
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS:

EVALUACIÓN DEL EFECTO HIPOLIPIDÉMICO-HEPATOPROTECTOR DE UN ALIMENTO FUNCIONAL ADICIONADO CON HARINA DE NOPAL (*Opuntia atropes*) Y XOCONOSTLE (*Opuntia joconostle spp*) MEDIANTE PRUEBAS *IN VIVO* USANDO RATAS WISTAR COMO MODELO BIOLÓGICO.

PRESENTA:

Q.F.B. DIANA JAZMÍN DUARTE MEDINA

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES
Temática en Biotecnología Alimentaria
del PIMCB

MORELIA MICHOACÁN, AGOSTO-2020



LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE ALIMENTOS

ÍNDICE

Contenido	
ABSTRACT	6
ABREVIATURAS	8
1.- INTRODUCCIÓN	10
1.1 Obesidad	10
1.2 Síndrome metabólico	11
1.2.1 Funciones endocrinas del tejido adiposo	11
1.3 Fisiopatologías del tejido adiposo	12
1.3.1 Obesidad y procesos inflamatorios	13
1.3.2 Obesidad y enfermedades cardiovasculares	13
1.3.4 Obesidad y daño hepático	17
1.4 Enfermedad de hígado graso no alcohólico	17
1.4.1 Patogenia de EHGNA	17
1.4.2 Diagnóstico de EHGNA	19
1.4.3 Tratamiento de EHGNA	20
1.5 Alimentación como factor clave en el tratamiento de obesidad y desórdenes metabólicos	20
1.5.1 Conversión de carbohidratos dietéticos a grasa corporal	21
1.5.2 Naturaleza de la grasa dietética y su efecto en el aumento de grasa corporal	22
1.5.3 Obesidad e hiperfagia	22
1.6 Tendencias alimentarias actuales	23
1.7 Alimentos funcionales	23
1.7.1 Nutraceuticos	24
1.7.2 Fitoquímicos	25
1.7.2.1 Carotenoides	25
1.7.2.2 Polifenoles	26
1.7.2.3 Betalaínas	26
1.7.2.4 Fitoesteroles	26

1.8 Fibra dietética.....	27
1.9 Formulación de alimentos funcionales.....	28
1.10 <i>Opuntia atropes</i> y <i>Opuntia joconostle spp</i> en México.....	29
1.11 Composición química de <i>Opuntia spp</i>	30
2. ANTECEDENTES.....	31
3. JUSTIFICACIÓN.....	34
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVOS.....	35
General.....	35
Específicos.....	35
6.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
6.1 Materia prima.....	37
6.2 Formulación de una galleta adicionada con harina de cladodio de <i>O. atropes</i> y <i>xoconostle de O. joconostle spp</i>	37
6.3 Análisis sensorial de galleta adicionada con harina de cladodio de <i>O. atropes</i> y <i>xoconostle de O. joconostle spp</i>	38
6.4 Análisis textural de galleta adicionada con harina de cladodio de <i>O. atropes</i> y <i>xoconostle de O. joconostle spp</i>	38
6.5 Análisis proximal de las galletas funcionales.....	39
6.6 Formulación de una dieta hiperlipídica para inducir obesidad e hígado graso no alcohólico en ratas Wistar.....	39
6.7 Ensayo preliminar <i>in vivo</i> , evaluación de una dieta hiperlipídica como promotor de obesidad e hígado graso no alcohólico en ratas Wistar como modelo biológico.....	40
6.8 Formulación de tres galletas funcionales adicionadas con harina de cladodio de nopal de <i>O. atropes</i> , harina de fruto <i>xoconostle de O. joconostle spp</i> , y harina <i>nopal-xoconostle</i>	41
6.9 Ensayo final <i>in vivo</i> , evaluación del efecto antiobesogénico y hepatoprotector de galletas adicionadas con 15 % de harina de nopal y <i>xoconostle</i> e incorporadas en una dieta hiperlipídica.....	42
6.10 Formulación de una dieta estándar para animales en mantenimiento y una dieta hiperlipídica promotora de obesidad e hígado graso no alcohólico.....	43
6.11 Formulación de tres dietas hiperlipídica, usando como alimento base galletas adicionadas con nopal y <i>xoconostle</i>	43

6.12 Sacrificio y obtención de muestras biológicas	44
6.13 Determinación de química sanguínea, perfil lipídico y perfil hepático de los sueros de las ratas Wistar	44
6.14 Determinación de triacilgliceroles hepáticos en hígados de ratas Wistar	44
6.15 Deshidratación de hígados de ratas Wistar.....	45
6.16 Determinación de lípidos totales en hígado de ratas Wistar.....	45
6.17 Obtención de extractos etanólicos de harina de cladodios de <i>Opuntia atropes</i> y frutos xoconostle de <i>Opuntia joconostle spp</i> para pruebas antioxidantes	46
6.18 Pruebas antioxidantes	46
6.19 Análisis estadístico.....	47
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
7.1 Análisis sensorial.....	48
7.2 Pruebas de textura.....	49
7.3 Análisis proximal de las galletas adicionadas con harina de cladodios de nopal <i>Opuntia atropes</i> y xoconostles de <i>Opuntia joconostle spp</i>	51
7.4 Inducción de obesidad e hígado graso no alcohólico en ratas Wistar alimentadas con una dieta hiperlipídica	52
7.5 Cuantificación de lípidos hepáticos	53
7.6 Perfil hepático	54
7.7 Formulación de dietas experimentales empleadas en el ensayo final <i>in vivo</i>	55
7.8 Composición calórica de las dietas experimentales	56
7.9 Ensayo final <i>in vivo</i> , evaluación del efecto antiobesogénico y hepatoprotector de galletas adicionadas con 15 % de harina de nopal y xoconostle e incorporadas en una dieta hiperlipídica.....	59
7.10 Ensayo final <i>in vivo</i> , cuantificación de triacilgliceroles hepáticos y grasa total en hígado de ratas Wistar	62
7.11 Perfil bioquímico de las ratas Wistar	63
7.12 Perfil hepático de las ratas Wistar.....	68
7.13 Pruebas antioxidantes de las harinas de cladodios de <i>O.atropes</i> y xoconostle de <i>O.joconostle spp</i>	70
8.- CONCLUSIONES	72

RESUMEN

La obesidad es un factor asociado con la alteración de rutas metabólicas celulares y desarrollo de síndrome metabólico, el cual se compone de padecimientos como, hipertensión arterial, dislipidemias, diabetes tipo 2, enfermedad de hígado graso no alcohólico (HGNA). Se estima que, en pacientes con obesidad, diabetes o dislipidemias la prevalencia de HGNA podría superar el 50%. La alimentación es un factor determinante en el desarrollo de obesidad, sobre todo al consumir alimentos hipercalóricos y deficientes en compuestos bioactivos. El nopal *O.atropes* y el xoconostle de *O.joconostle spp*, son fuente de fibras solubles (mucílago) e insolubles (celulosa, lignina). También poseen diversos antioxidantes de los grupos carotenoide, fenólico y betacianico. Diversos estudios *in vivo* han evidenciado el consumo de alimentos altos en compuestos bioactivos y la reducción de lípidos séricos, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, involucrados en la génesis y desarrollo de desórdenes metabólicos. Sin embargo, existen pocos estudios que demuestren el efecto que tienen los alimentos funcionales procesados sobre el síndrome metabólico, específicamente en la enfermedad de HGNA. En este proyecto de tesis se indujo obesidad y enfermedad de HGNA a ratas Wistar mediante una dieta hiperlipídica y se determinó si alimentos como el nopal y el xoconostle conservan su funcionalidad sobre la enfermedad de HGNA a pesar de su procesamiento. Se observó que la administración *ad libitum* de una dieta hiperlipídica durante 10 semanas, estableció dislipidemia diabética y enfermedad de HGNA a ratas Wistar. Por otra parte, la incorporación de 15% de harinas de nopal y xoconostle en la elaboración de una galleta que se usó como base para la formulación de las dietas experimentales, ayudó a reducir el depósito de triacilglicerol en hígado e incrementaron la síntesis de colesterol HDL. Los

resultados obtenidos indican que las harinas de nopal y xoconostle podrían usarse como parte de la formulación de alimentos que ayudan a mejorar los trastornos metabólicos.

Palabras clave: dislipidemia, hígado graso, dieta hiperlipídica, metabolitos secundarios, fibra.

ABSTRACT

Obesity is a factor associated with the alteration of cellular metabolic pathways and the development of metabolic syndrome, main conditions include high blood pressure, dyslipidemia, type 2 diabetes, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). in patients with obesity, diabetes or dyslipidemia, the prevalence of NAFLD could exceed 50%. Diet is a determining factor in the development of obesity, especially when consuming hypercaloric foods that are unhealthy. Aliments how nopal *O.atropes* and the xoconostle of *O.joconostle* spp, are a source of soluble (mucilage) and insoluble fibers (cellulose, lignin). This foods also have various antioxidants from the carotenoid, phenolic and betacyanic groups. Studies in humans and rodents have shown that the constant the consumption of foods high in bioactive compounds improves serum lipids levels and decrease reactive species of oxygen and nitrogen in plasma, involved in the genesis and development of metabolic disorders. However, there are few studies that demonstrate functional foods preserve the beneficial properties after making process and have effect on metabolic syndrome, specifically in NAFLD diseases. In the present work, the obesity induced by an hyperlipidemic diet in Wistar rats was studied and it was determinated if possible foods such as nopal and xoconostle retain or no their functionality on NAFLD disease after the elaboration process. The administration of a hyperlipidic diet was set on a group of Wistar rats *ad libitum* for 10 weeks with the purpose to establish diabetic dyslipidemia and NAFLD disease. It was observed that incorporation of cookies made with 15% of nopal and xoconostle flours in hiperlipidic diets formulation have

beneficial effect in decreasing triacylglycerols deposit in liver and increased the synthesis of HDL cholesterol in wistar rats. Overall, the results indicate that nopal and xoconostle flours could be used in elaboration of functional foods that help improve metabolic disorders.

Key words: prickly pear, xoconostle, hyperlipidic diet, non-alcoholic fatty liver.

ABREVIATURAS

Abrev.	Término	Abrev.	Término	Abrev.	Término
AACC	Asociación Americana de Químicos de Cereales	FA	Free acid	RBP-4	Proteína de unión al retinol 4
AGL	Ácidos grasos libres.	FasL	Proteína transmembrana tipo II	RLO	Radical libre de oxígeno
AIN-93	Dietas de roedores del Instituto Americano de Nutrición	FD	Fibra dietética	ROS	Reactive oxygen species
ALB	Albúmina	GGT	Gamma glutamil transpeptidasa	SAM	S-adenosilmetionina
ALP	Fosfatasa alcalina	GGTP	Gamma glutamil transpeptidasa	SCFA	Short-chain fatty acids
ALT	Alanina aminotransferasa	GMIX	Galleta mixta	SREBP-1C	Proteína 1 de unión a los elementos regulatorios de esteroides
ANOVA	Análisis de varianza	GNOP	Galleta nopal	TAB	Tejido adiposo blanco
AOAC	Asociación de Químicos Agrícolas Oficiales	GXO	Galleta xoconostle	TAM	Tejido adiposo marrón
ApoB	Apolipoproteína B-100	HDL	High density lipoprotein	TGF- β1	Factor de crecimiento transformante β 1

AR	Almidón resistente	HNE	4-Hydroxynonenal	TGH	Triacilglicéridos hepáticos
AST	Aspartato aminotransferasa	IC50	Concentración inhibitoria media máxima	TNF-α	Factor de necrosis tumoral
BT	Bilirrubina total	IL-1, IL-2, IL-6, IL-8	Interleucinas	VLDL	Very low density lipoprotein
CEL K562	Línea celular de leucemia mielógena	IMC	Índice de masa corporal	Y- GT	Y-glutamil transferasa
CETP	Proteína de transferencia de éster de colesterol	Kcal	kilocaloría		
DHL	Dieta hiperlipídica	LDL	Low density lipoproteins		
DIRE	Dieta referencia	MDA	Malondialdehído		
DMIX	Dieta Mixta	• OH	Radical hidroxilo		
DNOP	Dieta nopal	PBS	Buffer fosfato salino		
DPPH	2,2-difenil-1-picrylhydrazyl	PGC	Porcentaje de grasa corporal		
DXO	Dieta xoconostle	PT	Proteína total		
EHGNA	Enfermedad de hígado graso no alcohólico	PYY	Péptido YY		

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Obesidad

La obesidad se caracteriza por una acumulación excesiva de energía en forma de triacilglicérolas en el tejido adiposo blanco. Es consecuencia de un desequilibrio energético, asociado al comportamiento no adecuado de alimentación y de poca actividad física, así como a factores biológicos que desempeñan un papel en la regulación de la producción de energía. La obesidad contribuye al desarrollo de síndrome metabólico, desencadenando así procesos crónico degenerativos como la diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, hígado graso no alcohólico y algunos tipos de cáncer^{1,2}.

Un indicador de obesidad es el índice de masa corporal (IMC), se obtiene dividiendo el peso corporal en kg, sobre la altura en m². Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), personas con un IMC que oscila entre 25 y 29.9 kg/m² se clasifican con sobrepeso mientras que valores mayores o igual a 30 kg/m² son consideradas obesas³. Sin embargo, el IMC no es un indicador ideal de obesidad, esto debido a que está significativamente influido por la masa magra, aún en los pacientes obesos. Una de las limitantes en la determinación del IMC es que no tiene suficiente exactitud para evaluar el sobrepeso y la obesidad en personas físicamente activas. Se ha observado que en personas con acondicionamiento físico el IMC es alto, debido a que el músculo es más denso que la grasa y aumenta el peso. Sin embargo, el porcentaje de grasa es normal e incluso menor. Otra herramienta para determinar obesidad con mayor precisión en personas físicamente activas, es la bioimpedanciometría, la cual mide el porcentaje de grasa corporal (PGC). Los valores considerados como criterios de obesidad son: porcentajes de grasa corporal iguales o mayores de 20.8% en hombres y 35.0% en mujeres⁴⁻⁹.

