como un alimento mínimamente procesado, el cual se ha alterado sin agregarle ninguna sustancia externa, con la finalidad de alargar su vida de anaquel. Dicha modificación tiene implícitos algunos beneficios como son: una mayor densidad de nutrimentos, mayor contenido de fibra y una cantidad de fenoles significativamente mayor en comparación con el fruto fresco (Vinson *et al.*, 2005) y éstos se concentran principalmente en la piel, después de la deshidratación (Vallejo *et al.*, 2012). De manera que, con la finalidad de conocer el contenido de macronutrimentos del higo y el perfil fitoquímico del higo y sus extractos, se realizó el análisis proximal del fruto y la cuantificación de compuestos fitoquímicos en el fruto y sus extractos.

Para el análisis proximal se tomaron muestras independientes de cada una de las tres cajas de higo empleadas durante el experimento, y cada muestra se analizó por triplicado bajo las metodologías de la AOAC (1996). Prueba de humedad (AOAC 925.10), cenizas (AOAC 942.05), grasa (AOAC 920.39), proteína (920.87) y fibra cruda (AOAC 91.42). La cantidad de hidratos de carbono se obtuvo al restar a 100 % el porcentaje correspondiente a cenizas, grasa, proteínas y fibra.

La caracterización proximal del higo deshidratado (Cuadro 12) nos indica que los carbohidratos representan el macronutriente más abundante ( $65.9 \pm 1.1\%$ ); así mismo, contiene  $4.9 \pm 0.6\%$  de fibra, por lo cual el higo se considera una buena fuente de dicho nutrimento (Tucker & Thomas., 2009). Los resultados obtenidos en el análisis proximal son similares a los citados por Menchú y colaboradores (2012) en cuanto a humedad e hidratos de carbono; sin embargo, la cantidad de grasa es 4 veces mayor en este higo, la de proteína es 1.3 veces mayor, mientras que la fibra es 2 veces menor.

**Cuadro 12.** Caracterización proximal de higo deshidratado

<b>Parámetro (%)</b>	<b>Resultados</b>
Humedad	23.1 ± 0.6
Proteínas	4.2 ± 0.2
Lípidos	3.6 ± 0.6
Cenizas	3.2 ± 0.2
Fibra cruda	4.9 ± 0.6
Hidratos de carbono	65.9 ± 1.1

Datos expresados como la media ± desviación estándar. n = 3

Posterior al análisis proximal se obtuvieron los extractos de etanol, diclorometano y hexano, a través de una extracción fraccionada por maceración. Como se puede observar en el Cuadro 13, el rendimiento al moler el fruto separado del solvente fue menor, por lo cual todos los extractos se prepararon moliendo el fruto junto con el solvente. Así mismo, se eliminó el extracto de diclorometano debido a su bajo rendimiento y a las dificultades operacionales que implicaría en la producción para el modelo animal. Debido a que el extracto de hexano tuvo un bajo rendimiento, comparado con el extracto de etanol, los recursos disponibles en el laboratorio fueron insuficientes para extraer la cantidad suficiente para administrar dos dosis a los animales de experimentación durante todo el experimento, por lo cual se decidió administrar sólo la dosis mayor (800 mg/kg de peso).

**Cuadro 13.** Rendimiento de extractos de higo

	<b>Extracto de hexano</b>	<b>Extracto de diclorometano</b>	<b>Extracto de etanol</b>
Método 1 (%)	1.20 ± 0.12	0.25 ± 0.03	34.0 ± 3.4
Método 2 (%)	1.74 ± 0.02	-	54.6 ± 1.4

Datos expresados como la media ± desviación estándar. N = 3

Método 1: Molienda del fruto separado del solvente en una proporción 1:3

Método 2: Molienda del fruto junto con el solvente en una proporción 1:3

Se evaluó el contenido de azúcares reductores presentes en las muestras (Cuadro 14). De acuerdo con esta determinación el higo deshidratado contiene  $52.02 \pm 2.98$  g equivalentes de fructosa por 100 g de muestra, es decir, alrededor del 50% del fruto está constituido por azúcares simples; mientras que, el extracto de etanol contiene  $76.62 \pm 4.74$  g equivalentes de fructosa por 100 g de muestra. La razón de esta mayor concentración de azúcares se debe a que la glucosa y otros monosacáridos son altamente solubles en agua y etanol (Alves *et al.*, 2007) y fueron arrastrados y concentrados en el extracto hidroalcohólico. Por otro lado, debido a que los azúcares no son miscibles en el hexano por su polaridad (Doughari, 2012), el extracto de hexano contiene la menor cantidad de fructosa respecto a las otras muestras.

**Cuadro 14.** Contenido de azúcares reductores en higo deshidratado y sus extractos.

Muestra	g eq de fructosa/100 g muestra seca
Extracto de etanol	$76.62 \pm 4.74$
Extracto de hexano	$0.47 \pm 0.04$
Higo deshidratado	$52.02 \pm 2.98$

Datos expresados como la media  $\pm$  desviación estándar, n= 3

Para conocer los compuestos fitoquímicos presentes en el higo y sus extractos, éstos se cuantificaron por métodos colorimétricos (Cuadro 15).

La comparación entre el fruto y sus extractos muestra que el higo deshidratado contiene mayor cantidad de fenoles totales y flavonoides respecto a los extractos de etanol y hexano, de hasta 4.5 y 1177 veces más, respectivamente. En cuanto a las antocianinas, éstas se encontraron en concentraciones muy bajas, siendo ligeramente mayor en el extracto de etanol que en las otras dos muestras. Debido al carácter polar de estos compuestos, el extracto de hexano extrajo una baja concentración de dichos fitoquímicos.

Respecto a los resultados reportados por otros autores, la cantidad de fenoles totales en el fruto deshidratado ( $13.3 \pm 1.5\%$  humedad) es 12 veces superior a lo

reportado por Solomon y colaboradores (2008) para un higo fresco de la variedad turca, y los flavonoides son 9.5 veces más altos; esto debido a que en dicha investigación se evaluó el fruto fresco. En cuanto a antocianinas, éstas fueron 7 veces menores, lo cual puede deberse a la variedad, o bien, a que es común que se utilicen los higos verdes para someterlos a secado solar (Vallejo *et al.*, 2012), y la concentración de antocianinas aumenta durante la maduración, coincidiendo con un aumento correspondiente en el porcentaje de coloración oscura (Liu *et al.*, 2016).

Por otro lado, los valores de fenoles totales y flavonoides del extracto de etanol son menores que los reportados para un extracto etanólico elaborado por Belguit y colaboradores (2016), quienes refieren una cantidad de 1030 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de higo y 515 mg equivalentes de ácido cafeico por 100 g de higo. Esto podría atribuirse a que dichos autores utilizaron una mayor temperatura de extracción, y se conoce que a una mayor temperatura (45-70 °C) es posible extraer mayor cantidad de compuestos polifenólicos (Pandey & Tripathi, 2014).

Aunque no se encontraron referencias que mencionen la caracterización de un extracto de hexano del fruto del higo, la bibliografía reporta la identificación de catorce tipos de fitoesteroles en el fruto (Jeong & Lachance, 2001). En este sentido, se cuantificó el contenido de fitoesteroles totales, resultando que el extracto de hexano tiene  $6.11 \pm 0.56$  mg equivalentes de  $\beta$ -sitoesterol por 100 g de fruto, 11 veces más que el higo deshidratado. En el extracto de etanol, los fitoesteroles se detectaron a muy bajas concentraciones.

Se conoce que tanto el higo fresco como el deshidratado contienen carotenoides (Arvaniti *et al.*, 2019). En las muestras de higo deshidratado se observó que la concentración de carotenoides en el higo fue de 0.27 mg eq  $\beta$ -caroteno/100 g de higo; mientras que, el extracto de hexano tuvo una concentración de carotenoides 6 veces mayor.

En general, ambos extractos cumplieron con el objetivo de concentrar los compuestos bioactivos del fruto: los liposolubles en el extracto de hexano y los hidrosolubles en el extracto de etanol.

A diferencia de Vallejo y colaboradores (2012), en el presente estudio fue posible cuantificar proantocianidinas no extraíbles en el higo deshidratado, resultando una cantidad de 1.15 mg por gramo de fruto, la cual fue cuatro veces menor que la reportada por Arranz y colaboradores (2010), quienes reportan una cantidad de 5.14 mg/g en las frutas en general, entre ellas el higo.

**Cuadro 15.** Cuantificación de compuestos fitoquímicos totales de higo deshidratado y sus extractos.

Compuestos fitoquímicos	Extracto de etanol	Extracto de hexano	Higo deshidratado (13% humedad)
Fenoles totales (mg eq AG/100 g de higo)	153.08 ± 8.13 <sup>b</sup>	0.59 ± 0.05 <sup>c</sup>	694.68 ± 66.85 <sup>a</sup>
Antocianinas monoméricas (mg eq cin-3-glu/100 g de higo)	2.29 ± 0.72 <sup>a</sup>	ND	0.17 ± 0.07 <sup>b</sup>
Flavonoides (mg eq de rutina/100 g de higo)	17.22 ± 0.82 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.02 <sup>c</sup>	34.45 ± 1.60 <sup>a</sup>
Proantocianidinas no extraíbles (mg eq de CA/100 g de higo)	NC	NC	115 ± 0.09
Fitoesteroles (mg eq β-sit /100 g de higo)	0.17 ± 0.02 <sup>c</sup>	6.11 ± 0.56 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.11 <sup>b</sup>
Carotenoides (mg eq β-caroteno/100 g de higo)	ND	1.55 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.01 <sup>b</sup>

Datos expresados como la media ± desviación estándar, n= 3. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) por la prueba Tukey.

NC: no cuantificado, ND: no detectado, AG: ácido gálico, Cin-3-glu: Cianidina-3-glucósido, CA: Catequina, β-sit: β-sitoesterol.

Una vez que se identificaron las familias de compuestos fitoquímicos, se realizó un análisis a través de UPLC-MS-TQ-S a los extractos de etanol (Cuadro 16) y de hexano (Cuadro 17). En el extracto de etanol se detectaron compuestos polifenólicos pertenecientes a la familia de ácidos fenólicos y flavonoides, siendo el ácido shikímico el ácido fenólico mayoritario en el extracto de etanol ( $7.83 \pm 1.81$  µg/g de fruto), y la rutina el flavonoide que se encontró en mayor concentración ( $8.17 \pm 0.17$  µg/g de fruto). Por su parte, Kamiloglu & Capanoglu (2015) también reportan a la rutina como el flavonoide mayoritario del higo deshidratado y el ácido cumárico como el ácido fenólico mayoritario. Dicha cuantificación se realizó a través de un análisis por HPLC-PDA.

Respecto al extracto de hexano, podemos observar que el  $\alpha$ -caroteno es el carotenoide mayoritario ( $312.48 \pm 97.32 \mu\text{g/g}$  de fruto) y, aunque en menor cantidad, también contiene  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina. En la naturaleza, lo más común es encontrar a todos estos compuestos de la misma familia juntos en la misma especie (Arscott, 2013).

A diferencia de otros vegetales, como la semilla de girasol, que sólo contiene un tipo de tocoferoles, en el higo se cuantificaron tres tipos: el  $\alpha$ , el  $\gamma$  y el  $\delta$ -tocoferol, de los cuales, el mayoritario es el  $\delta$ -tocoferol; caso contrario de la mayoría de las especies vegetales, en las cuales la forma más común es el  $\gamma$ -tocoferol; sin embargo, la forma activa de dicha familia es el  $\alpha$ -tocoferol (Da Acosta *et al.*, 2012).