1.2 Síndrome metabólico

Las cinco variables de detección utilizadas para identificar a las personas con síndrome metabólico son, la circunferencia de la cintura, los niveles circulantes de triacilglicérols y de colesterol, de lipoproteínas de alta densidad (HDL), la glucemia en ayunas, y la presión arterial. Un metaanálisis de estudios realizados en humanos ha demostrado que la presencia del síndrome metabólico aumenta el riesgo de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares^{10,11}.

1.2.1 Funciones endocrinas del tejido adiposo

Existen dos tipos de tejido adiposo, tejido adiposo blanco (TAB) y tejido adiposo marrón (TAM). El TAB, se encarga del almacén de energía en forma de triacilglicérols cuando existe un aporte de energía excesivo, por otra parte, cuando existe una baja ingesta energética su papel es movilizar los depósitos de lípidos a través de la sangre a otros tejidos donde serán oxidados para obtener energía. En contraste, el TAM tiene la función fisiológica de metabolizar los ácidos grasos produciendo calor. Las diferencias funcionales y el equilibrio entre el TAB y el TAM contribuyen al mantenimiento del balance energético del organismo^{12, 13}.

El TAB además de ser un reservorio de triacilglicérols, tiene funciones endocrinas. Es productor de numerosos péptidos denominados adipocinas las cuales están involucradas en la regulación de diferentes procesos fisiológicos y metabólicos, como son:

- 1) Regulación de la ingesta y del balance energético, regulado por la leptina.
- 2) Regulación de la presión sanguínea, donde interviene el angiotensinógeno.
- 3) Metabolismo lipídico regulado por la proteína de unión al retinol 4 (RBP-4) y la proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP).
- 4) Homeostasis glucídica, dirigido por adiponectina, resistina y visfatina.

El tejido adiposo también produce numerosas citocinas proinflamatorias, como el TNF- α y las interleucinas IL-1, IL-6, IL-8 entre otras^{14, 15}.

1.3 Fisiopatologías del tejido adiposo

La hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo asociadas a la obesidad, pueden causar hipoxia y la activación de distintas respuestas celulares entre las que se encuentran, estrés oxidativo e inflamación y desencadenar enfermedades crónico degenerativas¹⁶.

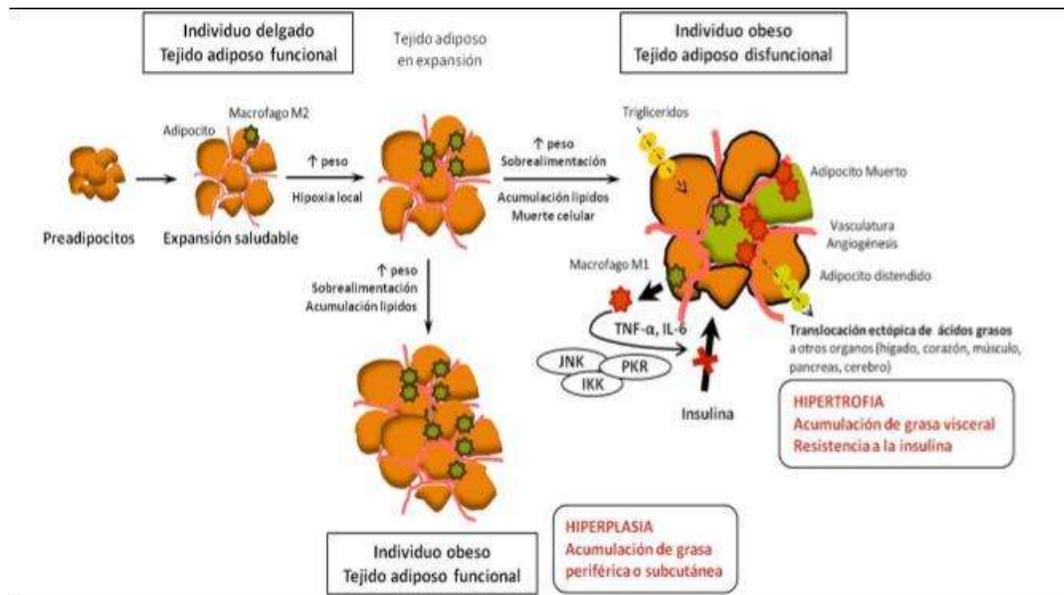


Figura 1. Flexibilidad del tejido adiposo: hipertrofia (crecimiento en tamaño) e hiperplasia (crecimiento en número) de los adipocitos; señalización de inflamación y resistencia a la acción de la insulina en el tejido adiposo; traslocación ectópica de ácidos grasos. El crecimiento excesivo del tejido adiposo en condiciones de obesidad causa una disminución de la vascularización del tejido adiposo provocando hipoxia en los adipocitos periféricos lo que induce a la producción de citocinas pro-inflamatorias que activa las kinasas de estrés y perpetua un estado inflamatorio que promueve la infiltración de macrófagos y un cambio de fenotipo de macrófagos de tipo M2 a M1 pro-inflamatorio, dando lugar a un remodelado de su estructura y posterior inflamación con repercusiones tanto a nivel local como sistémico [TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa; IL-1 β , IL-6, interleucinas -1 β , -6; JNK, N-terminal c-JUN; IKK, inhibidor de la kinasa del factor nuclear kappa β ; PKR, proteína kinasa R]. Tomado de Rodríguez-Casado¹ et al., 2016

1.3.1 Obesidad y procesos inflamatorios

La expansión del tejido adiposo no solo aumenta el grado de infiltración de macrófagos del tejido adiposo, sino que además provoca un cambio en la polarización de los macrófagos que pasarían de ser de tipo M2, con un perfil secretor antiinflamatorio, a tipo M1, con un perfil secretor proinflamatorio¹⁴. Las citocinas están involucradas en muchos procesos biológicos como, inflamación, inmunidad, crecimiento, diferenciación, división celular y apoptosis. Se ha observado que IL-6 en el hígado afecta la señalización de insulina, además, se demostró que la IL-6 induce oxidación de ácidos grasos y lipólisis. Por otra parte, estudios *in vivo* e *in vitro* mostraron que TNF- α participa en el metabolismo de los adipocitos y en la expresión de muchos genes adiposos específicos, como la lipoproteína lipasa (LPL). También estimula la lipólisis, lo que conduce a una disminución de la acumulación de triglicéridos en adipocitos y la acumulación de estos en otros tejidos como el hepático. Otras interleucinas como la 1, participa en el control de apetito, un estudio mostro que animales con deficiencia de receptor de IL-1 son resistentes a la leptina¹⁷⁻²³.

1.3.2 Obesidad y enfermedades cardiovasculares

En estados de obesidad visceral, el tamaño y la densidad de las lipoproteínas LDL son más pequeñas y más densas. Estudios han demostrado, que las partículas pequeñas y densas de LDL tienen una mayor capacidad de penetración dentro de la pared vascular, y tienen una alta susceptibilidad a la oxidación. Por lo tanto, son potencialmente aterogénicas, lo que aumenta el riesgo de desarrollar enfermedad de las arterias coronarias. Un estudio cardiovascular de Quebec, mostró que los hombres que tenían algunas de las características metabólicas clave de la obesidad visceral, por ejemplo, hiperinsulinemia en ayunas, LDL pequeñas, densas y altas

concentraciones de apolipoproteína B (Apo B), tenían un riesgo muy alto de tener un primer evento cardiovascular²⁴⁻²⁶.

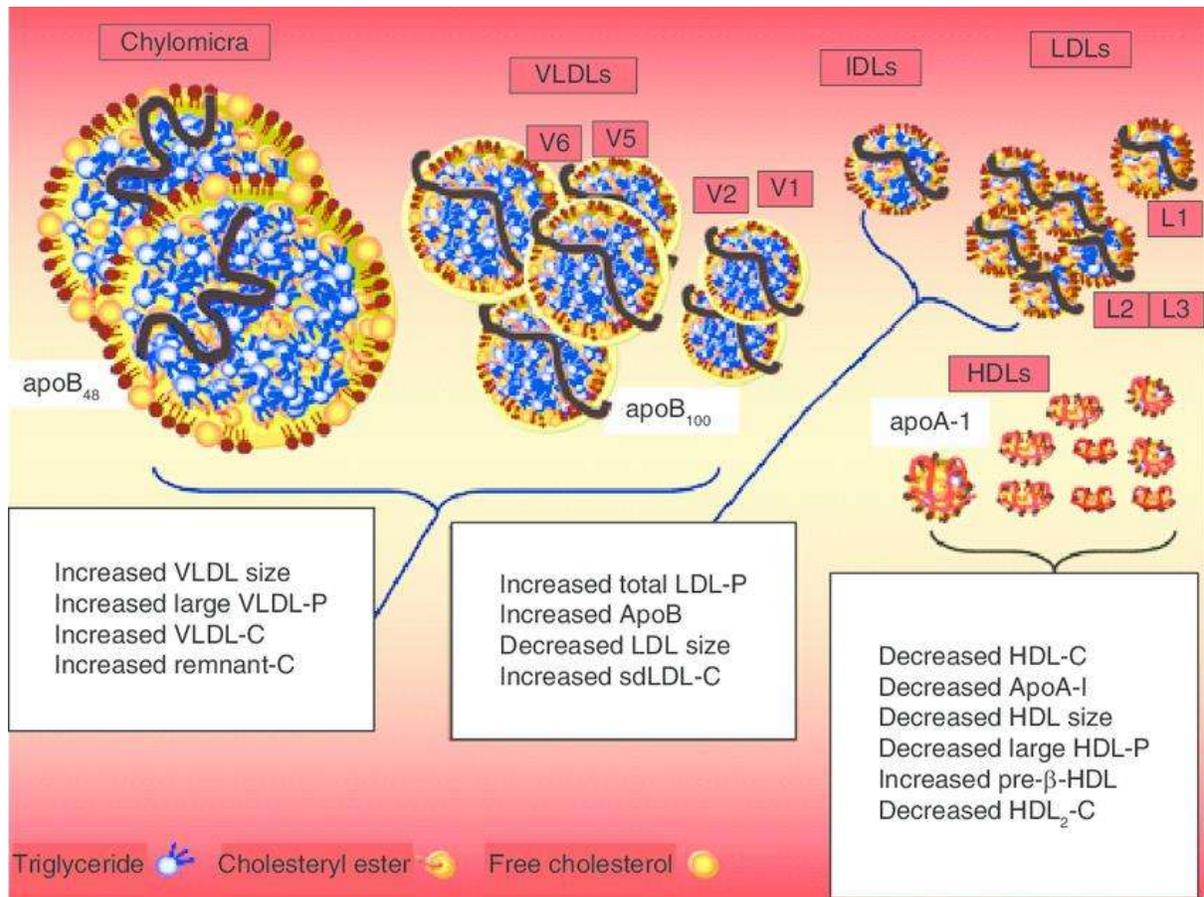


Figura 2. Las lipoproteínas son heterogéneas en tamaño y composición. La espectroscopía de resonancia magnética nuclear no puede distinguir entre quilomicrones y VLDL y se informa que las personas con hipertrigliceridemia tienen un mayor tamaño de VLDL y un gran número de partículas de VLDL, aunque algunas pueden ser quilomicrones. Hay un aumento de VLDL-C y, a menudo, remanente-C. Hay aumento de apoB, LDL-P total, LDL-P pequeño, sdLDL-C y, por lo general, disminución del tamaño de LDL. Hay un HDL-C reducido debido a la disminución del tamaño total de HDL-P, apoA-I, HDL-P y HDL grandes, pero mayores concentraciones de pre-β-HDL. apo: apolipoproteínas; HDL-C: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; HDL-P: recuento de partículas de lipoproteínas de alta densidad; LDL-C: colesterol de lipoproteínas de baja densidad; LDL-P: recuento de partículas de lipoproteínas de baja densidad; sdLDL-C: colesterol de lipoproteínas de baja densidad, pequeño y denso; VLDL-C: Tomado de James M Backes et al., 2014.

1.3.3 Obesidad y resistencia a la insulina

En la resistencia a la insulina suelen presentarse eventos de hipersecreción de insulina, esta hiperinsulinemia compensatoria mantiene los niveles de glucosa bajo control. Sin embargo, esta situación deteriora progresivamente al páncreas ocasionado el llamado fracaso pancreático. Sucede cuando las células beta al ser sobreestimuladas, pierden la capacidad de secretar insulina o lo hacen en una cantidad inferior, se ha observado que pacientes obesos presentan niveles altos de insulina²⁷.

La acumulación ectópica de lípidos de forma directa o indirecta puede interferir con la señalización de la insulina, lo que ha llevado al concepto de lipotoxicidad. Este límite puede variar de un individuo a otro. Es decir, mientras que un individuo pueda mantener la expansión del tejido adiposo sin acumulación ectópica del mismo, podrá mantener la normalidad metabólica, sin desarrollar resistencia a insulina. Sin embargo, a mayor adiposidad la probabilidad de alcanzar el límite de expansión de tejido graso es mayor, lo que explica el mayor índice de resistencia a insulina y de diabetes tipo 2 en individuos obesos²⁸. Estudios previos han demostrado que durante episodios de obesidad disminuye la concentración plasmática de adiponectina, la cual es una hormona secretada por el tejido adiposo involucrada en la señalización de la insulina²⁹. Otro estudio relaciona el efecto de dietas hiperlipídicas administradas a ratones y el desarrollo de resistencia a insulina, niveles elevados de ácidos grasos y TNF- α en plasma y su relación con interferencias en la cascada de señalización de la insulina³⁰.

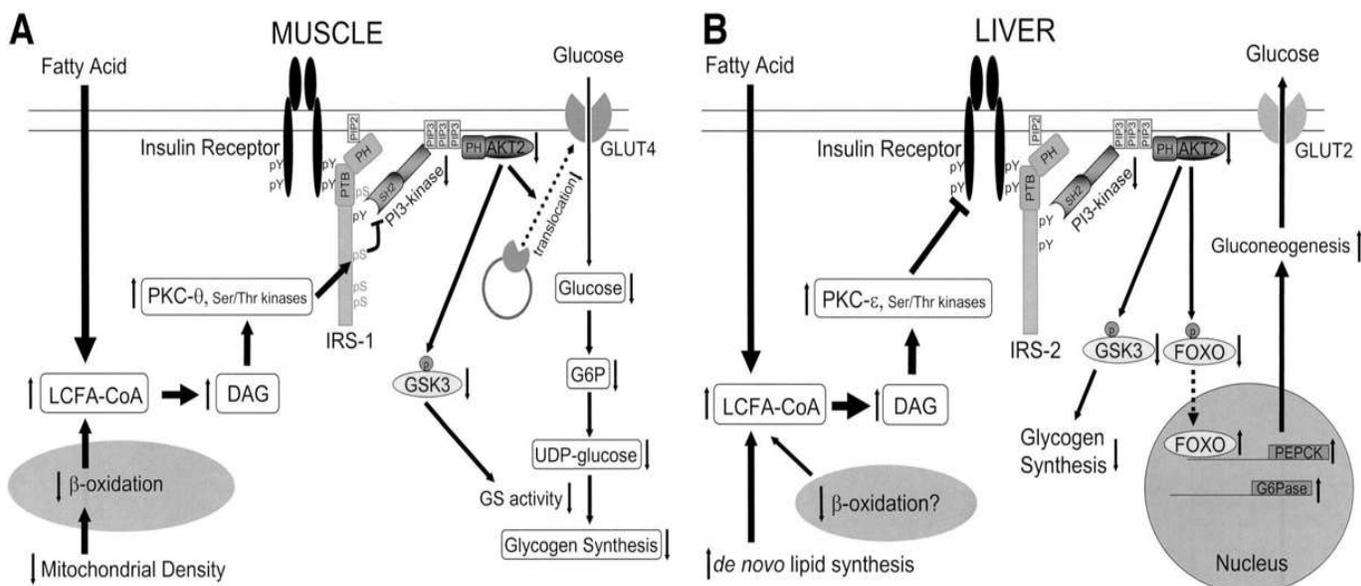


Figura 3. Mecanismo molecular de la resistencia a la insulina inducida por la grasa en el músculo esquelético (A) y el hígado (B). A : Los aumentos de los acil CoA grasos intramiocelulares y el diacilglicerol debido al aumento del suministro desde el plasma y / o la reducción de la β -oxidación debido a la disfunción mitocondrial activan las serina / treonina quininas, como la proteína quinasa C (roedores PKC-, PKC- β y humanos) en el músculo esquelético. Las quininas activadas fosforilan los residuos de serina en IRS-1 e inhiben la actividad de PI 3-quinasa inducida por insulina, lo que da como resultado una actividad reducida de AKT2 estimulada por insulina. La actividad reducida de AKT2 no puede activar la translocación de GLUT4 y otros eventos dependientes de AKT2 posteriores, y en consecuencia se reduce la absorción de glucosa inducida por insulina. si: Aumentos en el contenido de diacilglicerol hepático debido al aumento de la entrega de ácidos grasos desde el plasma y / o el aumento de la síntesis de lípidos de *novo* y / o la reducción de la β -oxidación activan la proteína quinasa C- ϵ (y potencialmente otras serina quininas), lo que conduce a un receptor de insulina reducido la actividad de la quinasa y la reducción de la fosforilación de la tirosina IRS-2, lo que da como resultado una estimulación reducida de la insulina de la activación de la glucógeno sintasa y una disminución de la fosforilación de la proteína O de caja de horquilla (FOXO), lo que conduce a un aumento de la gluconeogénesis hepática. DAG, diacilglicerol; PTB, dominio de unión a fosfotirosina; PH, dominio de homología de pleckstrina; SH2, dominio de homología src; GSK3, glucógeno sintasa quinasa-3. Tomado de Katsutaro-Morino et al., 2006.

1.3.4 Obesidad y daño hepático

La acumulación ectópica de lípidos en el hígado ocasionada por el deterioro del tejido adiposo, conduce a un depósito extra de lípidos en las vesículas lipídicas de los hepatocitos, formándose grandes vacuolas (esteatosis), acompañadas de una serie de estados patológicos que pueden conducir a la disfunción celular y apoptosis del hepatocito³¹.

1.4 Enfermedad de hígado graso no alcohólico

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) se caracteriza por el aumento de triglicéridos intrahepáticos (esteatosis) con o sin inflamación y fibrosis (es decir, esteatohepatitis). Se produce cuando un 5% del peso total del hígado corresponde a grasa. Histológicamente si el 5% o más de los hepatocitos contienen triglicéridos intracelulares visibles³².

La génesis de EHGNA involucra una serie de factores como la captación plasmática de ácidos grasos libres a través de la vena porta y la arteria hepática, lisis de los adipocitos por estrés oxidativo y acumulación ectópica de grasa en el hígado, expresión de genes como SREBP-1c que estimulan la lipogénesis en hígado, entre otros³³.

1.4.1 Patogenia de EHGNA

La génesis de EHGNA se asocia con la resistencia a la insulina y se explica como la teoría del "doble impacto". En el "primer impacto", la disminución en la capacidad celular de responder a la acción de la insulina produce una hiperinsulinemia compensatoria. En el tejido adiposo actúa sobre la lipasa sensible a hormonas, favoreciendo la lipólisis con la consecuente liberación de ácidos grasos libres al hígado. En el músculo esquelético disminuye la absorción de glucosa, mientras que en el hepatocito la hiperinsulinemia aumenta la gluconeogénesis, disminuye la glucogenosíntesis y aumenta la captación de los ácidos grasos libres,

altera el transporte de triglicéridos como VLDL e inhibe su beta-oxidación. Estas alteraciones en el metabolismo de las grasas son la base de la aparición de esteatosis hepática.

El "segundo impacto" es consecuencia del estrés oxidativo en hepatocitos que se compensa al principio por los mecanismos antioxidantes celulares; sin embargo, la sobrecarga hepática de AGL genera radicales libres de oxígeno (RLO) en la cadena mitocondrial que actúan sobre los ácidos grasos de las membranas celulares causando peroxidación lipídica. Los RLO inducen la síntesis de citocinas proinflamatorias por las células de Kupffer y los hepatocitos, tales como:

- a) Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que activa la vía de las caspasas y conlleva a la apoptosis de los hepatocitos.
- b) Factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1), que activa la síntesis de colágeno por las células estrelladas.
- c) Ligandos Fas que ocasionan "muertes fratricidas" en los hepatocitos adyacentes.
- d) Interleucina 8 (IL-8), potente quimiotáctico de neutrófilos.

Los productos finales de la peroxidación lipídica, el 4-hidroxinonenal (HNE) y el malonildialdehído (MDA), también están implicados en la génesis de lesiones hepáticas por toxicidad directa, pueden intervenir en la formación de cuerpos de Mallory e incrementan la síntesis de colágeno por las células estrelladas; además el HNE tiene actividad quimiotáctica de neutrófilos. Esta segunda fase explicaría la evolución hacia fenómenos necroinflamatorios, fibrosis y cirrosis hepática³⁴.

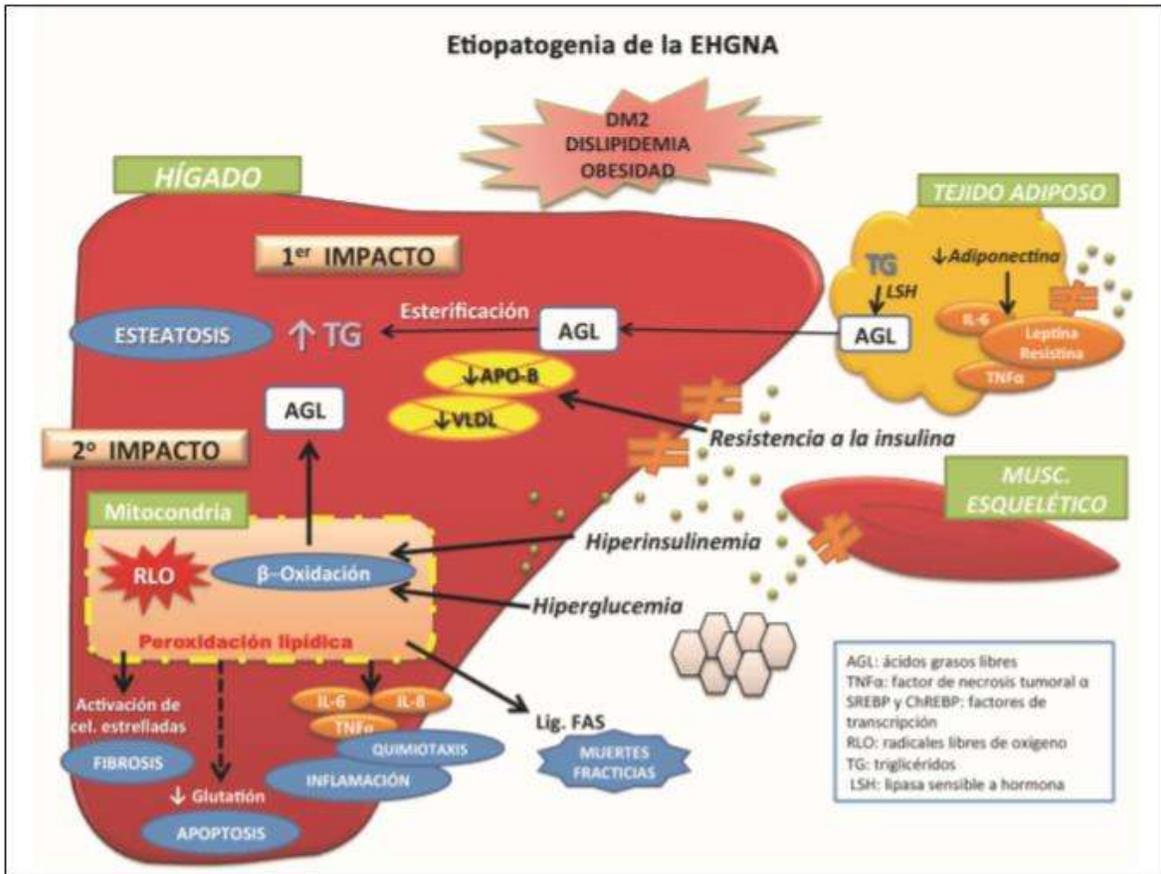


Figura 3. Etiopatogenia de la EHGNA Tomado de Martín Domínguez et al., 2013.

1.4.2 Diagnóstico de EHGNA

La EHGNA, comúnmente es asintomática y suele diagnosticarse por elevaciones medias de (1.5 a 4 veces) de las aminotransferasas (ALT y AST), la fosfatasa alcalina (FA) y la γ -glutamil transferasa (γ -GT) en suero. En casos severos de la enfermedad se ha observado un concomitante aumento en la AST, al igual que en la proporción de AST/ALT. No obstante la biopsia de hígado y el análisis histopatológico son las únicas pruebas confirmatorias hasta el momento para el diagnóstico de la EHGNA y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) ³⁵.

1.4.3 Tratamiento de EHGNA

Se ha demostrado que la pérdida de peso en un 7% a 10% puede mejorar ciertos parámetros fisiológicos como la actividad de las transaminasas, por lo que una dieta balanceada y actividad física son factores clave en el tratamiento de EHGNA. Un estilo de vida más saludable acompañado de farmacoterapia ha presentado buenos resultados en el tratamiento de la enfermedad. Los fármacos más empleados para el tratamiento de EHGNA suelen ser inhibidores de la lipasa entérica, los cuales reducen la absorción intestinal de grasa, especialmente de triglicéridos. Otros estudios han mostrado que el uso de ácidos grasos poliinsaturados como los omega-3 reducen la EHGNA y mejorando la EHNA. La vitamina E también ha mostrado resultados favorables en adultos con EHGNA. En un estudio con 49 individuos tratados diariamente con 1000 IU de Vitamina E y 1000 mg de vitamina C, se observaron mejorías en la fibrosis. Otro antioxidante es la betaína (metabolito de la colina), que incrementa los niveles de la s-adenosil metionina (SAM) y disminuye el estrés oxidativo. Los niveles elevados de SAM en estudios con animales sugieren una mejora de la esteatosis³⁶⁻³⁸.