**Cuadro 16.** Caracterización del extracto de etanol por UPLC-MS-TQ-S

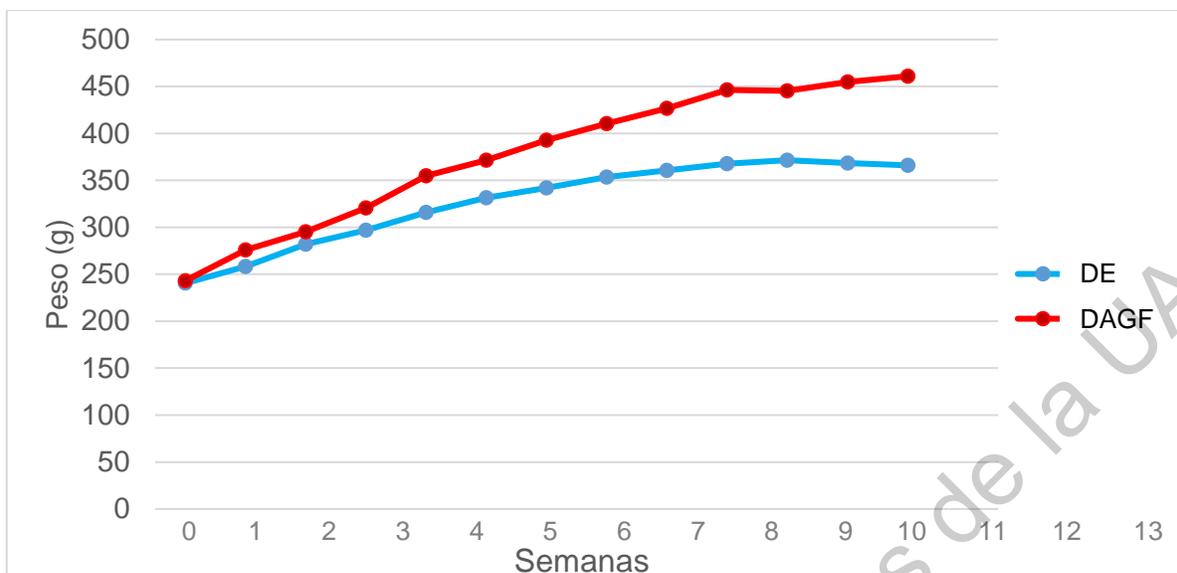
Compuesto	Concentración ( $\mu\text{g/g}$ de fruto deshidratado)	Masa (m/z)	Aductos
<i>Ácidos fenólicos</i>			
Ácido benzoico	$0.35 \pm 0.05$	154	-H
Ácido 4-hidroxibenzoico	$0.07 \pm 0.01$	138	-H
Ácido trans-cinámico	$0.41 \pm 0.02$	148	-H
Ácido protocatecoico	$6.21 \pm 0.03$	154	-H
Ácido coumárico	$6.25 \pm 0.24$	164	-H
Ácido shikímico	$7.83 \pm 1.81$	174	-H
Ácido quínico	$0.20 \pm 0.02$	192	-H
Ácido ferúlico	$0.53 \pm 0.05$	194	-H
Ácido sinápico	$0.67 \pm 0.14$	224	-H
Ácido elágico	$0.17 \pm 0.11$	302	-H
Ácido rosmarínico	$0.07 \pm 0.00$	360	-H
Ácido clorogénico	$0.17 \pm 0.01$	354	-H
<i>Flavonoides</i>			
Luteolina	$0.41 \pm 0.01$	285	-H
Kaempferol	$0.04 \pm 0.00$	593	-H
Quercetina	$0.53 \pm 0.09$	302	-H
Rutina	$8.17 \pm 0.17$	610	-H
Miricetina	0.22	480	-H
Galato de (-) epicatequina	0.19	306	-H
Neohesperidina	0.09	609	-H
<i>Otros fenoles</i>			
2,5 dihidrobenzaldehído	$6.21 \pm 0.03$	256	-H

**Cuadro 17.** Caracterización del extracto de hexano por UPLC-MS-TQ-S

Compuesto	Concentración ( $\mu\text{g/g}$ de fruto deshidratado)	Masa (m/z)	Aductos
<i>Carotenoides</i>			
$\beta$ -Caroteno	$0.97 \pm 0.03$	536	+H
$\alpha$ -Caroteno	$312.48 \pm 97.32$	537	+H
Zeaxantina	$0.82 \pm 0.16$	568	+H
$\beta$ -Criptoxantina	$2.77 \pm 0.31$	553	+H
<i>Tocoferoles</i>			
$\alpha$ -Tocoferol	$0.17 \pm 0.01$	430	+H
$\gamma$ -Tocoferol	$0.46 \pm 0.29$	416	+H
$\delta$ -Tocoferol	$0.83 \pm 0.77$	402	+H

## 6.2 Evaluación del efecto del fruto de *Ficus carica* y sus extractos sobre la esteatosis hepática en un modelo in vivo de obesidad

Después de caracterizar el fruto del higo y sus extractos, se evaluó su efecto empleando un modelo animal, para lo cual se emplearon 56 ratas Wistar (200-230 g de peso) y se formaron dos grupos: control sano (n=8), al cual se le administró alimento estándar; y grupo obeso (n=48), que recibió dieta alta en grasa (22%) y fructosa (20%) con la finalidad de inducirle obesidad, ya que el exceso de peso corporal es el factor de riesgo mayormente asociado a la esteatosis hepática (Buzzeti *et al.*, 2016). En modelos animales previamente montados en el laboratorio bajo este esquema de DAGF se ha observado que, una vez que existe diferencia de más del 20% en el peso de los animales obesos respecto a los sanos, se desarrolla esteatosis hepática (Rubio-Rodríguez, 2015; Rangel-García, 2018). Transcurridas 13 semanas, el peso de los animales alimentados con DAGF fue 21% más alto respecto al de aquellos alimentados con dieta estándar (Figura 4), debido a que la densidad energética de la DAGF es un 28% mayor que la dieta estándar.

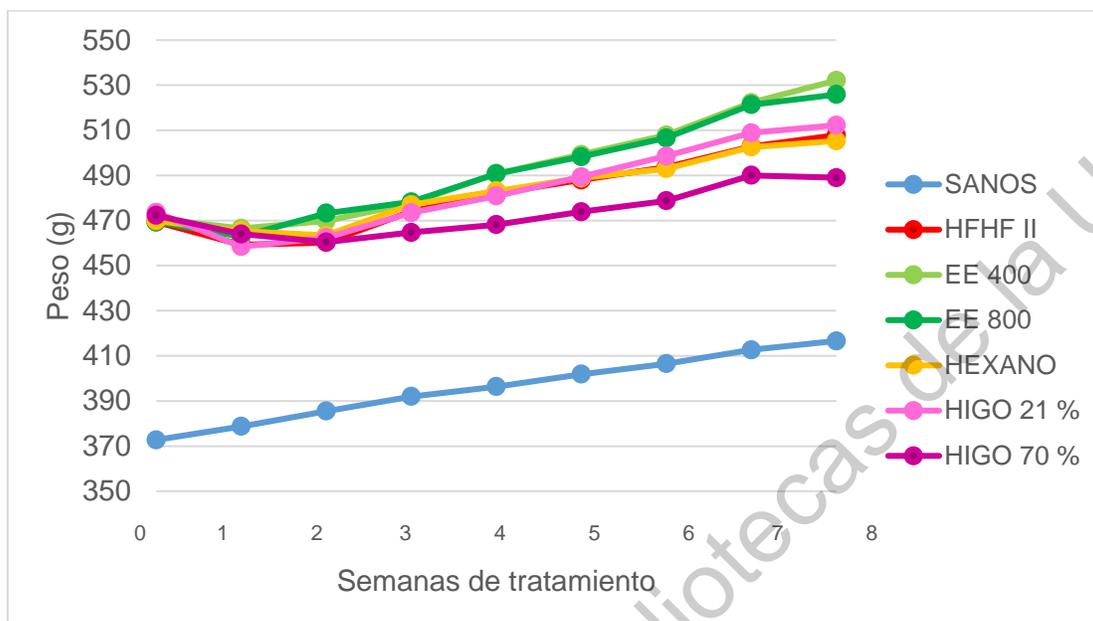


**Figura 4.** Peso corporal de animales alimentados con dieta alta en grasa y fructosa (DAGF) y dieta estándar (DE).

### 6.2.1 Efectos del consumo de higo y sus extractos sobre el peso corporal de los animales de experimentación

Una vez que se indujo obesidad a los animales de experimentación, las ratas del grupo obeso se aleatorizaron para formar 6 nuevos grupos: control obeso o DAGF (n=8 ratas), extracto de etanol a una concentración de 400 mg/kg (n=8), extracto de etanol a una concentración de 800 mg/kg (n=8), extracto de hexano a una concentración de 800 mg/kg (n=8), higo al 21% (n=7) e higo al 70% (n=7); estos dos últimos grupos se redujeron con la finalidad de mantener la homogeneidad en los pesos de los grupos de tratamiento, ya que algunos animales aumentaron hasta 100 g más de peso, respecto a los demás, y para efectos de no tener sesgo en la asociación de los posibles efectos de los tratamientos sobre el peso corporal de los animales, se consideraron sólo los animales con una variación de 10% de peso entre ellos. A excepción del grupo alimentado con dieta estándar, el resto de los grupos se alimentaron con dieta alta en grasa (15%) y la fructosa (30%) se administró en el agua de beber, de acuerdo con el modelo reportado por otros autores (Sarayu *et al.*, 2019; Wenfeng *et al.*, 2019). Lo anterior con la finalidad de poder incorporar a la dieta sólida los tratamientos de higo al 21 y al 70%; a esta

dieta se le nombró como DAGF II. Los tratamientos se administraron por 8 semanas, durante las cuales se registró el aumento de peso (Figura 5).



**Figura 5.** Peso corporal de peso de animales alimentados con DAGF II y tratados con higo y extractos de etanol y hexano base de higo en diferentes concentraciones. DE: dieta estándar. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. EE: extracto etanólico.

Como se puede observar, el peso de los animales tratados con el extracto etanólico (400 y 800 mg/kg) fue mayor, seguido del peso del grupo tratado con higo al 21%, del grupo DAGF II y del grupo hexano; mientras que, los animales con menor ganancia de peso respecto a los demás tratamientos fueron los del grupo alimentado con higo al 70%. Como se esperaba, los animales tratados con dieta estándar tuvieron un peso normal, de acuerdo a la curva de crecimiento de Harlan. Como se indicó en la sección de metodología, en el presente trabajo se prepararon dietas isocalóricas para todos los tratamientos; sin embargo, el patrón de consumo de los animales fue distinto entre grupos (Cuadro 18). Los animales alimentados con higo al 70% consumieron menor cantidad de kilocalorías por día, motivo por el cual el aumento de peso fue menor respecto a los demás tratamientos. La reducción en el consumo de alimento puede deberse a que los higos tienen un alto contenido de carbohidratos, especialmente glucosa y fructosa, que tiene impacto sobre la saciedad y se asocian con una reducción en el apetito e ingesta de alimento (El-

Shobaki *et al.*, 2010). En todos los tratamientos, la ingesta calórica proveniente de azúcares simples excedió del 10% recomendado por la OMS (WHO, 2015), por lo cual se esperaba que los animales desarrollaran obesidad y sus comorbilidades.

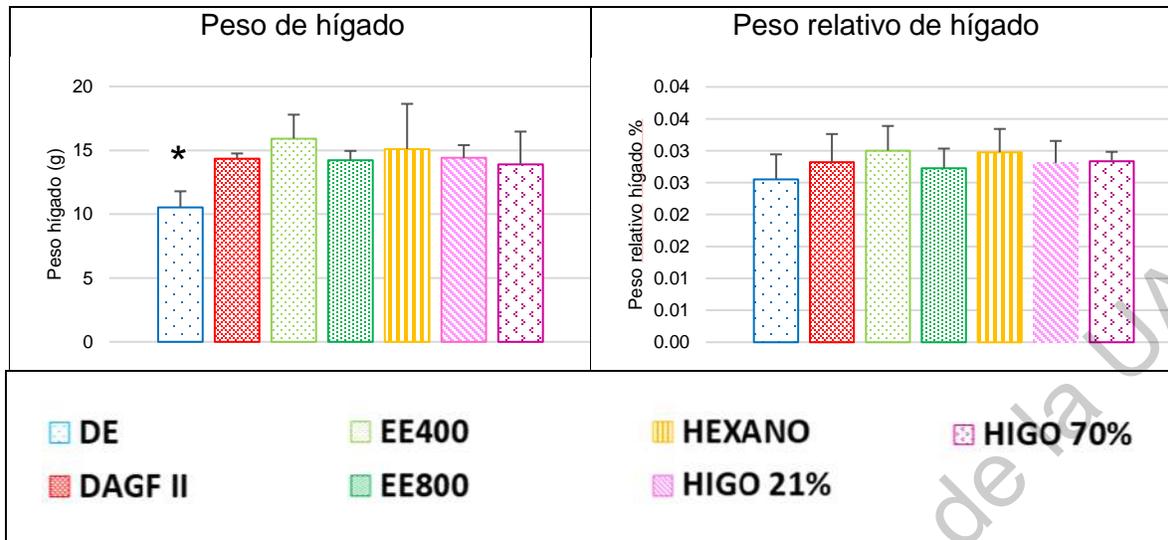
**Cuadro 18.** Consumo de energía, azúcares simples y compuestos polifenólicos de los animales de experimentación.

Tratamiento	Consumo diario de energía (kcal/día)	Consumo diario de azúcares simples (g/día)	Ingesta calórica proveniente de azúcares simples (%)	Consumo de compuestos polifenólicos (mg/día)
DE	76.9 ± 9.6	0.1	0.4	-
DAGF II	89.2 ± 12.6	8.4	38	-
EE 400	86.9 ± 5.1	6.9	32	101.8 ± 4.6
EE 800	82.2 ± 6.9	7.4	36	204.6 ± 10.5
Hexano	89.1 ± 5.8	8.9	40	-
Higo 21%	81.7 ± 13.8	8.1	40	35.4 ± 5.1
Higo 70%	72.3 ± 13.8	10.5	58	119.7 ± 11.1

DE: dieta estándar. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. EE: extracto etanólico.