1.5 Alimentación como factor clave en el tratamiento de obesidad y desórdenes metabólicos

La alimentación es un factor que en gran medida contribuye al desarrollo y evolución de la obesidad y sus complicaciones como el síndrome metabólico. El aumento de la densidad energética de la dieta, baja ingesta de vegetales, frutas, cereales de grano entero y actividad física, son los principales factores que contribuyen al desarrollo de obesidad y enfermedades metabólicas (enfermedades cardiovasculares, dislipidemias, diabetes mellitus tipo 2, hígado graso no alcohólico y ciertos tipos de cáncer).

El gasto total de energía y la ingesta total de energía no son sólo los factores que regulan la grasa corporal. El origen de las calorías determina el estado de equilibrio energético, carbohidratos y proteínas parecen estar estrictamente regulados para alcanzar un estado de equilibrio, pero con los lípidos no pasa lo mismo. De acuerdo con la ingesta de alimentos, el balance de nitrógeno y carbohidratos son aliviados por la capacidad del organismo para ajustar los aminoácidos y las tasas de gluco-oxidación, respectivamente. En el caso de la grasa, este mecanismo es considerablemente menos preciso; un aumento de la ingesta de grasa no estimula su oxidación. Además, la grasa dietética se almacena de manera muy eficiente como grasa corporal (eficiencia de conversión sobre 96%), a mayor ingesta de grasa conducirá a un balance de grasa positivo y, en consecuencia, a la acumulación de masa adiposa. Los carbohidratos y las grasas son los macronutrientes más significativos en la dieta en términos de kilocalorías, debido a que los ácidos grasos y la glucosa son los sustratos más importantes en la entrega de energía al cuerpo³⁹.

1.5.1 Conversión de carbohidratos dietéticos a grasa corporal

Se sabe que la ingesta elevada de carbohidratos aumenta las reservas de glucógeno, que por lo general son pequeñas, esta información apuntan a un equilibrio de carbohidratos controlado por el cuerpo, por lo que este nutriente tiene una baja relación con el depósito de grasa corporal. Algunos estudios en humanos han mostrado que, incluso después de una ingestión elevada de carbohidratos (5000 kcal, 85% de carbohidratos) durante varios días y después de la saturación de la reserva de glucógeno, sólo 150 g/día de lípidos se sintetizan. Por otro lado, aunque algunos estudios demostraron que la reducción en la ingestión de carbohidratos podría estimular el consumo de alimentos para reponer las reservas de glucógeno del cuerpo, sugieren que no sólo el glucógeno influye sobre los mecanismos de saciedad, sino también factores como las adaptaciones metabólicas, la energía y el equilibrio de nutrientes⁴⁰.

1.5.2 Naturaleza de la grasa dietética y su efecto en el aumento de grasa corporal

La calidad de la ingesta de alimentos y no solo la cantidad, repercuten en la ganancia de peso o pérdida de peso. Además del contenido de grasa dietética, el tipo de grasa parece un determinante del aumento de la grasa corporal. Un estudio demostró que ratas alimentadas con diferentes dietas hiperlipídica durante siete semanas (58% de calorías procedentes de la grasa) y ricas en lípidos saturados (32% de la composición total de ácidos grasos), desarrollaron una mayor adiposidad corporal en comparación con los animales alimentados con omega-6 (78% del ácido graso total (42% de la composición total de ácidos grasos) y en comparación con el grupo de control. Por lo tanto, el equilibrio energético puede estar regulado por el equilibrio lipídico⁴¹⁻⁴².

1.5.3 Obesidad e hiperfagia

La reducción de la secreción de leptina o una limitación en su acción, está entre los mecanismos que asocian a la obesidad y la hiperfagia. La leptina es una hormona secretada principalmente por tejido adiposo blanco y que actúa en el sistema nervioso para aumentar la saciedad.

Otro dato importante es que en individuos obesos se ha observado que el péptido YY (PYY) que es secretado por las células intestinales después de la ingesta de alimentos y cuya función es inhibir la ingesta de alimentos, se encuentra en niveles más bajos que en los individuos normales, por lo que este mecanismo de saciedad es menos eficiente en el primer caso. También se ha observado que la ghrelina, que se sintetiza y secreta primordialmente en el estómago y estimula la ingesta de alimentos, en las personas obesas los niveles de ghrelina se incrementan, incluso después de que se consume una comida, estimulando el hambre^{43,44}.

1.6 Tendencias alimentarias actuales

La creciente necesidad de comer fuera de casa tiene una influencia negativa en el comportamiento alimenticio de las personas. El uso de restaurantes o comida envasada de fácil acceso y lista para consumir, generalmente son alimentos muy energéticos y las porciones de mayor tamaño. Estudios muestran que las personas tienen problemas para estimar con precisión la información del tamaño de una porción, especialmente a medida que aumenta el tamaño de la porción. Las comidas de "Super-tamaño", probablemente fomentan el consumo de porciones más grandes. De hecho, hay algunas investigaciones experimentales que apoyan esta suposición. En una serie de cinco estudios, tamaños de envases más grandes de productos familiares de marca alentaron el uso de más productos que los tamaños de envases pequeños. Este efecto se asoció con la percepción de menor costo unitario. La información mediante tablas nutrimentales del contenido calórico y las porciones de los productos, es esencial para aumentar el conocimiento, la conciencia y el comportamiento de las personas a la hora de elegir sus alimentos y así motivar a los fabricantes de alimentos para mejorar los atributos nutricionales de sus productos⁴⁵.

1.7 Alimentos funcionales

Los productos alimenticios funcionales se han definido como alimentos que proporcionan un beneficio para la salud adicional al valor nutricional tradicional del producto. El motivo principal del consumidor para adquirir alimentos funcionales es el creciente deseo de usar el alimento para ayudar a prevenir enfermedades crónicas como las cardiovasculares, diabetes, Alzheimer o para optimizar la salud, por ejemplo aumentando la energía, impulso del sistema inmunitario, generación de bienestar.

A los alimentos funcionales se les puede incorporar compuestos bioactivos entre los que se encuentran, antioxidantes, probióticos, prebióticos, lípidos vitaminas y minerales, entre otros. También se considera un alimento funcional aquel que elimina de su formulación algunos compuestos dañinos para algunas personas, como ocurre con la leche deslactosada, los panes sin gluten, los reducidos en grasa, colesterol, azúcares y sodio, entre otros que ayudan a evitar enfermedades crónicas degenerativas. Es decir, son alimentos que promueven la salud, siempre y cuando la modificación tenga un efecto comprobado, para lo cual debe considerarse la cantidad consumida, en caso de los agentes añadidos y su biodisponibilidad.

Un alimento se considera funcional si durante su procesamiento ocurre alguno de los siguientes fenómenos:

- a) Eliminación de un componente conocido como causante de una enfermedad. Ejemplo: las proteínas alergénicas.
- b) Incremento en la concentración de un componente alimenticio. Esta fortificación hace que su dosis diaria se acerque a las recomendaciones correspondientes.
- c) Adición de un componente que no está presente en el alimento.
- d) Reemplazo de macronutrientes. Quitar grasas y agregar sus correspondientes sustitutos⁴⁶⁻⁴⁸.

1.7.1 Nutracéuticos

Se refiere a compuestos bioactivos cuyo consumo beneficia la salud humana, con capacidad preventiva o terapéutica. Incluye los fitoquímicos, sustancias que se encuentran de manera natural en el reino vegetal sobre todo en frutas y verduras. Otros grupos de nutracéuticos se sintetizan químicamente y así se emplean como aditivos en forma de polvos, líquidos o microencapsulados y nanoencapsulados; estos últimos menores de 100 (nm), muy estables, cuyo agente activo es altamente biodisponible y se libera de forma controlada por la acción de secreciones



específicas al organismo en un proceso llamado nanoterapia. Los nutraceuticos pueden ser de origen vegetal, animal, mineral y existen diversas formas de clasificarlos; una de las cuales es por su función biológica dado que pueden ser antioxidantes, anticancerígenos, hipocolesterolémicos, antiinflamatorios, osteogénicos y antibacteriales; otra es por su estructura química^{46,49,50}.

1.7.2 Fitoquímicos

Son compuestos del reino vegetal con una bioactividad benéfica para el organismo humano. No son nutrientes indispensables, como los aminoácidos y las vitaminas, pero cumplen una función biológica importante como antioxidantes, antiinflamatorios, antiobesogénicos, hipolipemiantes. Muchos actúan como agentes protectores de la planta contra sus depredadores naturales y otro como moléculas en las vías de señalización de las plantas⁴⁶.

1.7.2.1 Carotenoides

Son metabolitos secundarios de las plantas, igual que los terpenos derivan su estructura del isopreno $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$, de manera que son moléculas insaturadas, lo que les confiere actividad antioxidante. Los carotenoides se dividen en carotenos y xantófilas; los carotenos como el β -caroteno y el licopeno, son verdaderos hidrocarburos, mientras que las xantófilas contienen oxígeno, como en la astaxantina y la luteínas entre otros. Debido a sus dobles enlaces presentan una actividad antioxidante inhibiendo al oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno y radicales libres, por lo que tiene una actividad inhibitoria de la oxidación de las grasas, también son precursores de la vitamina A⁵¹⁻⁵³.

1.7.2.2 Polifenoles

Son una amplia gama de metabolitos secundarios a base de uno o más anillos aromáticos y, al menos, un sustituyente hidroxilo. Existen dos grandes grupos: los ácidos fenólicos (benzoico y cinámico) y los flavonoides (antocianinas y taninos), se les adjudican efectos antioxidantes, antiinflamatorios, cardioprotectores y antimicrobianos. En la planta desempeñan una doble función, algunos como protección contra depredador y patógeno y otra por su colorido, para atraer animales que favorecen la polinización. Se ha observado que los polifenoles del cacao previenen la oxidación del colesterol y estimulan el sistema inmunológico. Cabe indicar que en exceso, los polifenoles forman un complejo con el hierro y reducen su biodisponibilidad; por ello los bebedores de grandes cantidades de té negro y vino tinto pueden desarrollar anemia⁵⁴.

1.7.2.3 Betalaínas

Son un grupo de pigmentos hidrosolubles con estructura de glucósidos. Surgen de la unión de una amina primaria o secundaria y ácido betalámico. Pueden ser rojos (betacianinas) o amarillos (betaxantinas). Las betacianinas debidos a que contienen tres grupos hidroxilo su naturaleza es altamente catiónica, de ahí su elevada capacidad antioxidante^{55, 56}.

1.7.2.4 Fitoesteroles

Los principales fitoesteroles incluyen el sitosterol, el campesterol y el estigmasterol. A diferencia del colesterol, no se absorben en el tracto gastrointestinal; de hecho, su capacidad anticolesterolemica se debe a su estructura química que compite y bloque la absorción de colesterol en el tracto gastrointestinal^{57, 58}.

1.8 Fibra dietética

La fibra dietética (FD) está constituida por celulosa, hemicelulosa, pectinas, lignina, mucílago, carragenatos, alginatos y gomas. Asociados a la FD, se encuentran otros componentes de las células vegetales, generalmente en pequeñas cantidades, y de importancia fisiológica, como son las proteínas de la pared celular, los polifenoles, las cutinas, el ácido fítico, algunos ésteres del ácido acético, los minerales y el almidón resistente.

Desde el punto de vista nutricional la fibra se clasifica según su capacidad para ser fermentada en el colon. La fibra dietética fermentable o “soluble” incluye almidón resistente, pectinas, gomas, mucílagos, oligosacáridos resistentes y ciertos tipos de hemicelulosas y polisacáridos no amiláceos de reserva de la planta. La fracción escasamente fermentable o “insoluble” es variable, incluye celulosa, algunas hemicelulosas, lignina y otros polifenoles. Podemos obtener fibra a través los consumos de fruta, vegetales, leguminosas y cereales integrales.

La fibra dietética se ha asociado con la reducción del colesterol sérico, lo que puede reducir el peligro de enfermedades cerebro-vasculares. El mecanismo por el cual la fibra reduce el colesterol en la sangre y los niveles de lípidos, tiene varias explicaciones. Una es por su capacidad para formar geles el cual puede interferir con la absorción de lípidos y colesterol en el intestino, emulsionándolos y excretándolos en las deposiciones. Otro mecanismo posible es que ciertas variedades de fibra dietética pueden unir sales biliares y esteroides neutros, y de esta manera mejorar su eliminación del cuerpo, las sales biliares al ser excretadas en las heces se eliminan del ciclo enterohepático y hay cantidades más pequeñas de sales biliares disponibles para la absorción de lípidos. La fibra insoluble por su parte, apenas sufre procesos fermentativos en el colon, y tiene un efecto más marcado en la regulación intestinal, con reducción del tiempo de tránsito digestivo y aumento del peso de las heces. El AR es un ejemplo de fibra insoluble. El almidón dietético (AR) que no se digiere en el intestino delgado. La resistencia a la digestión del AR se atribuye principalmente a la particular estructura física, determinada en parte por

una cantidad más alta de amilosa en relación a la amilopectina, que permite formar una estructura más compacta que es menos susceptible a hidrólisis enzimática. Sin embargo, en el intestino grueso, el AR es usado como prebiótico por la microbiota colónica y es fermentado a ácidos grasos de cadena corta (SCFA por sus siglas en inglés), dióxido de carbono, metano y etano. La conversión de almidón resistente a SCFA (principalmente acetato, propionato y butirato), hace que estos SCFA inhiban la difusión de colesterol y ácidos biliares en la capa límite microvellosa, interfiriendo con su absorción en el cuerpo.

Según diferentes organizaciones (American Dietetics Association, American Diabetes Association, American Heart Association, National Cancer Institute y otras), la ingesta recomendada de fibra deben estar entre 20 y 35 g por día, procedente del consumo de alimentos, no de suplementos, y debe incluir fibra soluble (de 5 a 10 g) y el resto insoluble. El consumo de alimentos ricos en fibra además aportará a la dieta hidratos de carbono complejos, minerales, vitaminas y otros elementos bioactivos. Por otra parte, no está recomendado el uso de fármacos y preparados dietéticos a base de fibra, como sustituto de la fibra de la dieta normal, ya que pueden disminuir la biodisponibilidad de nutrientes esenciales, como proteínas y minerales⁵⁸⁻⁶⁰.

1.9 Formulación de alimentos funcionales

La tendencia actual apunta hacia un consumo responsable de alimentos. Las empresas alimentarias, tienen la responsabilidad de mejorar la calidad de los productos que ofrecen. Se busca la incorporar alimentos agronómicos como fuentes de fibras dietéticas y antioxidantes naturales. Las fibras dietéticas, presentan propiedades tecnológicas que se pueden utilizar en la formulación de alimentos, para mejorar texturas y aumentar la estabilidad, actualmente se usan en las formulaciones de una amplia gama de alimentos (productos de panadería, aperitivos, salsas, bebidas, cereales, galletas, productos lácteos, productos

cárnicos). Sin embargo, al incorporar ciertos aditivos funcionales como la fibra, es necesario cuidar las propiedades sensoriales del alimento. Se ha observado que la adición de fibras en alimentos de panificación modifica las propiedades reológicas de la masa, aumentan la tenacidad de la masa y disminuyen su elasticidad, se atribuye dicho efecto a los hidrocoloides que forman las fibras dietéticas, sus cargas y las interacciones con las cargas iónicas de los almidones.

En la actualidad, se buscan nuevas fuentes de compuestos bioactivos, los alimentos agronómicos son buena opción y en este contexto, los cladodios de *Opuntia atropes* y frutos de *Opuntia joconostle spp*, son un buen recurso tanto de fibra, como de antioxidantes, que han demostrado tener efectos positivos en la salud⁶².

1.10 *Opuntia atropes* y *Opuntia joconostle spp* en México

Algunas especies de cactáceas en la actualidad juegan un papel importante dentro de la alimentación humana. La familia *Cactaceae* comprende tres subfamilias: *Pereskioideae*, *Opuntioideae* y *Cactoideae*, los nopales y el xoconostle pertenecen a la subfamilia *Opuntioideae*.

Algunas de sus principales características son las de ser: suculentas, xerófitas, perennes, presentan aréolas en el tallo, en el pericarpelo de la flor y en la superficie de la mayoría de los frutos. Los cladodios son verdes, cilíndricos o aplanados, fotosintéticos y encadenados unos a los otros presentan gloquidios y hojas solo en los artículos o cladodios juveniles y en el pericarpelo de la flor. Los frutos como la tuna y el xoconostle contienen pigmentos nitrogenados, betalaínas, lo que les otorga la coloración rojo púrpura, en el caso de los pigmentos betacianinicos o amarillos para los pigmentos betaxantinicos. La mayoría de las especies tienen espinas (acúleos). La planta es nativa del continente Americano, siendo México el país que contiene más del 50% de sus especies⁶³.

1.11 Composición química de los cladodios de *Opuntia spp*

La composición química del nopal en base húmeda es de 91% agua, 0.66% proteínas, 0.11% grasas, 5.5% de carbohidratos, 1.15% celulosa y 1.58% cenizas. El mucílago vegetal contiene D-glucosa, D-galactosa, Larabinosa, D-xilosa, L-ramnosa y ácidos D-galacturónico y glucurónico. Entre los metabolitos secundarios vegetales de las plantas de la familia Cactaceae contienen flavonol 3-O-glucósidos (quercetina, kaempferol e isorhamnetin), dihidroflavonoles, flavononas y flavanonoles. La composición química del nopal es diferente para cada variedad, estado de madurez de la planta, considerándose maduro entre los 24 y 48 días. Otro factor de importancia que afecta la composición de la planta son las características del suelo como la acidez, salinidad, conductividad, humedad, textura y disposición de nutrientes. Se ha documentado que los cladodios jóvenes contienen más proteína, agua y extracto libre de nitrógeno. Entre los minerales predominantes en el nopal se encuentran el calcio (Ca) y el fósforo (P), los cuales varían en función de la madurez de la planta identificaron que el porcentaje calcio aumenta, de 1.56% a los 22 días hasta 3.72% a los 64, tiempo en el que llega a saturación. El fósforo, por su lado, disminuye a lo largo de estas mismas etapas, de 0.43% a 0.27%.

La fruta por su parte, tuna o xoconostle contiene pigmentos betalaínos que son poderosos antioxidantes, también son fuente de ácido ascórbico y otros ácidos orgánicos como maleico, malónico, succínico, tartárico y oxálico. Además, contienen cantidades apreciables de vitaminas B1, B6, vitamina E y vitamina A y minerales como calcio, magnesio, sodio y potasio, fósforo, hierro^{64,65}.

2. ANTECEDENTES

Opuntia ficus-indica no solo es la cactácea más simbólica de la cultura mexicana, también se ha empleado a lo largo de la historia de México, tanto en su gastronomía, como en la medicina tradicional, para el tratamiento de diversos malestares como, quemaduras, heridas, edemas e indigestión. El valor del nopal no solo radica en sus cladodios o pencas, sino también en los frutos y el tallo, los cuales se utilizan ampliamente en la industria alimentaria y farmacéutica, para la formulación de productos de valor añadido, como mermeladas, harinas, biopelículas, colorantes champú, cremas, etc^{66,67}.

Los estudios reportados sobre los efectos bioactivos de los compuestos del nopal son numerosos, e incluye a los cladodios, frutos y tallo. Un estudio mostró que la pulpa de los frutos del nopal mejora el estado antioxidante y reduce la oxidación lipídica en plasma. El estudio fue realizado en voluntarios sanos, se les midió diferentes parámetros bioquímicos antes y después de consumir pulpa de fruta de *Opuntia ficus-indica* (250 g dos veces al día), además de su dieta habitual, y mostraron un notable aumento de la vitamina E y C plasmática y una disminución de la oxidación de lípidos en plasma. Después de la suplementación de la pulpa, los niveles plasmáticos de MDA (malondialdehído) disminuyeron aproximadamente 75%⁶⁸.

En otro estudio, se demostró que suministro de dietas adicionadas con nopal deshidratado, durante siete semanas, disminuyeron el depósito de lípidos en el hígado de ratas alimentadas con dicho alimento y también disminuye la actividad de las transaminasas. Los valores séricos de alanina aminotransferas (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), fueron significativamente más bajos en el grupo que fue alimentado con nopal en comparación con el grupo control. En cuanto a la peroxidación lipídica, la concentración de MDA fue un 31% menor en los grupos nopal que en los grupos de control⁶⁹.

También se ha observado actividad hipoglucemiante de zumos de cladodios de *Opuntia ficus-indica*. En un estudio, se indujo diabetes en ratas haciendo uso de aloxano. Posteriormente se administraron diferentes dosis de zumo de cladodio, consistió en una dosis única y varias repetidas, (5ml por una, dos, tres o cuatro veces/rata) vía oral diariamente, durante cinco semanas, y se observó una reducción de los niveles de glucosa. El alto contenido de fibra soluble y pectinas, afectaron la absorción de glucosa a nivel intestinal, por lo cual se le considera un hipoglucemiante⁷⁰.

El nopal también tiene propiedades antiinflamatorias, el extracto del tallo de *Opuntia spp.*, contiene un metabolito llamado β -sitosterol el cual mostró una buena respuesta a la inflamación, aunque menor que la hidrocortisona⁶. Por otro lado, el extracto acuoso de los frutos de *Opuntia spp.*, tiene actividad analgésica y antiinflamatoria dependiente de la dosis. Su efecto se midió en ratas y ratones, sometidos a placas calientes y la actividad antiinflamatoria fue medida utilizando carragenina para inducir edema. El estudio consistió en la administración intraperitoneal del extracto acuoso liofilizado de *O. dillenii*, el cual ejerció un importante efecto protector ante estímulos dolorosos térmicos (placas calientes) dependiendo de la dosis entre, las cuales oscilaron entre 50 y 100 mg: kg. Tal la eficacia en estos dos estímulos es característica de analgésicos centrales como la morfina. El estudio también evidenció propiedades antiinflamatorias con una dosis de 100 mg: kg, la inhibición máxima del edema después la inyección de carragenano fue similar a la obtenida con un antiinflamatorio no esteroideo, indometacina utilizando una dosis de 5 mg: kg⁷¹.

Una propiedad más de los frutos y cladodios, es la capacidad antioxidante, debido al contenido de metabolitos secundarios vegetales como carotenoides, flavonoides y otros compuestos fenólicos, vitamina C y E. El extracto etanólico de *Opuntia ficus indica*, neutralizó radicales libres, DPPH, aniones de superóxido (O_2^{-1}) y radical hidroxilo (OH^-), utilizando diferentes sistemas de ensayo⁷².

Como todos los vegetales, el nopal es fuente de fibra. La fibra favorece los procesos digestivos, reduciendo el riesgo de problemas gastrointestinales. También disminuye los niveles séricos de lipoproteínas de baja densidad y colesterol, al interferir en la absorción de grasas a nivel intestinal⁷³.

En otro estudio realizado con *O. ficus-indica* se determinó el efecto neuroprotector de tres flavonoides aislados: quercetina, (+)-dihidroquercetina y 3-metil éter-quercetina. Las IC50 para inhibir el daño en células corticales de rata causado por xantina/xantina oxidasa fueron 4-5 g/mL para la quercetina, 7-16 g/mL para (+)-dihidroquercetina y 0.6-0.7 para 3-metil éter-quercetina, siendo este último compuesto el más efectivo *in vitro*. Los autores atribuyen este hecho a la mayor hidrofobicidad de este compuesto comparado con los otros utilizados en el estudio, por lo que su acción podría estar dirigida a prevenir la oxidación de los lípidos de la membrana⁷⁴.

También se ha observado que el extracto del fruto de *Opuntia ficus-indica*, inhibió la proliferación de cáncer de cuello uterino, de ovario y de vejiga en líneas celulares *in vitro*, y suprimió el crecimiento tumoral en el modelo *in vivo* de cáncer de ovario en ratones. Estudios han mostrado que la betanina de los frutos del nopal indujo apoptosis en células K562 (células eritroleucémicas), mediada por la liberación de citocromo c de las mitocondrias en el citosol. También tiene efectos antiproliferativos asociados a: (i) la inducción de alteraciones en el patrón de diferenciación celular, que juega un papel vital en la invasividad y progresión metastásica de los tumores, (ii) bloqueo de la expansión de células preneoplásicas o inducción de apoptosis, e (iii) intervención de activación metabólica de carcinógenos por la disminución de especies reactivas de oxígeno (ROS)^{75,77}.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente en México, el sobrepeso y la obesidad representan un problema de salud pública, debido a su prevalencia y relación con el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas, entre las que se encuentran las dislipidemias, enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedad de hígado graso no alcohólico. Se ha evidenciado que el cambio de la dieta tradicional basada en vegetales, granos, cereales y leguminosas, por una dieta de comida rápida e hipercalórica, son factores que predisponen la población al desarrollo de obesidad. El consumo de alimentos como los cladodios de nopal *O. atropes* y el fruto xoconostle de *O. joconostle spp*, han mostrado tener efectos antiobesogénicos, hipolipidémicos, hipoglucemiante y antioxidante; sin embargo, no se ha estudiado si estos alimentos conservan sus propiedades funcionales, al ser incorporados como parte de un producto alimenticios procesado. Por otra parte, no se han estudiado los posibles efectos de sinergismo entre los frutos y los cladodios de *Opuntia spp*, al ser mezclados, lo cual podría potencializar sus efectos funcionales (efecto hipolipidémico-hepatoprotector) evaluados en un modelo biológico de obesidad en ratas Wistar.

4. HIPÓTESIS

La incorporación de harina de nopal y xoconostle a la formulación de una galleta, presenta un efecto hipolipidémico y hepatoprotector en ratas Wistar alimentadas con una dieta hiperlipídica.

5. OBJETIVOS

General

Estudiar las propiedades hipolipídicas y el efecto protector en la enfermedad del hígado graso no alcohólico de la harina de nopal (*O.atropes*) y xoconostle (*O.joconostle spp.*) al ser incorporadas en un alimento que se usará como base de una dieta hiperlipídica administrada *ad libitum* a ratas Wistar.

Específicos

- 1.- Obtener harinas funcionales de cladodios de *O. atropes* y frutos xoconostles de *O. joconostle spp.*
- 2.- Diseñar una galleta funcional adicionada con harinas de cladodio de *O. atropes* y xoconostle de *O. joconostle spp.*, con diferentes concentraciones de las harinas funcionales.
- 3.- Medir propiedades texturales y sensoriales del alimento diseñado para elegir la mejor formulación.
- 4.- Formular una dieta hiperlipídica y evaluar su efecto inductor de obesidad e hígado graso no alcohólico en ratas Wistar.
- 5.- Formular una dieta hiperlipídica e incorporar la galleta funcional antes diseñada como parte de la dieta y evaluar su efecto antiobesogénico, hipolipidémico en ratas Wistar, mediante marcadores de masa corporal para ratas y determinaciones de química sanguínea de glucosa, colesterol total, LDL,HDL y triglicéridos.
- 6.- Evaluar el efecto del alimento funcional en la enfermedad de hígado graso no alcohólico en ratas Wistar obesas, mediante determinaciones de actividad de transaminasas AST, ALT y cuantificación de triglicéridos hepáticos y grasa total en hígado.