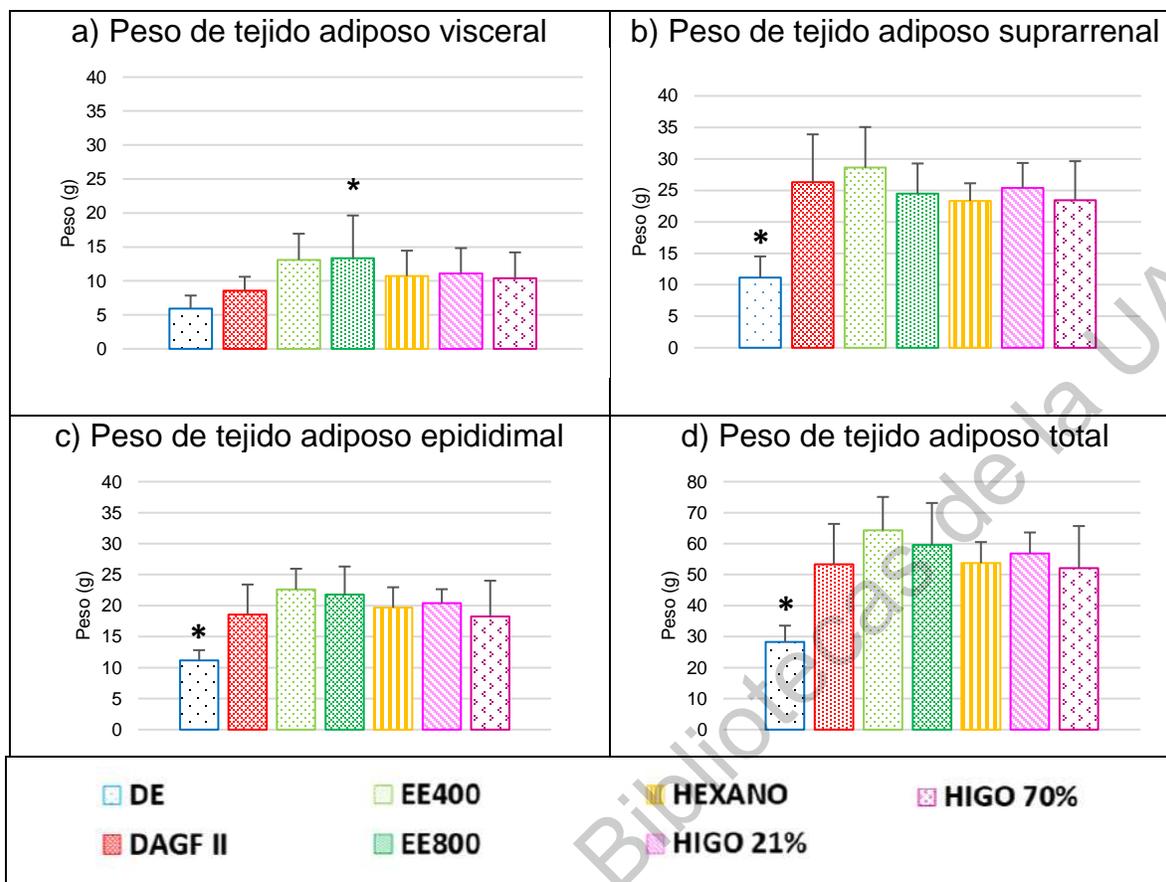
### 6.2.2 Efecto del consumo del higo y sus extractos sobre el peso de hígado y tejido adiposo de los animales de experimentación

Una de las características que puede aparecer en las personas y animales que desarrollan NAFLD es la hepatomegalia (Angulo & Lindor, 2005), por lo cual, posterior al sacrificio, se pesaron los hígados, se compararon sus pesos entre grupos y, a su vez, los pesos de los hígados contra el peso corporal de los animales de experimentación (peso relativo) (Figura 6). Como se puede observar, el peso del hígado de los animales DE fue menor y estadísticamente significativo respecto al peso de los animales del grupo DAGF II ( $p=0.003$ ). También se puede apreciar que, de los animales que recibieron tratamiento, los hígados del grupo EE800 presentaron menor peso relativo de hígado, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa, dada la baja densidad de la grasa y tomando en cuenta que el peso de los hígados murinos es menor, biológicamente podría significar un cambio positivo.



**Figura 6.** Peso de hígado (total y relativo) de los animales de experimentación. \* indica diferencia estadística significativa ( $p = 0.004$ ) vs el grupo DAGF II, por la prueba de Dunnett. DE: dieta estándar. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. EE: extracto etanólico.

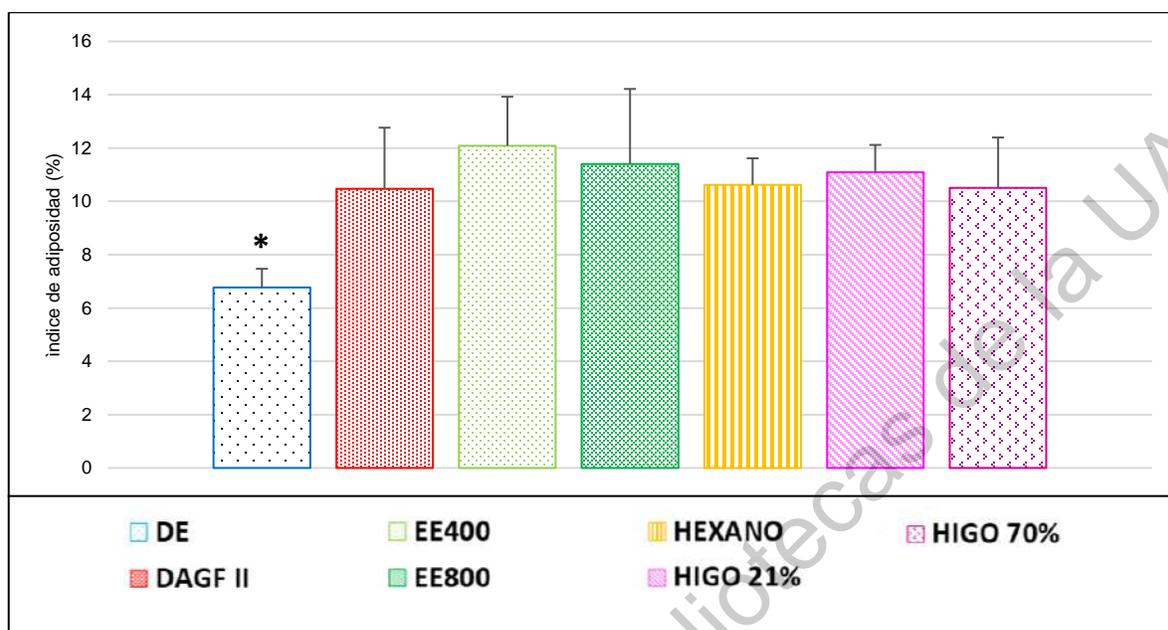
La obesidad es un factor de riesgo que está estrechamente asociado con el desarrollo de la NAFLD (Nassir *et al.*, 2015). En estudios experimentales con ratas, el índice de adiposidad se ha usado para medir el grado de adiposidad, ya que ésta tiende a aumentar gradualmente con la obesidad (Leopoldo *et al.*, 2016). Como se muestra en la Figura 7, el peso del tejido adiposo visceral del grupo EE800 fue el único significativamente mayor respecto al del grupo DAGF II. Por el contrario, no se observó diferencia significativa en el peso de los tejidos adiposos suprarrenal y epididimal, y del tejido adiposo total de los animales con respecto a los del grupo DAGF II. Los valores de dichos parámetros de los animales del grupo sano fueron los únicos que mostraron una diferencia significativa respecto a los del grupo DAGF II.



**Figura 7.** Peso de tejido adiposo visceral, suprarenal, epididimal y total de los animales de experimentación. Asterisco indica diferencia estadística significativa [ $p = 0.08$  (a),  $<0.0001$ (b),  $0.004$  (c),  $<0.001$ (d)] vs el grupo DAGF II, por la prueba de Dunnet. DE: dieta estándar. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. EE: extracto etanólico.

Al calcular el índice de adiposidad (Figura 7) se puede observar que ningún grupo tratado muestra diferencia significativa respecto al grupo DAGF II, lo cual significa que ningún tratamiento mejoró el índice de adiposidad de los animales; mientras que, el índice de adiposidad del grupo sano fue menor que en el resto de los grupos y estadísticamente significativo respecto a los animales del grupo DAGF II. Es importante señalar que, en el caso del grupo tratado con higo al 70%, tampoco se observó una mejora de este índice, a pesar que estos animales tuvieron la menor ganancia de peso corporal. Este hecho puede deberse a que dicho grupo fue el que consumió mayor cantidad de fructosa, y se conoce que la ingesta de fructosa está

directamente relacionada con el incremento de tejido adiposo visceral y total (DiNicolantonio *et al.*, 2017).



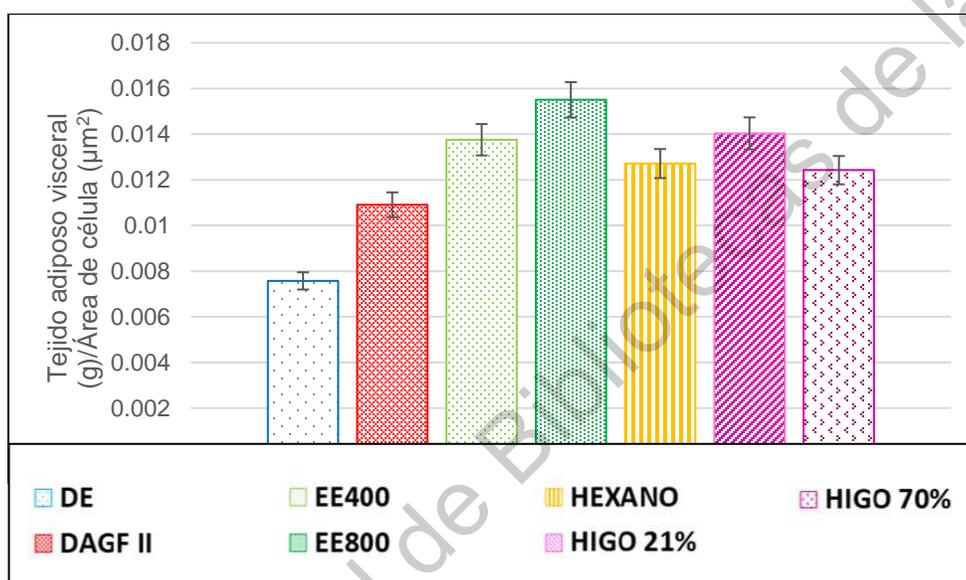
**Figura 8.** Índice de adiposidad de los animales de experimentación. Asterisco indica diferencia estadística significativa ( $p = 0.002$  vs el grupo DAGF II) por la prueba de Dunnet. DE: dieta estándar. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. EE: extracto etanólico.

### 6.2.3 Efecto del consumo del higo y sus extractos sobre la histología de tejido adiposo visceral de los animales de experimentación

La hipertrofia de los adipocitos es una respuesta adaptativa al exceso de nutrientes que mantiene la capacidad de amortiguación de nutrientes del tejido adiposo y protege los tejidos de la lipotoxicidad. Sin embargo, en algunos casos de obesidad, se puede alcanzar un umbral hipertrófico más allá del cual se supera la capacidad de amortiguación de adipocitos, lo que conduce a la deposición de lípidos ectópicos en tejidos periféricos (Muir *et al.*, 2016).

Como podemos observar en la Figura 8, el tejido adiposo visceral de los animales pertenecientes al grupo EE800 mostró una mayor área; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa respecto a la del grupo DAGF II. Ninguna de las cifras de área de tejido adiposo mostró diferencia significativa vs el grupo DAGF

II. Los resultados de hipertrofia de tejido adiposo visceral por histología coinciden con los resultados del índice de adiposidad (Figura 9). En general, podemos observar una mayor hipertrofia de tejido adiposo visceral en todos los grupos de experimentación, a excepción de los animales del grupo sano, como respuesta al consumo de dieta alta en grasa y fructosa. Sin embargo, en el caso de los animales alimentados con higo al 70%, esta estrategia no fue suficiente para prevenir el acúmulo de grasa en hígado.



**Figura 9.** Hipertrofia de tejido adiposo expresado como peso del tejido(g)/área de célula (μm<sup>2</sup>) de los animales de experimentación. DE: dieta estándar. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. EE: extracto etanólico.

#### 6.2.4 Efecto del consumo del higo y sus extractos sobre la histología hepática de los animales de experimentación

En la Figura 10 podemos observar la apariencia macroscópica y microscópica del tejido hepático de los animales de experimentación. En los hígados de las ratas alimentadas con higo al 70% es evidente la existencia de zonas hipocrómicas de grasa localizada y, aunque en menor proporción, también se puede observar este hallazgo en el hígado de los animales del grupo DAGF II.

De acuerdo a los parámetros evaluados en este trabajo de investigación, se decidió enviar a un segundo análisis histopatológico las muestras de los grupos control

(Sano y DAGF II), del grupo en el que se observó mayor protección (EE800) y del grupo que mostró los efectos más severos por su tratamiento (higo 70%).