6.- Determinar marcadores de inflamación IL-1, IL-6, IL-8, en los sueros de las ratas alimentadas con las dietas experimentales.

7.- Determinar tanto el contenido de compuestos antioxidantes presentes en las harinas de cladodio de *O. atropes* y xoconostles de *O. joconostle* spp. así como su capacidad antioxidante.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materia prima

Los cladodios de *Opuntia atropes* de tres meses de edad fueron recolectados en el centro universitario CRUCO-UACH de Morelia, Michoacán, México entre los meses marzo-mayo del 2019. Se adquirieron xoconostles de *O. joconostle spp* en un centro comercial de la ciudad de Morelia, Michoacán, México entre los meses mayo-junio del 2019. Los cladodios y los frutos fueron lavados, se les retiraron las espinas y se desinfectaron con una solución de hipoclorito al 2 % por 30 min; posteriormente, se enjuagaron con agua destilada y se cortaron en cuadros pequeños, el xoconostle conservo el epicarpio. Fueron deshidratados por 21 h en deshidratador solar alcanzando la temperatura máxima en el día de 61 °C. Los trozos de nopal y xoconostle se llevaron a una humedad de 5% y actividad de agua de 0.4 para el nopal y 0.5 para xoconostle. Una vez secos se molieron en un procesador de alimentos (Oster 4127) y se tamizaron con malla de 60 µm para obtener las harinas.

6.2 Formulación de una galleta adicionada con harina de cladodio de *O. atropes* y xoconostle de *O. joconostle spp*

Las galletas fueron preparadas de acuerdo al método 10-50d de la Asociación Americana de Químicos de Cereales (AACC, 2000) con algunas modificaciones, usando los siguientes ingredientes: harina funcional (mezcla de harinas de cladodio y xoconostle 50:50) en concentraciones de 5%, 10% y 15% con harina de trigo, 66g (56.6%), grasa vegetal 8g (6.8%), miel de agave como sustituto de sacarosa 36g (30%), leche *light* 5g (4.2%), polvo para hornear 0.5g (0.4%), sal 1g (0.8%). Los ingredientes fueron mezclados hasta formar una masa homogénea que posteriormente fue pasada por un rodillo para pasta, obteniéndose una tira de masa de aproximadamente 4-5 mm de espesor la cual fue cortada con un molde

obteniéndose galletas de 65-67 mm de diámetro, las galletas fueron horneadas a 150 °C durante 23 min⁷⁸.

6.3 Análisis sensorial de galleta adicionada con harina de cladodio de *O. atropes* y xoconostle de *O. joconostle spp*

Para la evaluación sensorial se presentaron tres formulaciones de galletas con sustitución de 5%, 10% y 15%, de harina de trigo por harina funcional nopal-xoconostle. Las muestras se analizaron un día después de la preparación y se presentaron como piezas enteras en platos de plástico blancos codificados con números aleatorios de cuatro dígitos y en orden aleatorio. Fueron 30 panelistas los que evaluaron la galleta, en base a sus atributos de aceptabilidad y apariencia: color, olor, sabor y textura, asignando una puntuación del 1 al 9, donde 1 significa (me disgusta extremadamente) y 9 (me gusta extremadamente)⁷⁹.

6.4 Análisis textural de galleta adicionada con harina de cladodio de *O. atropes* y xoconostle de *O. joconostle spp*

El análisis de dureza y fracturabilidad de las galletas se realizó en las formulaciones con distintas concentraciones de harina funcional nopal-xoconostle 5% ,10% y 15% y se compararon con un control galleta elaborada solo con harina de trigo y una galleta comercial. La fuerza de fractura de las galletas se determinó en un texturómetro Brookfield CT-3 USA. Se colocaron las galletas en una base circular con un diámetro de 13 cm y se empleó una sonda de corte fino, según método 16-50 AACC para productos de panadería, bollería y galletas. Se realizaron seis repeticiones por formulación con una carga de activación de 7N a una velocidad de 2mm/s y una velocidad de vuelta de 2mm/s⁸⁰.

6.5 Análisis proximal de las galletas funcionales

- I. Humedad. Método oficial de la (AOAC).
- II. Cenizas. Método para determinación por incineración (AOAC).
- III. Proteína. Determinación por el Método Micro Kjeldahl (AOAC).
- IV. Lípidos. Método de Soxhlet (AOAC).
- V. Fibra Dietética. Soluble e Insoluble. Método enzimático (AOAC).
- VI. Extracto libre de nitrógeno. Por diferencia^{81,82}.

6.6 Formulación de una dieta hiperlipídica para inducir obesidad e hígado graso no alcohólico en ratas Wistar

La formulación base de la dieta experimental fue de acuerdo a lo establecido por la AIN-93 para animales adultos en mantenimiento. La dieta base se modificó aumentando en un 60% el contenido de lípidos respecto al valor calórico total de la dieta. La finalidad del experimento consistía en inducir obesidad a las ratas y posteriormente determinar si lograban desarrollar hígado graso no alcohólico. Cabe señalar que se empleó como alimento base leche en polvo marca alpura y cada uno de los nutrientes se ajustaron para ser, lo más posible, equivalente a la dieta de referencia, para lograr el aumento de lípidos en la dieta se utilizó manteca de cerdo⁸³.

Tabla 1. Componentes de las dietas referencia e hiperlipídica DIRE (dieta de referencia), DHL (dieta hiperlipídica).

Componente	DIRE (g)	kcal* 100g	Aporte calórico (%)	DHL (g)	kcal* 100g	Aporte calórico (%)
Lípidos	4	36	9.42	37	333	60.87
Carbohidratos	76.5	306	80.1	37.5	150	27.42
Proteína	10	40	10.47	16	64	11.7
Fibra total	5	0	0	5	0	0
Vitaminas	1	0	0	1	0	0
Minerales	3.5	0	0	3.5	0	0
Total	100	382	100%	100	547	100%

6.7 Ensayo preliminar *in vivo*, evaluación de una dieta hiperlipídica como promotor de obesidad e hígado graso no alcohólico en ratas Wistar como modelo biológico

En el ensayo preliminar biológico se utilizaron seis ratas de la cepa Wistar, machos jóvenes de 10 semanas de edad y un peso promedio de 370.6 g. Las ratas fueron adquiridas en el bioterio de la UNAM Campus Juriquilla, Querétaro. Los animales fueron manipulados siguiendo los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación de México, para el uso y cuidado de animales de laboratorio. Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas individuales y en un ambiente aislado de ruidos, temperatura de 22°C, y con ciclos de 12 h luz por 12 h de oscuridad. Los animales se mantuvieron en un periodo de adaptación de 7 días con alimento comercial y agua *ad libitum*. Después del periodo de adaptación las seis ratas se alimentaron durante 8 semanas con una dieta hiperlipídica y

suministrando de agua *ad libitum*. Los animales fueron pesados cada semana desde el inicio hasta el término de la experimentación para evaluar la pérdida o ganancia de peso corporal, el consumo de alimento se registró diariamente a las 10:00 de la mañana⁸⁴.

6.8 Formulación de tres galletas funcionales adicionadas con harina de cladodio de nopal de *O. atropes*, harina de fruto xoconostle de *O. joconostle spp*, y harina *nopal-xoconostle*

Los resultados del análisis sensorial de las galletas sustituidas con 15% de harina funcional nopal-xoconostle, mostraron que la sustitución no afectó significativamente las propiedades sensoriales del alimento, por lo que se decidió usar esta concentración para formular tres galletas diferentes y medir los efectos de las harinas de nopal y xoconostle, por separado y juntas. Las galletas fueron preparadas de acuerdo al método 10-50d de la Asociación Americana de Químicos de Cereales (AACC 2000) con algunas modificaciones. Se sustituyó un 15% de harina de trigo por harina de nopal, xoconostle o mezcla nopal-xoconostle (50:50), 66g, grasa vegetal 8g, sacarosa 25g, leche light 5g, polvo para hornear 0.5g, sal 1g. Los ingredientes fueron mezclados hasta formar una masa homogénea que posteriormente fue pasada por un rodillo para pasta, obteniéndose una tira de masa de aproximadamente 4-5 mm de espesor la cual fue cortada con un molde obteniéndose galletas de 65-67 mm de diámetro, las galletas fueron horneadas a 150°C durante 23 min.

Nota: para la formulación de estas galletas se usó como edulcorante sacarosa y no miel de agave como en la formulación original, debido a que la miel de agave contiene numerosos compuestos bioactivos y durante este estudio solo se pretende conocer los efectos de los compuestos del nopal y xoconostle⁸⁵.

6.9 Ensayo final *in vivo*, evaluación del efecto antiobesogénico y hepatoprotector de galletas adicionadas con 15 % de harina de nopal y xoconostle e incorporadas en una dieta hiperlipídica

Para el ensayo biológico *in vivo*, se utilizaron 30 ratas de la cepa Wistar, machos jóvenes de 10 semanas de edad y un peso promedio de 377 g. Las ratas fueron adquiridas en el bioterio de la UNAM Campus Juriquilla, Querétaro y manipulados siguiendo los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación de México, para el uso y cuidado de animales de laboratorio. Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas individuales y en un ambiente aislado de ruidos, temperatura promedio de 22°C, y con ciclos de 12 h luz por 12 h de oscuridad. Los animales se mantuvieron en un periodo de adaptación de 7 días con alimento comercial y agua *ad libitum*. Después del periodo de adaptación, las ratas fueron divididas al azar en cinco grupos de seis ratas cada uno, un grupo control positivo de animales alimentados con una dieta hiperlipídica (DHL), como modelo de obesidad, hiperlipidemia e hígado graso no alcohólico. Un grupo control negativo, de animales alimentados con una dieta de referencia (DREF) para animales en mantenimiento, y tres dietas funcionales hipolipidémicas-hepatoprotectoras, usando como alimento base para las dietas tres diferentes galletas funcionales, adicionadas con 15% de harina de nopal (GNOP), otra con 15% de harina de xoconostle (GXO) y una más con 15% mezcla nopal-xoconostle (GMIX). Las ratas se alimentaron durante 10 semanas con las dietas experimentales y suministro de agua *ad libitum*. Los animales fueron pesados cada semana desde el inicio hasta el término de la experimentación para evaluar la pérdida o ganancia de peso corporal, el consumo de alimento se registró diariamente a las 10:00 de la mañana⁸⁴.

6.10 Formulación de una dieta estándar para animales en mantenimiento y una dieta hiperlipídica promotora de obesidad e hígado graso no alcohólico

La formulación de las dietas experimentales de referencia, para animales en mantenimiento (DREF) e hiperlipídica para animales obesos (DHL), fue de acuerdo a lo establecido por la AIN-93. Para la formulación de la dieta hiperlipídica, los lípidos se incrementaron un 60%, como recurso mayoritario de calorías en la dieta, los carbohidratos se limitaron a un 27% del valor calórico y las proteínas a un 11%. La finalidad del experimento consistía en inducir obesidad e hígado graso no alcohólico a las ratas del grupo control positivo (DHL) y comparar sus parámetros fisiológicos, con las ratas del grupo de animales sanos (DREF). Para lograr el aumento de lípidos en las ratas del grupo DHL, se utilizó manteca de cerdo⁸³.

6.11 Formulación de tres dietas hiperlipídica, usando como alimento base galletas adicionadas con nopal y xoconostle

La formulación de las dietas funcionales fue de acuerdo a los parámetros de la dieta hiperlipídica, usada para inducir obesidad a las ratas. Para las dietas funcionales se usó como alimento base 650 g de las tres diferentes formulaciones de galletas funcionales, obteniendo tres dietas diferentes: dieta nopal (DNOP), dieta xoconostle (DXO), dieta mixta (DMIX). Todos los parámetros se ajustaron de acuerdo al aporte calórico de tres macronutrientes, lípidos, carbohidratos y proteínas, donde el contenido calórico provenía en un 60% de los lípidos, un 27% de carbohidratos y 11% de proteínas.

6.12 Sacrificio y obtención de muestras biológicas

El sacrificio de las ratas Wistar del ensayo preliminar se llevó a cabo después de ocho semanas de experimentación y el de las ratas Wistar del ensayo final después de diez semanas de experimentación. Las ratas restantes fueron sacrificadas al término del experimento, mediante la DL50 (135 mg/kg de peso corporal) de pentobarbital sódico vía intraperitoneal. Se extrajeron dos muestras de sangre por rata, mediante punción cardíaca y se extrajo el hígado de los seis ejemplares del ensayo preliminar y los 27 ejemplares de ensayo final para su posterior análisis. Una de las muestras de sangre se envió al laboratorio EDULAB para las diferentes determinaciones de química sanguínea, perfil hepático, perfil lipídico la segunda muestra de sangre se centrifugó a 350 rpm para obtener el suero, el cual se almacenó a -80 °C para posteriormente realizar pruebas de citometría de flujo.

6.13 Determinación de química sanguínea, perfil lipídico y perfil hepático de los sueros de las ratas Wistar

La química sanguínea de cuatro elementos, (glucosa, urea, creatinina, ácido úrico), el perfil de lípidos (triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL) y el perfil hepático, (bilirrubina total, aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA), gamma glutamil transpeptidasa (GGT)), se realizaron en el laboratorio de análisis clínicos y microbiológicos EDULAB, ubicado en Morelia Michoacán. Método: Colorimetría enzimática Cobas c111 ROCHE Diagnostics.