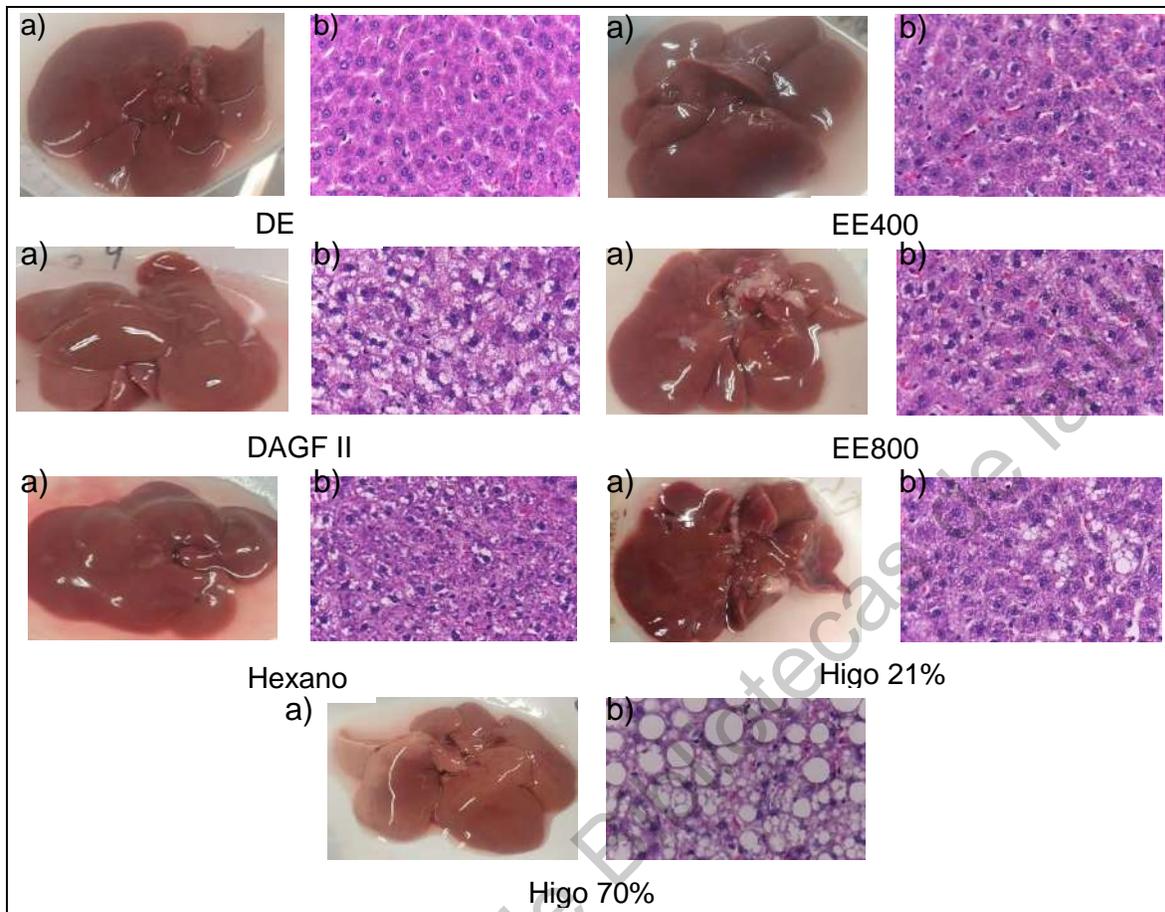
En base a la clasificación de Brunt, podemos observar que, aunque todos los animales de experimentación desarrollaron esteatosis hepática, el total de las ratas pertenecientes al grupo EE800 desarrolló esteatosis grado I; mientras que, el 60% de las ratas pertenecientes al grupo DAGF II e higo 70% desarrollaron esteatosis hepática grado 3, que es la más severa (Cuadro 19).

**Cuadro 19.** Grado de esteatosis hepática por grupo de experimentación analizado

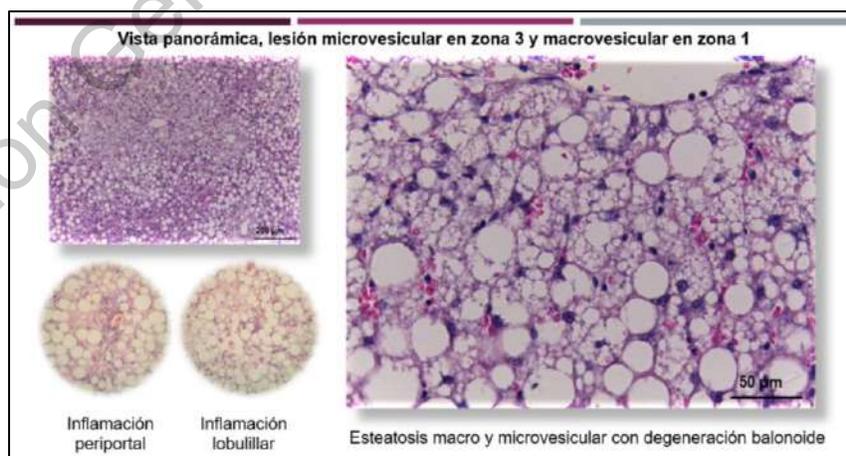
Grupo	Grado de esteatosis			
	0	I	II	III
DE	100%			
DAGF II		20%	20%	60%
EE 800		100%		
Higo 70%		40%		60%

DE: dieta estándar. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. EE: extracto etanólico.

Los hallazgos histológicos revelaron que existen lesiones predominantes en la zona 1, tanto de esteatosis como daño celular e inflamación, observándose una tendencia a mayor severidad en los animales del grupo higo 70%. Así mismo, la inflamación portal es incipiente en los animales del grupo higo 70%; en este grupo también se observaron infiltrados inflamatorios con predominio linfocitario, así como degeneración balonoide de los hepatocitos (Figura 11).



**Figura 10.** Imágenes representativas de tejido hepático de los diferentes grupos de experimentación. a) Apariencia macroscópica de hígado, b) Microfotografía de tejido hepático teñido con H&E, aumento 40x. DE: dieta estándar. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. EE: extracto etanólico.

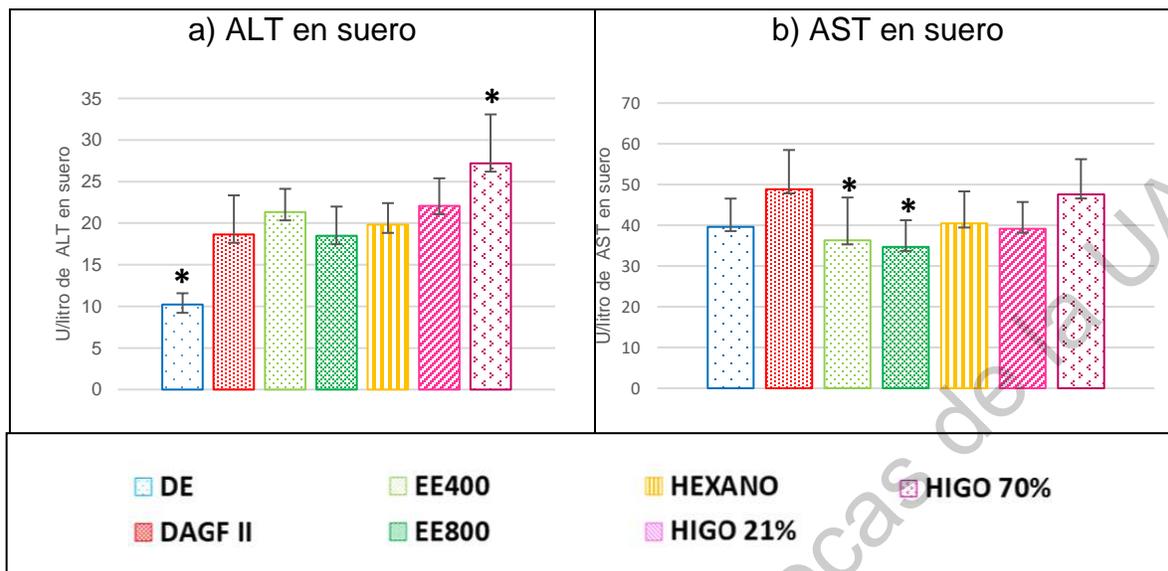


**Figura 11.** Hallazgos histológicos hepáticos de los animales de experimentación del grupo higo 70%.

De manera general, la evaluación histopatológica reafirma que los animales tratados con extracto etanólico de higo en una concentración de 800 mg/kg fueron los que presentaron mayor protección contra el desarrollo de esteatosis hepática; mientras que, los animales tratados con higo al 70% tuvieron un daño incluso más severo que los animales del grupo DAGF II. Aunado a lo anterior, los animales de este mismo grupo mostraron una menor actividad antioxidante y un mayor consumo de fructosa, dos de los aspectos que son determinantes en el desarrollo y evolución de la enfermedad (Suzuki & Diehl, 2017).

#### **6.2.5 Efectos del consumo de higo y sus extractos sobre enzimas de función hepática en los animales de experimentación**

Una de las pruebas bioquímicas usadas comúnmente para evaluar el daño hepático es la medición en suero de las enzimas de función hepática alanino amino transferasa (ALT) y aspartato amino transferasa (AST) (Mashav & Shibolet, 2015). En la Figura 12a podemos observar que los niveles séricos de ALT fueron significativamente mayores en el grupo higo 70% ( $p < 0.001$ ), respecto al grupo DAGF II, lo cual puede indicarnos un daño hepático más severo en los animales tratados con higo al 70%. Por otro lado, en la Figura 12b se aprecia que los niveles séricos de AST de las ratas pertenecientes a los grupos EE 400 ( $p = 0.026$ ) y EE 800 ( $p = 0.009$ ) fueron significativamente menores, lo que pudiera indicarnos una protección del extracto etanólico frente al daño hepático.



**Figura 12.** Enzimas de función hepática de los animales de experimentación. Asterisco indica diferencia estadística significativa vs el grupo DAGF II por la prueba de Dunnet. DE: dieta estándar. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. EE: extracto etanólico. ALT: alanino amino transferasa. AST: aspartato amino transferasa.

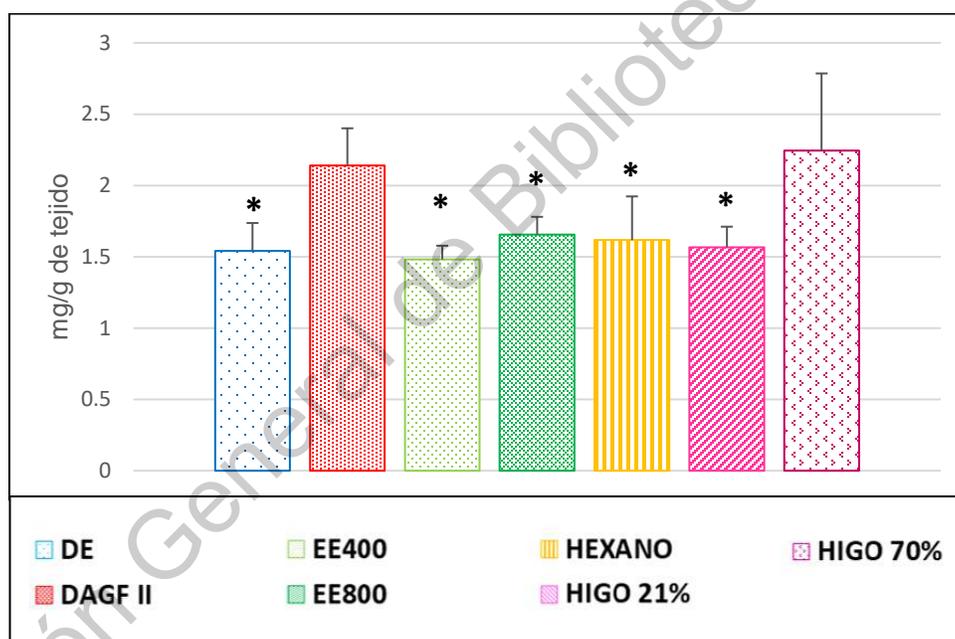
### 6.2.6 Efectos del consumo de higo y sus extractos sobre el contenido de triglicéridos hepáticos de los animales de experimentación

En el contexto de la obesidad, el flujo elevado de AG excede la capacidad del adipocito para poder almacenarlos, de manera que existe un aumento de AGL en torrente sanguíneo que, junto con los AG provenientes de la dieta y aquellos resultantes de la LDN, contribuyen a la acumulación hepática de triglicéridos (Haas *et al.*, 2015). Así mismo, la fructosa se considera un nutriente altamente lipogénico, que estimula la LDN hepática en mayor medida que la glucosa e, incluso, que una dieta alta en grasas (Softic *et al.*, 2020).

En la Figura 13 podemos observar que los animales del grupo higo 70% tuvieron una cantidad de TG hepáticos similar a los del grupo DAGF II. Cabe mencionar que estos animales consumieron mayor cantidad de azúcares simples, incluida la fructosa (Cuadro 17). Por el contrario, los animales de los demás grupos de tratamiento mostraron una concentración significativamente menor de TG en hígado

(DE  $p < 0.001$ , EE400  $p = p < 0.001$ , EE800  $p = 0.003$ , Hexano  $p = 0.002$ , higo 21%  $p < 0.001$ ).

Bawazeer & Qahl (2016) encontraron diferencias significativas entre los niveles séricos de ALT y AST de ratas Wistar albinas alimentadas con dieta alta en grasa y ratas alimentadas con esta misma dieta, pero tratadas con higo licuado (2 mL/kg). En dicho estudio ambas enzimas se encontraron por debajo del grupo alimentado con dieta alta en grasa, pero fueron significativamente más elevadas respecto al grupo control sano. Así mismo, El-Shobaki y colaboradores (2010), quienes administraron higo al 5, 10 y 20% a ratas diabéticas, también encontraron una disminución significativa de los niveles séricos de estas enzimas en los animales tratados con higo al 10 y 20%.



**Figura 13.** Contenido hepático de TG de los animales de experimentación. Asterisco indica diferencia estadística significativa vs el grupo DAGF II por la prueba de Dunnet. DE: dieta estándar. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. EE: extracto etanólico.

En este experimento, las ratas de los grupos tratados con higo consumieron una cantidad superior a las reportadas anteriormente, y encontramos solamente una disminución en AST en las ratas tratadas con extracto etanólico. El grupo tratado con higo al 70% mostró niveles de ALT elevados, de manera que el consumo

elevado de fructosa podría ser el factor más determinante sobre la gravedad del daño hepático.

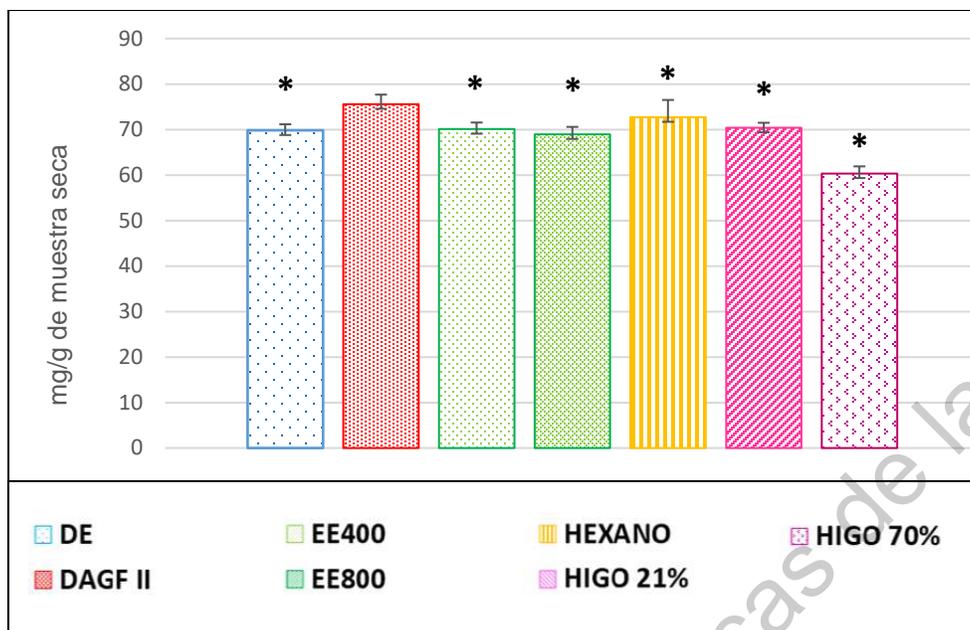
#### **6.2.7. Efecto del higo y sus extractos sobre el contenido de triglicéridos en heces de los animales de experimentación**

Se ha demostrado que el consumo de fitoquímicos puede normalizar los niveles de TG en suero, y podrían estar relacionados con la inhibición de la enzima lipasa pancreática, la cual disminuye la absorción de TG e incrementa su excreción a través de las heces (Dhingra *et al.*, 2012).

En la Figura 14 podemos observar que la cantidad de TG hepáticos que excretaron los animales del grupo DAGF II fue estadísticamente diferente del resto de los grupos ( $p < 0.001$ ), es decir, fueron los que excretaron mayor cantidad de TG, un 7.62 % menos que el grupo control.

Por otro lado, los animales del resto de los grupos presentaron cifras de TG fecales similares a las mostradas por los animales del grupo DEs, lo cual puede indicarnos que el mecanismo por el cual la cantidad hepática de TG disminuyó en la mayoría de los animales tratados con higo y sus extractos, no es a través de la excreción de los mismos a nivel intestinal.

Un dato relevante es que los animales que consumieron higo al 70%, mostraron los niveles más altos de TG intrahepáticos y menor excreción de TG fecales, así como mayor daño hepático evidenciado por histología y niveles elevados de enzimas de función hepática. Se conoce que la NAFLD se caracteriza por presencia de disbiosis, que es el desequilibrio microbiano de la microbiota intestinal, y por alteraciones en la señalización de la síntesis de ácidos biliares (Wang *et al.*, 2019), motivo por el cual podríamos hablar de la incapacidad del hígado de estos animales para secretar suficientes cantidades de ácidos biliares y metabolizar adecuadamente los TG a nivel intestinal.



**Figura 14.** Contenido de triglicéridos en heces de los animales de experimentación. Asterisco indica diferencia estadística significativa vs el grupo DAGF II por la prueba de Dunnet. DE: dieta estándar. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. EE: extracto etanólico.

### 6.2.8 Efectos del consumo de higo y sus extractos sobre parámetros bioquímicos en suero en los animales de experimentación

Algunos componentes del síndrome metabólico como son obesidad central, hiperglicemia y TG elevados, son los factores de riesgo más influyentes en el desarrollo de NAFLD, y la presencia de estas mismas comorbilidades puede ser un indicador de la progresión de esta enfermedad a fibrosis y NASH (Haas *et al.*, 2015). Por lo cual, se evaluaron los niveles de colesterol total, colesterol HDL, TG y glucosa en suero (Cuadro 18). De acuerdo con los valores reportados, podemos observar que los grupos que mostraron una diferencia estadísticamente menor en los niveles séricos de colesterol fueron: sanos ( $p < 0.001$ ), EE 400 ( $p = 0.005$ ) e higo 21% ( $p = 0.008$ ), en un 17, 12.5 y 12.1 % menos, respectivamente; mientras que, se esperaba que el grupo tratado con hexano fuera el que presentara una mayor disminución, ya que se conoce que el consumo de fitoesteroles reduce los niveles de colesterol total y de LDL (Jones *et al.*, 1997).

En cuanto a colesterol HDL, el único grupo que mostró un incremento significativo (41.5%) fue el EE 800 ( $p < 0.001$ ), que fue también el grupo que consumió una mayor cantidad de compuestos polifenólicos (Cuadro 17). En estudios previos, también se ha observado una asociación positiva entre la ingesta de compuestos polifenólicos y niveles más elevados de colesterol HDL (Castro-Barquero *et al.*, 2020).

El grupo EE 800 exhibió niveles significativamente menores de TG séricos (21.8 %,  $p < 0.001$ ) respecto al grupo DAGF II, seguido del grupo tratado con higo al 70% ( $p < 0.001$ ), en un 25.1 % menos. El grupo DE también mostró una diferencia estadística menor ( $p < 0.001$ ), y sus niveles séricos de triglicéridos fueron 40.6% más bajos respecto a los del grupo DAGF II. Belguith y colaboradores (2016) reportan un decremento del 75.3% en los niveles séricos de TG en ratas alimentadas con dieta alta en grasa tratadas con extracto etanólico de higo, en una concentración de 400 mg/kg. Sin embargo, en este estudio, el grupo tratado con esa misma concentración de extracto no mostró una disminución significativa.

El-Shobaki y colaboradores (2010) observaron una disminución de glucosa sérica en ratas diabéticas tratadas con higo al 5, 10 y 20%; sin embargo, en el presente trabajo no se observó disminución de este parámetro en ninguno de los tratamientos. Por el contrario, los niveles de glucosa de los grupos EE 400 ( $p < 0.001$ ) y hexano ( $p < 0.001$ ) mostraron un aumento significativo (Cuadro 20). Los grupos EE 400 y EE 800 consumieron aproximadamente la misma cantidad de azúcares simples; sin embargo, la dosis de compuestos polifenólicos que ingirieron fue diferente. Esto sugiere que la cantidad de compuestos polifenólicos, especialmente de flavonoides, ingerida por los animales tratados con extracto etanólico en una concentración de 400 mg/kg no fue suficiente para modular la respuesta glicémica. Se conoce que los flavonoides tienen actividad hipoglucémica, al inhibir el transporte de glucosa por sus respectivos transportadores intestinales (El-Shobaki *et al.*, 2010). El grupo hexano fue uno de los grupos que presentó mayores niveles de glucosa y, aunque el extracto de hexano no contiene azúcares, tiene un sabor sumamente amargo. Se observó que, tras la canulación, las ratas de este grupo tomaban mayor cantidad de agua con fructosa, probablemente para

contrarrestar este sabor; de tal manera que su consumo fue mayor que el de los animales tratados con extracto etanólico, afectando la homeostasis de la misma y, por lo tanto, afectando sus niveles de glucosa.

**Cuadro 20.** Efecto del consumo de higo y sus extractos en animales de experimentación sobre colesterol total, colesterol HDL, TG y glucosa.

Grupo	Colesterol total (mg/dl)	Colesterol HDL (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)	Glucosa (mg/dl)
DE	57.6 ± 4.3 *	11.8 ± 1.4	132.8 ± 17.9 *	112.7 ± 10.1
DAGF II	69.4 ± 2.8	11.4 ± 1.2	223.7 ± 30.4	127.4 ± 11.0
EE 400	60.7 ± 5.9*	14.4 ± 1.9	230.8 ± 33.4	155.1 ± 11.9 *
EE 800	67.2 ± 4.3	19.5 ± 4.7 *	175.2 ± 26.3 *	129.8 ± 12.2
Hexano	67.5 ± 5.7	13.1 ± 1.1	200.5 ± 26.6	153.1 ± 9.9 *
Higo 21%	61.0 ± 4.4*	15.0 ± 1.3	203.1 ± 22.8	134.6 ± 15.3
Higo 70%	62.8 ± 4.5	14.4 ± 1.3	167.6 ± 14.7*	129.6 ± 10.4

Los valores se expresan como la media ± la desviación estándar. Los valores marcados con asterisco (\*) en la misma columna indican diferencia significativa respecto al grupo DAGF II por prueba de Dunnet. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. EE: extracto etanólico. HDL: lipoproteínas de alta densidad.

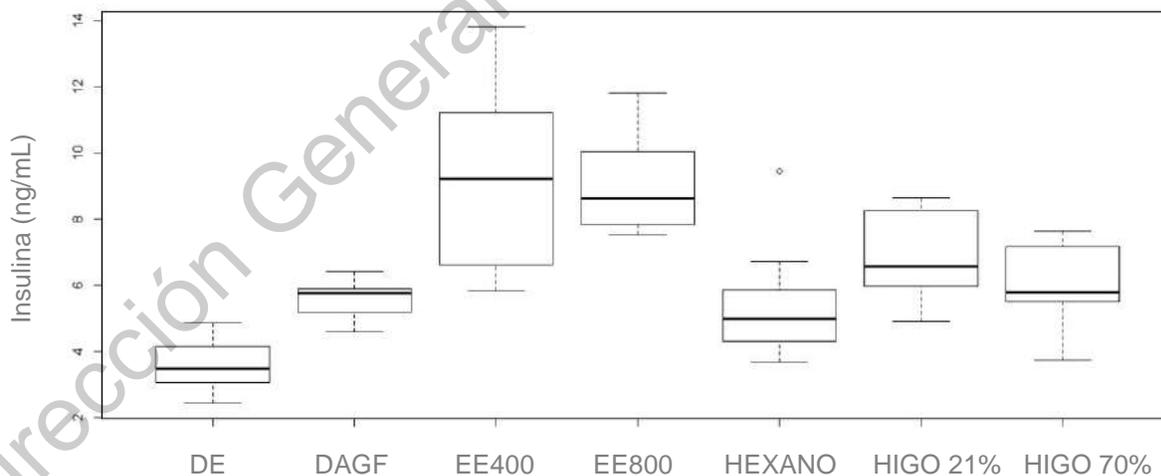
La insulina es una hormona liberada por las células beta pancreáticas en respuesta a niveles elevados de nutrientes en sangre; su principal función es la de mantener los niveles de glucosa en un rango de normalidad (Erion & Corkey, 2017). Tras observar el aumento de los niveles de glucosa sérica, fue de interés investigar sobre la respuesta compensatoria que pudiera observarse a través de la insulina. Como podemos observar en la Figura 14, todos los animales de los grupos con tratamiento tuvieron una mayor concentración de insulina respecto al grupo sano. Los animales del grupo hexano fueron los que obtuvieron la menor concentración de insulina, respecto a los demás tratamientos. Se conoce que la insulina inhibe la lipólisis y, por lo tanto, promueve el almacenamiento de grasa (Erion & Corkey., 2017), de manera que bajos niveles de insulina pueden implicar un menor depósito corporal de la misma. En este estudio pudimos observar que los animales del grupo hexano

presentaron una menor acumulación de grasa visceral, menor índice de adiposidad y también presentaron un menor peso corporal, comparados con los animales tratados con extracto etanólico. En general, estos resultados indican que el extracto de hexano puede tener un impacto positivo sobre la homeostasis de la insulina.

También podemos visualizar que los animales del grupo EE400 presentan mayor concentración de insulina en suero (Figura 15) respecto a los animales de los demás grupos y que sus niveles de glucosa fueron elevados (Cuadro 20), por lo cual el extracto etanólico a esta dosis no logró la homeostasis de la glucosa. Los animales del grupo EE800, aunque tienen niveles similares de insulina, presentan menor concentración de glucosa.

En general, en los animales de todos los grupos alimentados con DAGF II se puede observar la tendencia de que la insulina aumenta como mecanismo para metabolizar el aumento de glucosa sérica.

Es importante aclarar que, en la mayoría de los grupos de experimentación, se observa dispersión de los datos; esto se debió a que sólo se contaba con una placa para realizar el ensayo y, por lo tanto, no fue posible realizar repeticiones.



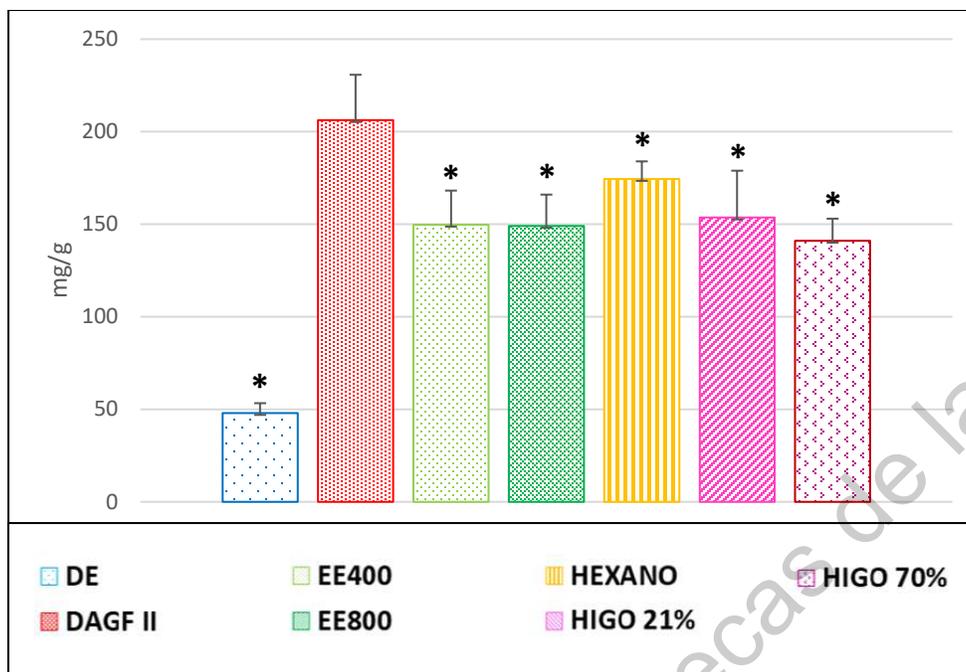
**Figura 15.** Insulina en suero de animales de experimentación tratados con higo y sus extractos. DE: dieta estándar. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. EE: extracto etanólico.