6.14 Determinación de triacilgliceroles hepáticos en hígados de ratas Wistar



De los hígados recién extraídos de las ratas del ensayo preliminar y el ensayo final, se tomó una muestra de lóbulo lateral izquierdo y se pesaron aproximadamente 50 mg de tejido por muestra, se registraron los pesos. Posteriormente, a cada muestra se le agregaron 0.5 ml de solución PBS que contenía Triton-X100 al 5% y se homogenizaron utilizando Polytron. Las muestras se colocaron 2 veces en baño de agua a 55 °C durante 5 min para solubilizar los triacilglicéridos, dejando enfriar a temperatura ambiente después de cada baño de agua. Por último, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min y se separó el sobrenadante para determinar los triacilglicéridos. La concentración de triacilglicéridos del sobrenadante se diluyó 1:3 con agua destilada y de esta dilución se cuantificaron los triacilglicéridos mediante espectrofotometría. La cuantificación de triacilglicéridos hepáticos se determinó mediante un ensayo enzimático-colorimétrico utilizando el kit comercial de Spinreact (Sant Esteve de Bas, Spain) y siguiendo las instrucciones del fabricante⁸⁶.

6.15 Deshidratación de hígados de ratas Wistar

La deshidratación de los hígados de ratas, se realizó con la finalidad de conocer el contenido total de sólidos y determinar el porcentaje que representaban los lípidos totales en el hígado. Para determinar el porcentaje de humedad de los hígados, se pesaron 6 g de tejido y se deshidrataron en estufa a 105 °C por 3 h, se pesaron de nuevo y por diferencia de pesos se determinó la humedad⁸¹.

6.16 Determinación de lípidos totales en hígado de ratas Wistar

Para determinar la cantidad de lípidos totales en hígado de los roedores, de las muestras previamente deshidratadas se pesaron 3g de muestra y se les determinó el contenido de lípidos mediante el método de Soxhlet⁸¹.



6.17 Obtención de extractos etanólicos de harina de cladodios de *Opuntia atropes* y frutos xoconostle de *Opuntia joconostle spp* para pruebas antioxidantes

Los extractos de las harinas de cladodio de *Opuntia atropes* y fruto xoconostle de *Opuntia joconostle spp*, se obtuvieron empleando una relación de harina: solvente 1:10 p/v (3 g de harina de cladodio o xoconostle en 30 ml de solvente), posteriormente se colocaron en un baño de agua con agitación y temperatura Julabo® a 100 rpm y 45°C. Los extractos obtenidos se centrifugaron a 3500 rpm/ 10 min y se filtraron al vacío cuatro veces, con papel filtro Whatman No. 2, y se colocaron en tubos Falcon cubiertos de aluminio y en refrigeración para el posterior análisis de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante por captura de radicales DPPH.^{87,88}.

6.18 Pruebas antioxidantes

- Determinación de fenoles totales

La prueba de fenoles totales se realizó de acuerdo al método Folin-Ciocalteu. Se mezclaron 250 µL de extracto con 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (2 N) y 250 µL de carbonato de sodio (20 %). La mezcla se homogeneizó y se incubó a 40 ° C durante 30 min. A continuación, se añadieron 2 ml de agua destilada y se agitó. Posteriormente, se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro VELAB®. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg EAG/g), la curva de calibración se preparó con el mismo método⁸⁹.

- Determinación de flavonoides totales



Para la cuantificación de flavonoides, se mezclaron 150 μL de cada muestra con 150 μL de nitrito de sodio (5%), la mezcla se homogeneizó y se añadieron 150 μL de cloruro de aluminio (10%) y 1 mL de hidróxido de sodio (0.1 M), se homogeneizaron nuevamente y se procedió a medir la absorbancia con una longitud de onda de 510 nm, en un espectrofotómetro VELAB®. Los resultados se expresaron como equivalentes de quercetina por gramo de muestra seca (mg EQ/g), la curva de calibración se preparó con el mismo método⁹⁰.

- Ensayo antioxidante DPPH.

Se mezclaron 50 μL de cada muestra con 2.95 mL de solución DPPH· 60 μM (DPPH· + metanol), hasta un volumen de 3 mL. Posteriormente las muestras se homogeneizaron por 10 seg y se dejaron en reposo durante 30 min, protegidas de la luz. Por último, se leyeron con una longitud de onda de 517 nm, en un espectrofotómetro VELAB®. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg EAG/g) de acuerdo con la curva de calibración preparada con el mismo método⁹¹.

6.19 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos en las pruebas fue analizado empleando el programa JMP6. Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía y la prueba Tukey-Kramer con un 95% de confianza ($p < 0.05$). Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando una media de 30 repeticiones para el análisis sensorial, siete repeticiones para las pruebas de textura, seis repeticiones para el ensayo preliminar *in vivo*, 6 repeticiones por 5 grupos para el ensayo final *in vivo* y siete repeticiones para las determinaciones antioxidantes.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis sensorial

El análisis estadístico (Tabla 2) muestra que no hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) para ninguno de los atributos sensoriales, entre las tres formulaciones con porcentajes de sustitución 5%, 10% y 15% de harina de trigo por harina de nopal-xoconostle, por lo que la aceptación fue igual para las tres formulaciones. Por lo tanto, sustituir la harina de trigo por harina funcional de nopal y xoconostle, en concentraciones de hasta 15%, no afectó significativamente las características sensoriales del alimento. El alimento presentó una moda de siete en escala hedónica de aceptación, por lo tanto, el alimento les agradó de forma moderada a los panelistas. Para concluir el análisis sensorial se les pidió a los panelistas que señalarán cuál de las tres formulaciones es un producto que comprarían y el porqué de su respuesta. La Figura 1 muestra los resultados, el 50% de los panelistas señaló que la formulación con sustitución del 15%, es un producto que comprarían, debido a que tiene un sabor atractivo y diferente a lo que han probado.

Tabla 2. Respuesta hedónica para las diferentes formulaciones de galletas.

Porcentaje de sustitución	Preferencia	Olor	Color	Sabor	Textura
5%	6.67 ± 1.29 ^A	6.53 ± 1.22 ^A	6.7 ± 1.2 ^A	6.83 ± 1.28 ^A	6.63 ± 1.47 ^A
10%	6.6 ± 1.27 ^A	6.9 ± 1.24 ^A	6.8 ± 1.18 ^A	6.70 ± 1.31 ^A	6 ± 1.23 ^B
15%	6.75 ± 1.18 ^A	6.6 ± 1.22 ^A	7.03 ± 0.96 ^A	6.9 ± 1.24 ^A	6.46 ± 1.27 ^B

Media de 30 repeticiones \pm desviación estándar. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa ($p < 0.05$).

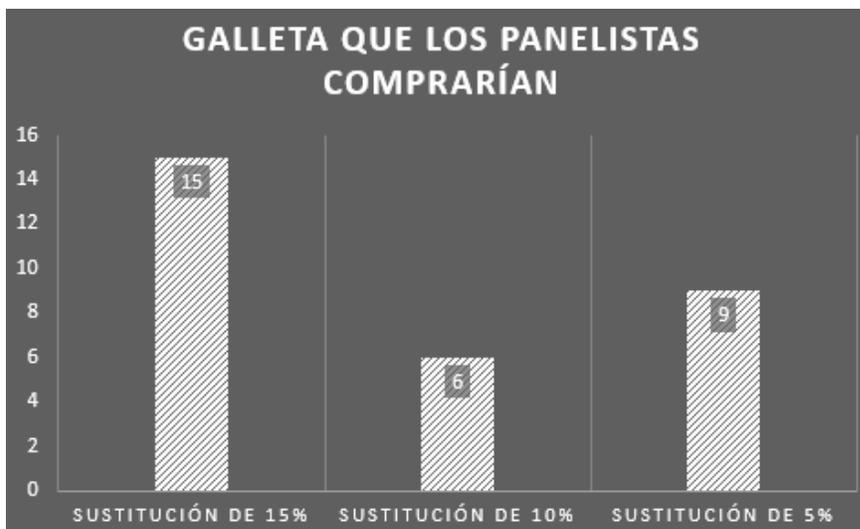


Figura 1. Galleta preferida por los panelistas

7.2 Pruebas de textura

Al consumir un alimento uno de los parámetros más importantes a percibir es la textura, que es afectada por las propiedades mecánicas del alimento e influye directamente en la aceptación del alimento por el consumidor. Las propiedades mecánicas del alimento están relacionadas a otras propiedades, como la gomosidad y la masticabilidad. La gomosidad hace referencia a la energía requerida para desintegrar un alimento semisólido de modo que esté listo para ser tragado, mientras que la masticabilidad hace referencia a la energía requerida para masticar un alimento sólido hasta que está listo para ser tragado⁹².

Debido a que las galletas son un alimento sólido, la propiedad de masticabilidad, suele describirse de una manera precisa, al medir parámetros como la dureza y la fracturabilidad. La fracturabilidad, se refiere a la fuerza con la cual un material se

agrieta y aumenta a medida que aumenta dureza y baja el grado de cohesividad, de acuerdo a esta propiedad el alimento puede ser clasificado como crocante, quebradizo o crujiente. Por otro lado, la dureza es relativa a la fuerza necesaria para deformar el alimento o hacer penetrar un objeto en él, con lo cual el alimento se puede describir como blando, firme o duro⁹³. En este estudio se midieron los parámetros de dureza y fracturabilidad, para las diferentes formulaciones de las galletas. Los resultados demuestran (Tabla 3) la forma en que las propiedades de dureza y fracturabilidad se vieron afectados, a medida que incrementa la sustitución de harina de trigo por harina de nopal-xoconostle. La prueba estadística mostró que existió diferencia significativa ($P < 0.05$) para el parámetro de dureza entre las galletas elaboradas con 0%, 5%, 10% y 15 % de sustitución de harina de trigo por harina de nopal-xoconostle, presentando la mayor dureza en las galletas de 15% de sustitución y la menor dureza para las galletas de 0% sustitución, las formulaciones de 5% y 10% no presentaron diferencias significativas entre ellas. En cuanto a la fracturabilidad del alimento, se observó que la sustitución de hasta un 10% de harina de trigo por harina funcional, no causó ningún cambio significativo ($P < 0.05$), en las características de fracturabilidad de la galleta. El aumento en la dureza y fracturabilidad de las galletas a medida que aumentó el porcentaje de harina nopal-xoconostle, tiene origen posiblemente en las propiedades de retención de agua de las fibras y su alta capacidad para formar geles, lo que provoca una baja actividad de las proteínas del gluten y se refleja aumentando la dureza de la galleta^{94,95} tal como lo reportan otro estudios, donde se sustituyó parcialmente la harina de trigo por harina de cebada, harina de jengibre o de nopal y donde las propiedades físicas de la masa cambiaron, volviéndose menos extensible por lo que se afectó la textura a medida que incrementó la sustitución. Por lo tanto, es importante determinar la cantidad de harina que es posible sustituir sin que se vean comprometidas las propiedades sensoriales del alimento. No obstante, a pesar de que existió una diferencia significativa en las propiedades mecánicas del alimento para la galleta con mayor porcentaje de harina funcional (nopal-xoconostle) y las de menor porcentaje, sensorialmente no tuvieron diferencias significativas, por lo que la

calidad sensorial del alimento al parecer no se vio afectada con un 15 % de sustitución.

Tabla 3. Propiedades texturales de las diferentes formulaciones de las galletas.

Propiedad	Sustitución 0%	Sustitución de 5%	Sustitución de 10%	Sustitución de 15%
Dureza (N)	78.01± 4.34 ^C	107.99 ± 3.49 ^B	109.43 ± 6.69 ^B	126.59 ± 11.81 ^A
Fracturabilidad (N)	54.76 ± 10.86 ^B	43.13 ± 10.72 ^B	46.71 ± 7.9 ^B	112.34 ± 8.36 ^A

Media de 7 repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales en la misma fila no muestran diferencia significativa ($p < 0.05$).

7.3 Análisis proximal de las galletas adicionadas con harina de cladodios de nopal *Opuntia atropes* y xoconostles de *Opuntia joconostle spp*

Los resultados del análisis proximal realizado a las galletas se muestran en la Tabla 4. Recordemos que las galletas fueron elaboradas sustituyendo en un 15% la harina de trigo, por harina de nopal, xoconostle o mezcla nopal-xoconostle. La fracción correspondiente a la fibra, es uno de los parámetros de mayor importancia en el alimento, pues se le atribuyen los efectos hipolipidémicos e hipoglucémicos que se relacionan con un riesgo menor de desarrollar enfermedad de hígado graso no alcohólico. La galleta con mejores características fue la elaborada con nopal, presentó una mayor cantidad de fibra, que a su vez aumentó la humedad debido a las propiedades de retención de agua de las fibras y disminuyó otro parámetro de importancia en un alimento funcional, que es una menor cantidad de carbohidratos simples, también presentó una mayor cantidad de cenizas, por lo que el contenido

de minerales fue más alto que en las otras galletas y presentó un aporte calórico menor que las otras galletas.