### **6.2.6 Efecto del higo y sus extractos sobre el contenido de glucógeno hepático en los animales de experimentación**

La obesidad está asociada con un incremento del contenido hepático de glucógeno (Allick *et al.*, 2004). Se conoce que una dieta alta en grasa y fructosa, en ratas Wistar, altera el metabolismo de lípidos y carbohidratos, como consecuencia del incremento de la actividad hepática de las enzimas implicadas en las vías gluconeogénicas y glucogenolíticas (Barbosa *et al.*, 2006).

Como podemos observar en la Figura 16, los animales del grupo DAGF II mostraron un contenido de glucógeno hepático 4 veces mayor que los del grupo sano; mientras que, los animales tratados con higo y sus extractos mostraron una concentración de glucógeno 3 veces mayor; lo cual se relaciona con la hiperinsulinemia que mostraron todos los animales de experimentación, ya que la insulina estimula la síntesis de glucógeno hepático para almacenar el exceso de glucosa aportada por la dieta (Guerra & Gastaldelli., 2020). Aunque la cantidad de glucógeno hepático no se normalizó en los animales tratados con higo y sus extractos, éstos tuvieron una menor concentración, estadísticamente significativa, respecto a la de los animales de grupo DAGF II. Esto podría indicarnos que los polifenoles pueden influir sobre el almacenamiento de glucógeno hepático, tal como lo reportaron Idowo Kazeem y colaboradores (2013), quienes encontraron que un extracto de jengibre (500 mg/kg de peso), rico en polifenoles, normalizó la cantidad de glucógeno hepático en ratas albinas diabéticas.

Por otro lado, podemos observar que la cantidad de glucógeno hepático es similar entre todos los grupos tratados con higo y sus extractos, lo cual puede deberse a que todos ellos consumieron más de 10% de azúcares reductores en la dieta, excediendo la recomendación de la OMS (Cuadro 18).



**Figura 16.** Contenido de glucógeno hepático de los animales de experimentación. Asterisco indica diferencia estadística significativa vs el grupo DAGF II por la prueba de Dunnet. DE: dieta estándar. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. EE: extracto etanólico.

### 6.2.8 Efecto del higo y sus extractos sobre la actividad antioxidante en hígado de los animales de experimentación

La obesidad implica altos niveles de glucosa y lípidos circulantes, que resultan en un exceso de sustratos energéticos para las vías metabólicas. Este exceso de nutrientes puede, a su vez, aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno, promoviendo estrés oxidativo y subsecuente daño celular oxidativo (Catalán *et al.*, 2008), especialmente en órganos con una alta actividad metabólica como el hígado.

Para evaluar la respuesta antioxidante en el hígado de los animales de experimentación se evaluaron las enzimas catalasa (CAT) y glutatión S-transferasa (GST), así como el cofactor no enzimático glutatión reducido (GSH).

### 6.2.7.1 Determinación de la actividad de la enzima catalasa (CAT)

La catalasa es la enzima que se encarga de prevenir el daño celular oxidativo a través de la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua (Catalán *et al.*, 2008). Como podemos observar en el Cuadro 21, la actividad de la enzima CAT fue similar en todos los grupos de tratamiento. Aunque no existe diferencia significativa entre grupos ( $p = 0.455$ ), podemos observar que el grupo DAGF II presentó una actividad hepática mayor de esta enzima, comparada con la del grupo sano, como mecanismo compensatorio por el estrés oxidativo que genera el consumo elevado de grasa y fructosa (Leclercq, 2004). Así mismo, el grupo EE800 es el que muestra la mayor actividad de CAT. Este grupo es también el que consumió una mayor cantidad de compuestos polifenólicos (Cuadro 18), los cuales han demostrado incrementar la actividad de CAT para reducir el daño hepatocelular (Gagnière & Bonnet, 2017). Este grupo experimental es también el que presentó niveles menores de AST y ALT (Figura 12), con lo cual podemos comprobar la asociación benéfica del consumo de extracto de etanol en una concentración de 800 mg/kg en nuestro modelo experimental.

**Cuadro 21.** Actividad de enzimas antioxidantes CAT y GST y del cofactor GSH en hígado de los animales de experimentación.

Grupo	CAT (U/mg proteína)	GST (U/mg proteína)	GSH ( $\mu$ M/mg de proteína)
DE	121.01 $\pm$ 5.51	765.61 $\pm$ 78.70	7.18 $\pm$ 0.75
DAGF II	152.59 $\pm$ 12.18	580.32 $\pm$ 22.61	10.03 $\pm$ 1.88
EE 400	126.53 $\pm$ 6.02	489.64 $\pm$ 29.92	8.87 $\pm$ 1.73
EE 800	165.91 $\pm$ 10.44	1008.91 $\pm$ 47.52*	6.70 $\pm$ 0.85
Hexano	147.19 $\pm$ 13.14	1040.41 $\pm$ 26.35*	6.75 $\pm$ 1.40
Higo 21%	152.96 $\pm$ 10.41	1266.67 $\pm$ 62.35*	10.06 $\pm$ 2.6
Higo 70%	138.08 $\pm$ 7.41	1202.39 $\pm$ 72.39*	7.54 $\pm$ 0.92

Asterisco indica diferencia estadística significativa vs el grupo DAGF II por la prueba de Dunnet. DE: dieta estándar. DAGF: dieta alta en grasa y fructosa. EE: extracto etanólico.

### **6.2.7.2 Determinación de la actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST)**

GST es una enzima multifuncional, implicada en los procesos de desintoxicación. Específicamente cataliza la conjugación del glutatión con compuestos electrofílicos, producidos principalmente a partir de xenobióticos, es decir, de compuestos químicos extraños a un organismo o sistema biológico (Čolak & Žorić, 2019).

Como podemos observar en el Cuadro 21, no hubo diferencia estadística en la actividad de esta enzima entre los animales del grupo DAGF II y los del grupo sano, que fueron los que no recibieron tratamiento a base de higo. Los animales tratados extracto etanólico a una concentración de 400 mg/kg de peso tampoco mostraron diferencia respecto a los del grupo DAGF II.

Se ha documentado que los compuestos con actividad antioxidante pueden inducir la GST hepática en ratas (Tsuchida, 2002); sin embargo, pudiera ser que la cantidad de compuestos administrados en la dosis más baja de extracto etanólico no fue suficiente para inducir la actividad hepática de GST. Los animales de los grupos EE800, hexano, higo 21% e higo 70% mostraron un incremento de la actividad de la enzima GST respecto a los animales del grupo DAGF II ( $p < 0.001$ ). Este hecho pudiera ser positivo, ya que los animales pertenecientes al grupo EE800 y hexano fueron los que mostraron, en general, mejores resultados en la evaluación bioquímica.

### **6.2.7.3 Determinación de la concentración del cofactor enzimático glutatión reducido (GSH)**

El GSH es la principal molécula antioxidante en las células. Se encuentra en todos los tejidos y ayuda a proteger a las células de las EROS (Catalán *et al.*, 2018).

Videla y colaboradores (2004) tomaron una biopsia de pacientes con esteatosis hepática no alcohólica y esteatohepatitis y encontraron que había un decremento significativo en sus niveles de GSH hepático, respecto al del control sano, y lo atribuyeron a que una baja defensa antioxidante en hígado incrementa la severidad

del daño hepatocelular mostrado en la histología. En nuestro modelo animal, no se encontró diferencia significativa entre grupos, lo cual pudiera ser positivo, ya que, a excepción de los animales del grupo higo 70%, el resto mostró una menor cantidad de TG hepáticos; lo cual podría indicar un daño hepático menos severo en las histologías de nuestros grupos experimentales.

El rol del estrés oxidativo en la producción de esteatosis hepática y su progresión a inflamación y esteatohepatitis se ha discutido en relación a las alteraciones en la respuesta antioxidante. Se han observado niveles elevados de especies reactivas de oxígeno y productos de peroxidación lipídica, así como bajos niveles de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa y catalasa, y compuestos antioxidantes como glutatión, en pacientes con NAFLD y NASH, en comparación con aquellos observados en sujetos sanos (Sumida *et al.*, 2013).

### **6.3 Correlaciones entre la capacidad antioxidante del higo y sus extractos y los parámetros bioquímicos en ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa**

Después de realizar el análisis multivariado por los métodos de PLS y LMS podemos observar que ambos son significativos, sin embargo, LMS se ajusta mejor al modelo, debido a que contempla independientemente la capacidad antioxidante medida por las enzimas CAT y GPX; a pesar de este hecho, ambos modelos estadísticos concuerdan en varias determinaciones que resultan representativas.

En cuanto a la capacidad antioxidante medida por la enzima CAT, ambos modelos coinciden en 3 variables que poseen efecto significativo sobre la misma: Glucosa, colesterol y colesterol HDL. El modelo PLS presenta una  $r^2$  mayor cuando contempla solamente las variables glucosa y colesterol HDL. Cuando se agrega la variable ALT su  $r^2$  disminuye ligeramente y el p valor aumenta, sin embargo, biológicamente la enzima ALT se ha relacionado con la severidad de enfermedades metabólicas, como la enfermedad arterial coronaria, y con el estatus antioxidante del hígado (Cheraghi *et al.*, 2019), por lo cual es importante contemplarla también como factor influyente sobre la actividad de CAT.

En ambos modelos, la GST tiene a la variable TG en suero como el común denominador, pero en LMS las variables glucosa, ALT y AST también son significativas (Cuadro 22).

**Cuadro 22.** Variables con efecto significativo sobre actividad antioxidante en el modelo animal de experimentación, medidas por los métodos PLS y LMS.

VARIABLE DEPENDIENTE	MODELO DE ANÁLISIS EMPLEADO					
	PLS			LMS		
	VARIABLES con efecto significativo	r <sup>2</sup>	P valor	VARIABLES con efecto significativo	r <sup>2</sup>	P valor
<b>CAT</b>	Glucosa + HDL	0.22	0.00086	Glucosa + colesterol + HDL	0.36	0.00003
	ALT + glucosa + HDL	0.14	0.01997			
<b>GST</b>	TG en suero	0.16	0.00191	Glucosa + TG en suero + ALT + AST	0.30	0.00042

**ALT:** Alanino amino transferasa, **AST:** Aspartato amino transferasa, **CAT:** Catalasa, **GST:** Glutación S transferasa, **LMS:** Regresión lineal múltiple, **PLS:** Cuadrados mínimos parciales, **TG:** Triglicéridos. **HDL.** Lipoproteínas de alta densidad.

El modelo de PLS explica en un 14% la variabilidad de la actividad antioxidante, medida por la enzima CAT; teniendo en cuenta la variable HDL, podemos observar que, teniendo un valor promedio de 49.62 de CAT (Cuadro 22), un aumento de 0.74 unidades de HDL puede generar un aumento de una unidad de CAT.

Por su parte, el modelo LM explica en un 36% la variabilidad de la actividad antioxidante, medida por la enzima CAT, casi el doble del modelo anterior. Este modelo contempla más variables y podemos ver que la más influyente es también el colesterol HDL; en donde teniendo un valor promedio de 27.22 de CAT, un aumento de 0.61 unidades de HDL puede generar un aumento de una unidad de CAT (Cuadro 22).

Respecto a GST, el modelo de PLS explica en un 16 % la variabilidad de su actividad antioxidante; teniendo en cuenta las variables ALT, glucosa y HDL. Así mismo, podemos observar que la actividad de GST puede elevarse al incrementar los

valores de ALT y HDL; mientras que, un aumento en las cifras de glucosa puede generar una disminución de la actividad de esta enzima y este comportamiento es común en los modelos PLS y LM. El modelo de LM también nos muestra que al aumentar las cifras de AST y TG en suero, también se puede disminuir la actividad antioxidante de GST (Cuadro 23).

**Cuadro 23.** Coeficientes de los modelos de PLS y LMS para la evaluación de la actividad antioxidante en hígado del modelo animal de experimentación.

VARIABLES	Coeficientes de CAT		Coeficientes de GST	
	PLS	LM	PLS	LM
<b>Intercepto</b>	49.623	27.220	1132.866	1858.320
<b>ALT</b>	-	-	13.948	22.444
<b>AST</b>	-	-	-	-6.272
<b>Colesterol</b>	-	0.397	-	-
<b>Glucosa</b>	-	-0.146	-5.856	-3.956
<b>HDL</b>	0.740	0.611	18.515	-
<b>Tg suero</b>	-	-	-	-3.277

**ALT:** Alanino amino transferasa, **AST:** Aspartato amino transferasa, **CAT:** Catalasa, **GST:** Glutación S transferasa, **LMS:** Regresión lineal múltiple, **PLS:** Cuadrados mínimos parciales, **TG:** Triglicéridos. **HDL.** Lipoproteínas de alta densidad.

Sin embargo, aunque las relaciones de las variables con la actividad antioxidante son significativas, ningún modelo resulta predictivo. Al modelar dichas relaciones se puede observar que son endeables, es decir, que no hay una aparente relación causal suficiente entre las mismas ya que no se aprecia una tendencia clara.

La NAFLD se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico (Buzzeti *et al.*, 2016), el cual es definido como una constelación de factores fisiológicos, bioquímicos, clínicos y metabólicos que incrementan el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y sus comorbilidades, que pueden desencadenar en la muerte de un individuo (Kaur, 2014). Al tener una gran cantidad de factores que influyen en su etiología y complicaciones, es posible que las variables que se consideraron en este análisis no sean suficientes e, incluso, existan otras variables con mayor influencia que no se hayan medido o contemplado en este estudio. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico del modelo propuesto en este trabajo de investigación fue posible identificar aquellos parámetros

bioquímicos que tienen mayor influencia sobre la actividad antioxidante en hígado de ratas con NAFLD, y ya que no existe un tratamiento específico para esta enfermedad, resulta sumamente relevante conocer dichas variables para generar estrategias que ayuden a normalizar dichos parámetros, de manera que impacten positivamente la actividad antioxidante del hígado, ayudando a prevenir la aparición y progresión de la NAFLD.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## 7. CONCLUSIONES

El fruto del higo contiene fitoquímicos no polares como fitoesteroles, carotenoides y tocoferoles, así como fitoquímicos polares, tales como antocianinas, fenoles, flavonoides y proantocianidinas no extraíbles, las cuales fue posible cuantificar en este estudio, a diferencia de otros trabajos de investigación.

En el extracto de etanol se logró extraer compuestos fitoquímicos polares, principalmente fenoles, de los cuales el mayoritario es el flavonoide rutina. Debido a su naturaleza polar, también se extrajo una cantidad importante de azúcares, lo cual aumentó la cantidad de carbohidratos simples consumidos por los animales de experimentación, reflejándose en el desarrollo de hipertrofia del tejido adiposo visceral.

En el extracto de hexano se logró extraer compuestos fitoquímicos no polares, principalmente fitoesteroles y carotenoides; el carotenoide mayoritario fue el  $\alpha$ -caroteno. Los animales tratados con este extracto mostraron menor cantidad de tejido adiposo visceral, menor índice de adiposidad y menor hipertrofia de tejido adiposo visceral respecto a los animales tratados con extracto etanólico y con higo, por lo cual, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa, pudiera haber una asociación positiva entre la ingesta de los fitoquímicos no polares del higo y la adiposidad visceral.

Los animales tratados con higo al 70% consumieron mayor cantidad de azúcares simples, mostraron un menor peso corporal al final del periodo de experimentación, comparados con los animales de los demás grupos. También presentaron mayor cantidad de triglicéridos hepáticos y mayor número de vacuolas lipídicas en la histología del tejido hepático, con una mayor severidad histopatológica, así mismo aumentaron significativamente sus niveles de enzimas de función hepática. Los hallazgos anteriores indican que el consumo de higo en esta proporción puede empeorar la esteatosis hepática en ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa.

Los animales tratados con extracto etanólico en una concentración de 800 mg/kg de peso mostraron menor contenido de triglicéridos hepáticos, mayor cantidad de colesterol HDL, menor peso relativo de hígado, niveles inferiores de enzimas de función hepática AST y ALT y mejora en la histología hepática. De acuerdo con los datos antes mencionados podríamos decir que el extracto etanólico, administrado en una concentración de 800 mg/kg de peso, protege del daño hepático causado por el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa en ratas.

De acuerdo al estudio de asociación estadística realizado por los métodos de PLS y LM, existen parámetros bioquímicos que influyen fuertemente sobre la actividad antioxidante del hígado sin embargo, no son suficientemente fuertes para considerarse causales. Los parámetros bioquímicos que más influyen sobre la actividad de CAT son colesterol, glucosa y HDL; mientras que para GST son ALT, AST, HDL, glucosa y TG en suero.

El establecimiento de las correlaciones entre la actividad antioxidante hepática inducida por el consumo de higo y sus extractos y los parámetros bioquímicos medidos, permitió identificar las variables más influyentes, lo cual pudiera ayudar para orientar futuras investigaciones y estrategias hacia la normalización de dichos parámetros bioquímicos con la finalidad de contrarrestar los efectos deletéreos del estrés oxidativo sobre la NAFLD, evitando su aparición y/o evolución.

## 8. REFERENCIAS

Abdelmalek MF, Angulo P, Jorgensen RA, Sylvestre PB & Lindor MD. (2001). Betaine, a promising new agent for patients with Nonalcoholic Steatohepatitis: Results of a pilot study. *American Journal of Gastroenterology*. 96 (9): 2711 - 2717.

Aebi H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 105: 121 - 126.

Afzal S, Afzal N, Awan MR, Khan TS, Riswana AG & Tariq S. (2009). Ethno-botanical studies from Northern Pakistan. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad Pakistan*. 21(1): 52 - 57.

Ahr HJ, Bomhard E, Enzmann H, Karbe E, Mager H, Sander E, & Schlüter G. (1998). Calcium channel blockers and the risk of cancer: a preclinical assessment. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 12(2): 157 - 169.

Allick G, Sprangers F, Weverling GJ, Ackermans MT, Meijer AJ, Romijn JA, Endert E, Bisschop PH & Sauerwein HP. (2007). Free fatty acids increase hepatic glycogen content in obese males. *Metabolism*. 53 (7): 886 - 893.

Amiri H. (2010). Antioxidant activity of the essential oil and methanolic extract of *Teucrium orientale* (L.) subsp. *taylori* (Boiss.) Rech. f. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 9 (4): 417 - 423.

Angulo P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *The New England Journal of Medicine*. 346 (16): 1221 - 1231.

Angulo P & Lindor KD. (2005). Management of NASH: current and future perspectives on treatment. En: Farrell CG, George J, De la M HP & McCullough A (Editors). *Fatty liver disease: NASH and related disorders*. Blackwell Publishing. New Orleans, USA. P. 193 - 205.

Arcott SA. (2013). Food sources of carotenoids. En: Ed. Tanumihardjo SA. *Carotenoids and human health*. Springer Science & Business Media. New York, USA. P. 3 - 19.

Arvaniti OS, Samaras Y, Gatidou G & Thomaidis NS. (2019). Review on fresh and dried figs: Chemical analysis and occurrence of phytochemical compounds, antioxidant capacity and health effects. *Food Research International*. 119: 244 - 267.

Badgujar S, Patel V, Bandivdekar H & Mahajan R. (2014). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus carica*: a review. *Pharmaceutical Biology*. 52(11): 1487 - 1503.

Baffy G. (2015). Micro RNAs in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Medicine*. 4: 1977 - 1988.

Barbosa CR, Albuquerque EMV, Faria EC, Oliveira HFC & Castilho LN. (2007). Opposite lipemic response of Wistar rats and C57BL/6 mice to dietary glucose or fructose supplementation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 40: 323 - 331.

Bawazeer F & Qahl S. (2016). Biochemical study of the effect of mixture Fig (*Ficus carica* L) and olive oil on liver functions in nonalcoholic fatty liver disease in hyperlipidemic rat model. *Advances in Environmental Biology* 10(1): 201 - 207.

Belguith O, Ammar S, Contreras M, Turki M, Segura A, El Feki A, Makni F & Bouaziz M. (2016). Antihyperlipidemic and antioxidant activities of edible Tunisian *Ficus carica* L. fruits in high fat diet-induced hyperlipidemic rats. *Plant Foods for Human Nutrition*. 41: 183 - 189.

Bettermann K, Hohensee T & Haybaeck J. (2014). Steatosis and steatohepatitis: Complex disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 15: 9924-9944.

Boyce C, Pickhardt P, Kim D, Taylor A, Winter T, Bruce R, Lindstrom M & Hinshaw JL. (2010). Hepatic steatosis (fatty liver disease) in asymptomatic adults identified by unenhanced low-dose CT. *American Journal of Roentgenology*. 194: 623 - 628.

Briseño P, Chávez R & López M. (2018). Prevalencia y relación de esteatosis hepática con perfil lipídico y hepático en pacientes de chequeo médico. *Revista de Gastroenterología de México*. 10: 21 - 27.

Caliskan O. (2015). Mediterranean figs (*Ficus carica* L) functional food properties, En: Ed. Preedy VR & Watson RR. The Mediterranean diet an evidence-based approach. Academic Press. USA. P. 629 - 637.

Castro-Barquero S, Tresserra-Rimbau A, Vitelli-Storelli F, Doménech M, Salas-Salvadó J, Martín-Sánchez V & Estruch R. (2020). Dietary polyphenol intake is associated with HDL-cholesterol and a better profile of other components of the metabolic syndrome: A PREDIMED-Plus sub-study. *Nutrients*. 12: 689 - 706.

Castro MG, Banderas DZ & Ramírez JC. (2009). Prevalencia de hígado graso no alcohólico en individuos con síndrome metabólico. *Cirugía y Cirujanos*. 80:128 - 133.

Catalán V, Frühbeck G & Gómez-Ambrosi J. (2018). Inflammatory and oxidative stress markers in skeletal muscle of obese subjects.

Chartoumpakis DV & Kensler TW. (2015). The role of the keap1/Nrf2 pathway in the development and progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. En: Ed. Tirosh O. Liver metabolism and fatty liver disease. CRC Press. Florida, USA. P. 91 - 102.

Choi SS & Diehl AM. (2008). Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Current Opinion in Lipidology*. 19: 295 - 300.

Chowdhry S, Nazmy MH, Meakin PJ, Dinkov-Kostova AT, Walsh SV, Tsujita T, Dillon JF, Ashford ML & Hayes JD. (2010). Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biology and Medicine*. 48(2):357 - 371.

Čolak E & Žorić L. (2019). Antioxidants and age-related macular degeneration. En: Ed. Preedy VR & Watson RR. Handbook of nutrition, diet, and the eye. Academic Press. Belgrade, Serbia. P. 85 - 106.

Da Acosta LA, García-Bailo B, Badawi A & El-Soheily A. (2012). Genetic determinants of dietary antioxidant status. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 108: 179 - 200.

Dhingra M, Michael M, Rajput H & Patil RT. (2012). Dietary fibre in foods: a review. *Journal of Food Science and Technology*. 49(3): 255 - 266.

DiNicolantonio JJ, Mehta V, Onkaramurthy N & O'Keefe JH. (2017). Fructose-induced inflammation and increased cortisol: a new mechanism for how sugar induces visceral adiposity. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 61(1): 3 - 9.

Doughari JM. (2012). Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. En: Ed. Venketeshwer Rao. *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. InTech. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-andhealth/phytochemicals-extraction-methods-basic-structures-and-mode-of-action-as-potentialchemotherapeutic>.

Ellman GL. (1959). A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 74: 443–450.

El-Shobaki FA, El-Bahay AM, Esmail RSA, Abd El-Megeid AA & Esmail NS. (2010). Effect of fig fruit (*Ficus carica* L.) and its leaves on hyperglycemia in alloxan diabetic rats. *World Journal of Dairy and Food Sciences*. 5(1): 45 - 57.

Erion KA & Corkey. (2017). Hyperinsulinemia: a cause of obesity?. *Current Obesity Reports*. 6(20): 178 - 186.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. ENSANUT (2016). Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf>

Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW & Klein S. (2008). Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 134(2): 424 - 431.

Fabbrini E, Sulliva S & Klein S. (2010). Obesity and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: biochemical, metabolic and clinical implications. *Hepatology*. (2): 679 - 689.

Flaishman MA, Rodov V & Stover E (2008). The fig: botany, horticulture and breeding. *Horticultural Reviews*. 34:113 - 196.

Folch J, Less M & Sloan-Stanley GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 226: 497 - 509.

Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF). (2018). La agenda de la infancia y la adolescencia 2019-2024. Disponible en: [https://www.unicef.org/mexico/spanish/DT\\_PROCESO\\_ELECTORAL\(1\).pdf](https://www.unicef.org/mexico/spanish/DT_PROCESO_ELECTORAL(1).pdf).

Gagnière J & Bonnet M. (2017). Molecular mechanism underlying the actions of antioxidant molecules in digestive disorders En: Ed. Gracia-Sancho J & Salvadó J. *Gastrointestinal tissue oxidative stress and dietary antioxidants*. Academic Press. Barcelona, Spain. P. 197 - 216.

Gambino R, Musso G & Cassader M. (2011). Redox balance in the pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants and REDOX signaling*. 15(5): 1325 – 1365.

Goblan A, Al-Alfi M & Khan M. (2014). Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 7:587 - 591.

Graf S & Cecchini M. (2018). Identifying patterns of unhealthy diet and physical activity in four countries of the Americas: a latent class analysis. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 42: 1 - 10.

Haas JT, Francque S & Staels B. (2015). Pathophysiology and mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *Annual Review of Physiology*. 78: 181 - 205.

Hardy T, Oakley F, Anstee QM & Day CP. (2016). Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and disease spectrum. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 11: 451 - 496.

Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A & Ho DS. (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *Journal of Biological Chemistry* (279): 32804 - 32812.

Idowu Kazeem M, Adewunmi Akanji M, Toyin Yakubu M & Tom Ashafa AO. (2013). Protective effect of free and bound polyphenol extracts from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on the hepatic antioxidant and some carbohydrate metabolizing enzymes of streptozotocin-induced diabetic rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013: 1 – 7.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2018). Absence of excess body fatness. IARC handbook cancer prevention 16: 1 - 646. Disponible en: <http://publications.iarc.fr/570>

Jeong WS & Lachance PA. (2001). Phytosterols and fatty acids in fig (*Ficus carica*, var. Mission) fruit and tree components. Journal of Food Science. 66(2): 287 - 281.

Jones PJH, MacDougall DE, Ntanios F & Vanstone C. (1997). Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. The Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 75: 217 - 227.

Kamiloglu S & Capanoglu E. (2015). Polyphenol content in figs (*Ficus carica* L.): Effect of sun-drying. International Journal of Food Properties. 18: 521–535.

Kaur J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. Cardiology research and practice. 2019: 1-15.

Keshari AK, Verma AK, Kumar T & Srivastava R. (2015). Oxidative Stress: A review. The International Journal of Science & Technoledge. 3(7): 155 - 162.

Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Luvizzoto RAM, Sugizaki MM, Campos DHS, Da Silva DCT, Padovani CR & Cicogna AC. (2016). Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 49(4): 1 - 9.

Lin YC, Chang PF, Lin HF, Liu K, Chang MH & Ni YH. (2016). Variants in the autophagy-related gene IRGM confer susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease by modulating lipophagy. Journal of Hepatology. 65(6): 1209 - 1216

Liu K & Czaja MJ. (2013). Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death and Differentiation*. 20: 3 - 11.

Liu Y, Chen N, Ma Z, Che F, Mao J & Chen B. (2016). The changes in color, soluble sugars, organic acids, anthocyanins and aroma components in "Starkrimson" during the ripening period in China. *Molecules*. 21(6): 812 - 825.

Lizardi J, Becerra I & Tapia N. (2006). Prevalencia de hígado graso no alcohólico y síndrome metabólico en población asintomática. *Revista de Gastroenterología de México*. 71(4): 453 - 459.

Martínez-Domínguez V, González-Casas R, Mendoza-Jiménez J, García-Buey L & Moreno-Otero R. (2013). Etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 105(7): 409 - 420.

Mashav N & Shibolet O. (2015). Clinical aspects of nonalcoholic fatty liver disease. En: Ed. Tirosh O. *Liver metabolism and fatty liver disease*. CRC Press. Florida, USA. P. 3 - 26.

Mawa S, Husain K & Jantan I. (2013) *Ficus carica* L. (Moraceae): phytochemistry, traditional uses and biological activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 53: 1 - 8.

Menchú MT & Méndez H. (2012). Tabla de composición de alimentos de Centro América y Panamá. Guatemala: Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), 64 pp. Disponible en: [http://www.incap.int/index.php/es/publicaciones/doc\\_view/80-tabla-de-composicion-de-alimentos-de-centroamerica](http://www.incap.int/index.php/es/publicaciones/doc_view/80-tabla-de-composicion-de-alimentos-de-centroamerica)

Miller GT. (1959). Use of dinitrosalicylic acid (DNS) reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3): 426 - 428.

Muir LA, Neeley CK, Meyer KA, Baker NA, Brosius AM, Washabaugh AR, Barban OA, Finks JF, Zamarron BF, Flesher CG, Chang JS & O'Rourke RW. (2016).

Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: correlations with diabetes in human obesity. *Obesity*. 24(3): 597 - 605.

Nassir F, Rector S, Hammoud G & Ibdah J. (2015). Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis. *Gastroenterology and Pathology*. 11(3): 167 - 175.

Nissar AU & Tasduq SA. (2017). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radical Research*. 49(12): 1405 - 1418.

Norma Oficial Mexicana NOM-008-SSA3-2010, Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad. México, 7 de julio de 2010.

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-174-SSA1-1998, para el manejo integral de la obesidad. *Diario Oficial de la Federación*. México, 7 de diciembre de 1998.

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

Norris AW, Chen L, Fisher SJ, Szanto I, Ristow M, Jozsi, AC, Hirshman MF, Rosen ED, Goodyear LJ, Gonzalez FJ, Spiegelman BM & Kahn CR. (2003). Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinedion. *Journal of Clinical Investigation* 112(4): 608 - 618.

OECD (2017). Obesity Update. Disponible en: <http://www.oecd.org/health/health-systems/Obesity-Update-2017.pdf>.

Okumura T. (2011). Role of lipid droplets proteins in liver steatosis. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 67(4): 629 - 636.

Ore A & Akinloye OA. (2019). Oxidative stress and antioxidant biomarkers in clinical and experimental models of non-alcoholic fatty liver disease. *Medicina*. 55(2): 26 - 39.

Oyedeji KO, Okeke OE, Adeleke KO & Gboluwaga. (2019). Effect of amlodipine on hematological and biochemical parameters in male Wistar rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 26: 146 - 150.

Pandey A & Tripathi S. (2014). Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2(5): 115 - 119.

Parlee SD, Lentz SI, Mori H & MacDougald OA. (2014). Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. En: *Methods in enzymology*. Vol. 537. Academic Press. Michigan, USA. P. 93 – 122.

Piao L, Choi J, Kwon G & Ha H. (2017). Endogenous catalase delays high-fat diet-induced liver injury in mice. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. 21:317 - 325.

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

Rehman SU, Choe K & Hyun Yoo H. (2016). Review on a traditional herbal medicine, *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali): Its traditional uses, chemistry, evidence-based pharmacology and toxicology. *Molecules*. 21: 1 - 31.

Rivera Dommarco JA. (2014). Epidemiología de la obesidad en México. En: Ed. UNAM. *Obesidad en México, recomendaciones para una política de Estado*. Ciudad de México, México. p 92 - 118.

Rodríguez-González S, Pérez-Ramírez IF, Amaya-Cruz DM, Gallegos-Corona MA, Ramos-Gómez M, Mora O & Reynoso-Camacho R. (2018). Polyphenol-rich peach (*Prunus persica* L.) by-product exerts a greater beneficial effect than dietary fiber rich by product on insulin resistance and hepatic steatosis in obese rats. *Journal of Functional Foods*. 45: 58 - 66.

Rodríguez-Ramiro I, Vaozour D & Minhane AM. (2016). Polyphenols and non-alcoholic fatty liver disease: impact and mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society*. 75(1): 47 - 60.

Sanyal A. (2005). The pathogenesis of NASH: human studies. En: Farrell CG, George J, De la M HP & McCullough A. *Fatty liver disease: NASH and related disorders*. Blackwell Publishing. EUA. p 76 - 90.

Sarayu A, Renuka P, Falguni HP, Ila-Shruti G, Snehal NM, Malvika SG & Archana RJ. (2019). Plumbagin reduces obesity and nonalcoholic fatty liver disease induced by fructose in rats through regulation of lipid metabolism, inflammation and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 111: 686 - 694.

Sha Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CH, Feng Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 16: 26087 - 26124.

Sher Y & Hung M. (2013). Blood AST, ALT and UREA/BUN level analysis. *Bio-protocol*. 3(19): 1 - 4.

Shin SK, Cho HW, Song SE, Bae JH, Im SS, Hwang I, Ha H & Song D. (2019). Ablation of catalase promotes non-alcoholic fatty liver via oxidative stress and mitochondrial dysfunction in diet-induced obese mice. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 21: 1 - 15.

Sies H. (2018). On the history of oxidative stress: concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*. 7: 122 - 126.

Slavin M & Yu LL. (2012). A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans. *Food Chemistry*. 135: 2789 - 2795.

Softic S., Stanhope KL, Boucher J, Divanovic S, Lanaspa MA, Johnson NJ & Kahn CR. (2020). Fructose and hepatic insulin resistance. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 1 - 15. DOI: 10.1080/10408363.2019.1711360.

Solinas G, Boren J & Dullo A.G. (2015). *De novo* lipogenesis in metabolic homeostasis: more friend than a foe?. *Molecular Metabolism*. 4: 367 - 377.

Solomon A, Golubowicz S, Yablowicz Z, Grossman S, Bergman M, Gottlieb HE, Altman A, Kerem Z & Flashman A. (2006). Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(20): 7717 - 7723.

Spahis S, Delvin E, Borys JM & Levy E. (2017). Oxidative stress as a critical factor in nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Antioxidants & Redox Signaling*. 26(10): 519 - 541.

Stengel J & Harrison MD (2006). Nonalcoholic steatohepatitis: clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology & Hepatology*. 2(6): 440 - 449.

Sugimoto H, Okada KJ, Shoda J, Warabi E, Idhige K, Ueda T, Taguchi K, Yanagawa T, Nakahara A, Hyodo I, Ishii T & Yamamoto M. (2010). Deletion of nuclear factor- $\kappa$ B-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 298(2): G283 - 294.

Sumida Y, Niki E, Naito Y & Yoshikawa T. 2013. Involvement of free radicals and oxidative stress in NALFD/NASH. *Free Radical Research*. 47(11): 869-880.

Suzuki A & Diehl M. (2017). Nonalcoholic steatohepatitis. *Annual Review of Medicine*. 68(23): 1 -14.

Torres DM, Williams CD & Harrison SA. (2012). Features, diagnosis, and treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 10: 837 - 858.

Čolak E & Žorić L. (2019). Antioxidants and age-related macular degeneration. En: Ed. Preedy VR & Watson RR. *Handbook of nutrition, diet, and the eye*. Academic Press. Belgrade, Serbia. P. 85 - 106.

Tsuchida S. Glutathione transferases. (2002). En: Ed. Bertino JR. *Encyclopedia of Cancer*. Academic Press. San Diego, Missouri. P. 297-307.

Vallejo F, Marín JG, Tomás-Barberán FA. (2012). Phenolic compound content of fresh and dried figs (*Ficus carica* L.). *Food Chemistry*. 130: 485 - 492.

Van Raalte DH, Li M, Protchard PH & Wasan KM. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: a pharmacological target with a promising future. *Pharmaceutical Research*. 21(9): 1531 - 1538.

Videla-Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quiñones L, Varela N, Contreras J, Lazarte R & Csendes A. (2004). Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clinical Science*. 106: 261 - 268.

Vinson JA, Zuhik L, Bose P, Samman N & Proch J. (2005). Dried fruits: excellent *in vitro* and *in vivo* antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*. 24: 44 - 50.

Wenfeng L, Hongyan Y, Qiang Z, Xv W, Jing Z & Xin Z. (2019). Polyphenol-rich loquat fruit extract prevents fructose-induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease by modulating glycometabolism, lipometabolism, oxidative stress, inflammation, intestinal barrier, and gut microbiota in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 67(27): 7726 - 7737.

WHO. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO Technical Report Series, No. 894). Disponible en: [http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO\\_TRS\\_894/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/).

WHO. (2015). Ingesta de azúcares para adultos y niños. Ginebra, Suiza. Organización Mundial de la Salud (WHO/NMH/NHD/15.2). Disponible en: [https://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugars\\_intake/es/](https://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugars_intake/es/).

Wieckowska A & Feldstein AE. (2008). Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. *Seminars in Liver Disease*. 28(4): 386 - 395.

Wilcox G. (2005). Insulin and insulin resistance. *The Clinical Biochemistry Reviews*. 26: 19 - 39.

Williamson G & Sheedy K. (2020). Effects of polyphenols on insulin resistance. *Nutrients*. 12 (10): 3135.

Zhang Z, Yao Z, Chen Y, Qian L, Jiang S, Zhou J, Shao J, Chen A, Zhang F & Zheng S. (2018). Lipophagy and liver disease: new perspectives to better understanding and therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 97: 339 - 348.

Dirección General de Bibliotecas de la UJAQ

## 9. ANEXOS

### **Anexo 1.** Solución amortiguadora Tris/Sacarosa 0.35 M pH 7

- a) Pesar 7.9 g de Tris-HCl.
- b) Pesar 2.1 g de MgCl<sub>2</sub>.
- c) Pesar 1.9 g de KCl.
- d) Pesar 85.6 g de sacarosa ultra pura.
- e) Aforar a 1000 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

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

### **Anexo 2.** Solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 6.5

- a) Pesar 1.362 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- b) Pesar 2.67 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.
- c) Aforar a 500 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

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

### **Anexo 3.** Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6.5

- a) Pesar 4.725 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- b) Pesar 2.237 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.
- c) Aforar a 500 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

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

### **Anexo 4** Solución de trabajo para determinación de proteína

- a) Medir 10 mL de reactivo A.
- b) Agregar 200 µL de reactivo B.

### **Anexo 5.** Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 mM.

- a) Tomar 340 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.

**Anexo 6.** Solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.0

- a) Pesar 1.362 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .
- b) Pesar 2.67 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .
- c) Aforar a 500 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

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

**Anexo 7.** Solución de trabajo inicial GSH 3 mM

- a) Pesar 0.00184 g de GSH
- b) Disolver en 10 mL de metanol

Nota: Se debe almacenar en refrigeración, en recipiente ámbar.

**Anexo 8.** Solución de trabajo CDNB 2 mM

- a) Preparar una solución "stock" de 60 mM: pesar 0.0244 g de CDNB y disolver en 2 mL de metanol absoluto.
- b) Para preparar la solución de trabajo se mezclan 300  $\mu\text{L}$  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 9.** Solución amortiguadora de reacción Tris-EDTA pH 8.2

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

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

**Anexo 10.** Solución de trabajo inicial GSH

- a) Pesar 0.00184 g de GSH.
- a) Disolver en 10 mL de metanol.

Nota: Se debe almacenar en refrigeración.

**Anexo 11.** Solución de DTNB 2.46 mM (Preparar únicamente el volumen a ocupar)

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

Nota: Se debe almacenar en refrigeración

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