Tabla 4. Análisis proximal de las tres formulaciones de galletas funcionales

Componente	Galleta con nopal (g/100 g)	Galleta con xoconostle (g/100g)	Galleta mixta (g/100 g)
Fibra total	12.48	11.77	10.61
Proteína	7.36 ± 0.15	7.06 ± 0.15	7.03 ± 0.05
Extracto libre de nitrógeno	50.9 ± 0.7	54 ± 0.41	55.94 ± 0.35
Lípidos	11.30 ± 0.13	11.23 ± 0.14	12.06 ± 0.20
Cenizas	3.33 ± 0.05	2.76 ± 0.11	2.83 ± 0.05
Humedad	14.63 ± 0.37	13.18 ± 0.01	11.53 ± 0.05
Total	100	100	100
Calorías	334.66 kcal /100g	345.31 kcal /100g	360.42 kcal /100g

7.4 Inducción de obesidad e hígado graso no alcohólico en ratas Wistar alimentadas con una dieta hiperlipídica

Durante el ensayo las ratas consumieron en promedio 22.6g diarios de alimento, cantidad que en promedio ingieren las ratas Wistar (15 a 30 g/día)⁹⁶. El alimento fue bien aceptado por las ratas, y debido al alto valor calórico de la dieta, atribuido principalmente a los lípidos cuyo aporte calórico fue del 60%, se logró inducir obesidad en los roedores. Para identificar si las ratas eran obesas se hizo uso del índice Lee, el cual es un parámetro que ayuda a determinar el índice de masa corporal en las ratas, y así poder clasificarlas en un estado normal o de obesidad. Consiste en obtener la raíz cúbica de la masa del roedor y dividirlo entre la longitud hocico-año del animal, con un valor mayor a 0.300 es considerada una rata obesa⁹⁷.

En la Tabla 5 podemos ver el resultado del índice Lee para las ratas del ensayo, el índice fue mayor a 3, por lo tanto, la dieta logro inducir obesidad en las ratas.

Tabla 5. Consumo de alimento, peso, Índice Lee de las ratas Wistar.

Núm de rata	Consumo de alimento/ día (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Longitud final (cm)	Índice Lee
1	25.88	404	671.5	27	0.32
2	24.84	457	609	26	0.32
3	22.79	414	549	26	0.31
4	24.46	428	537.5	25	0.32
5	19.30	380	493	25	0.31
6	18.47	375	479	23	0.32
Promedio	22.62 ± 3.07	414.33 ± 35.74	556.50 ± 72.71	25.33 ± 1.36	0.33 ± 0

Media de seis repeticiones ± desviación estándar ($p < 0.05$).

7.5 Cuantificación de lípidos hepáticos

El objetivo de este ensayo *in vivo* consistía en probar si la dieta hiperlipídica empleada en el estudio, para inducir obesidad a las ratas, también era capaz de generar hígado graso no alcohólico a los roedores, en ocho semanas de experimentación.

El hígado graso no alcohólico se caracteriza por una acumulación de lípidos, macro o microvesicular, mayor a 5% del peso total del hígado⁹⁸. La Tabla 6 muestra el porcentaje correspondiente a lípidos, del peso total de los hígados de cada rata. De acuerdo a los resultados las ratas si desarrollaron hígado graso no alcohólico, debido a que el contenido de lípidos fue mayor a 5% del peso total del hígado. Para confirmar los resultados, se realizó la cuantificación de triglicéridos hepáticos en tres ratas que consumieron diferente cantidad de alimento durante el ensayo. Los resultados mostraron concentraciones de 28, 35 y 41 ug de lípidos/mg de tejido, comparando con estudios previos de otros autores donde se reportaron concentraciones de 20ug de lípidos/mg de tejido así como abundantes micro vesículas de triglicéridos en el hígado, propio de la enfermedad de hígado graso no

alcohólico, podemos concluir que la dieta hiperlipídica utilizada, no solo induce obesidad a los animales en ocho semanas, si no que contribuye al desarrollo de hígado graso no alcohólico^{99,100}.

En este estudio observamos que el peso de la rata no se relacionó con la concentración de triglicéridos en hígado, esto debido a que, la rata con menor peso fue la que presentó mayor acumulación de triglicéridos y la rata con mayor peso y más lípidos totales en hígado, presento menor concentración de triglicéridos hepáticos, el fenómeno podría deberse a que el total de grasa en hígado se encontraba esterificada en colesterol y el ensayo solo identifica triglicéridos libres⁸³. El hígado de la rata con más peso presentaba un aspecto desteñido característico de hígados grasos¹⁰¹.

Tabla 6. Contenido de lípidos en los hígados de las ratas.

Núm. de rata	Peso del hígado (g)	Grasa visceral (g)	Humedad en hígado (%)	Grasa total en hígado (%)	Tg hepáticos µg/mg tejido
1	16.26	24.12	67	14.37	28.9
2	16	15	67.39	6.3	
3	15	12	62.09	5.37	42.5
4	16.2	12	67.41	5.26	
5	14	10	71.5	5.2	
6	12.4	7	67.01	6.57	36.9
Promedio	14.97 ± 1.53	13.35 ± 5.89	67.06 ± 2.98	7.17 ± 3.57	36.10 ± 6.83

Media de 6 repeticiones ± desviación estándar (p<0.05).

7.6 Perfil hepático

El aumento de la actividad enzimática hepática está fuertemente relacionado con la génesis y progresión de hígado graso no alcohólico. Pacientes diagnosticados con la enfermedad de hígado graso no alcohólico inicialmente presentan elevaciones de

(1.5 a 4 veces) de las aminotransferasas (ALT y AST), la fosfatasa alcalina (FA) y la gamma-glutamil transferasa en suero¹⁰².

Se realizó, la prueba de perfil hepático en los sueros de las ratas 1, 3, y 6, cuyos resultados se muestran en la Tabla 7. Los resultados mostraron niveles de actividad enzimática ALT y AST cercanos al límite superior, lo que podría deberse a un daño ocasionado por el depósito elevado de lípidos en el hígado.

Tabla 7. Perfil hepático de las ratas.

Núm de rata	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	BT (mg/dL)
1	92.3	28.7	36.5	0.1	0.1
3	102.2	33.9	37.2	0	0.1
6	212.3	45.1	65.2	0	0.1
Valores referencia	63-175	19-48	36-131	0-3.13	0.04-0.20

Aspartato aminotransferasa (AST), Alanino aminotransferasa (ALT), Fosfatasa alcalina (ALP), Gamma glutamil transpeptidasa (GGT), Bilirrubina total (BT).

7.7 Formulación de dietas experimentales empleadas en el ensayo final *in vivo*

Tabla 8. Formulación de dietas experimentales.

Componente (g)	DREF	DHL	DNOP	DXO	DMIX
Galleta funcional	0	0	555.1	564.9	575.3
Lípidos	40	370	296.6	298.5	292
Carbohidratos	765	375	40.9	20.75	10.5
Proteína	100	160	114.5	114.5	114.5

Minerales	35	35	13.6	17.5	16.8
Vitaminas	10	10	10	10	10
Celulosa	50	50	0	0	0
Total	1000g	1000g	1030.7g	1026.1g	1019.1g

Dieta normocalórica (DREF) para animales en mantenimiento, dieta hiperlipídica (DHL) para animales obesos. (DNOP) grupo de roedores alimentados con dieta parcialmente sustituida con galleta de nopal, (DXO) grupo de roedores alimentados con dieta parcialmente sustituida con galleta de xoconostle, (DMIX) grupo de roedores alimentados con dieta parcialmente sustituida con galleta mixta.

La Tabla número 8 muestra la composición final de las dietas experimentales usadas en el ensayo. Las dietas funcionales utilizaron como alimento base 650g de galleta funcional. El total de las dietas formuladas con las galletas rebasa los 1000 g, en un rango de 20 a 30 g, esta parte corresponde a un excedente de fibra, debido a que la cantidad de galleta empleada como base, solo cuida no exceder el aporte calórico de lípidos, carbohidratos y proteínas, pues la dieta está diseñada en base al aporte calórico de esos tres macronutrientes.

7.8 Composición calórica de las dietas experimentales

La elaboración de las dietas está basado en el porcentaje de calorías proveniente de tres macronutrientes: lípidos, carbohidratos y proteínas. El 60% de las calorías totales de la dieta provienen de los lípidos. En la Tabla 9, se presenta el aporte calórico de los tres macronutrientes, para las dietas referencia y control, así como el total de Kcal por 1000 g de dieta. La Tabla 10, también registra el aporte calórico de los tres macronutrientes, presentes en los gramos de galleta funcional que se usaron como alimento base de la dieta, y los gramos adicionales que se incorporaron de cada macronutriente, para ajustar la dieta a las calorías necesarias, observamos que tanto la dieta control como las dietas funcionales, tienen un aporte



de 5470 kcal, y que el 60% de esas kcal corresponde a los lípidos. Por lo que las dietas son equiparables en composición calórica y por lo tanto, puede hacerse un análisis de comparación de efectos en los roedores alimentados con las diferentes dietas.

Tabla 9. Aporte calórico proveniente de carbohidratos, lípidos y proteínas, en las dietas referencia e hiperlipídica.

Componente	DREF (g)	kcal	Aporte %	DHL (g)	kcal	Aporte %
Lípidos	40	360	9.4	370	3330	60.8
Carbohidratos	765	3060	80	375	1500	27.4
Proteína	100	400	10.4	160	640	11.7
Minerales	35	-		35	-	
Vitaminas	10	-		10	-	
Celulosa	50	-		50	-	
Total	1000g	3860 kcal/1000g		1000g	5470 kcal/1000g	

Dieta referencia (DREF) animales alimentados con una dieta normocalórica, Dieta hiperlipídica (DHL), animales alimentados con una dieta alta en lípidos.

Tabla 10. Aporte calórico proveniente de carbohidratos, lípidos y proteínas, en las tres dietas funcionales.

COMPONENTE	(g)	kcal	Aporte calórico
DNOP	555.1g de galleta funcional	2179 de las cuales →	-Proteína: 3.3% -Lípidos: 12% -Carbohidratos: 24.5%
Lípidos adicionales	296.6	2669.4	48.8%
Carbohidratos adicionales	40.9	163.6	2.9%
Proteína adicional	114.5	458	8.3%
Total kcal		5470	100%
DXO	564.9g de galleta funcional	2242.3 de las cuales →	-Proteína: 3.3% -Lípidos: 12.1 % -Carbohidratos: 25.9%
Lípidos adicionales	298.5	2686.5	49.1%
Carbohidratos adicionales	20.8	83	1.5%
Proteína adicional	114.5	458	8.3%
Total kcal		5470	
DMIX	575.3g de galleta funcional	2342.4 de las cuales →	-Proteína: 3.3% -Lípidos: 12.8 % -Carbohidratos: 26.7%
Lípidos adicionales	292	2628	48 %
Carbohidratos adicionales	10.4	42	0.7 %
Proteína adicional	114.5	458	8.3 %
Total kcal		5470	

DNOP (grupo de roedores alimentados con dieta parcialmente sustituida con galleta de nopal), DXO (grupo de roedores alimentados con dieta parcialmente sustituida con galleta de xoconostle) o DMIX (grupo de roedores alimentados con dieta parcialmente sustituida con galleta mixta).

7.9 Ensayo final *in vivo*, evaluación del efecto antiobesogénico y hepatoprotector de galletas adicionadas con 15 % de harina de nopal y xoconostle e incorporadas en una dieta hiperlipídica

Durante el ensayo se monitoreo la cantidad de alimento que consumieron las ratas por día, con la finalidad de relacionar el consumo de alimento y los efectos obtenidos en el ensayo. La Tabla 11 se muestra el consumo promedio de alimento por las ratas de los cinco grupos. El grupo que consumió una mayor cantidad de alimento por día fue el grupo de referencia, con un consumo de 28.8 g diarios, el grupo con el menor consumo, lo obtuvieron las ratas control positivo o animales alimentados con la dieta hiperlipídica con un una ingesta diaria de 23.4 g, mientras que los grupos funcionales nopal, xoconostle y nopal-xoconostle consumieron en promedio 27 g diarios y no presentaron diferencias significativas entre ellos.

El alimento fue bien aceptado por las ratas, y pese al alto valor calórico de la dieta, atribuido principalmente a los lípidos, cuyo aporte fue del 60%, no se logró inducir obesidad en los roedores. La Tabla 11 registra los valores del índice de masa corporal para los animales, con un valor mayor de 0.3 las ratas se consideraron obesas, el resultado mostró un índice menor a 0.3. Por lo tanto, no se consideraron animales obesos. Sin embargo, si hubo una diferencia significativa, entre los grupos funcionales y el de referencia en comparación con el grupo de animales alimentados con la dieta hiperlipídica, donde su índice se aproximó más al desarrollo de obesidad⁹⁶.

El incremento de peso en los animales asociado al tipo de dieta y su relación con el desarrollo de obesidad, presentó diferencias significativas entre los grupos controles, obteniéndose un mayor peso para los animales alimentados con la dieta hiperlipídica, por lo que registraron un mayor índice de masa corporal. Los animales que tuvieron un menor incremento de peso, fueron los animales con la dieta de referencia. Sin embargo, no presentaron diferencia significativa en el índice de masa

corporal en comparación con los animales que consumieron las dietas funcionales, por lo tanto, las dietas funcionales disminuyeron el riesgo de desarrollar obesidad.

El aumento de masa corporal o índice Lee, no presentó relación con la cantidad de alimento consumido por las ratas. El grupo de animales con el menor consumo de alimento, grupo control positivo, presentó el mayor índice de masa corporal, mientras que el grupo de referencia con el mayor consumo de alimento presentaron un índice Lee bajo, similar a las dietas funcionales. Por lo que el aumento de peso en las ratas con la dieta obesogénica es atribuido a la naturaleza de la dieta y no a la cantidad consumida.

Un factor clave para el desarrollo de obesidad en ratas es la longitud. Las ratas del ensayo final presentaron diferencias significativas en crecimiento, respecto a las ratas del ensayo preliminar, donde sí se logró inducir obesidad a los roedores en un menor tiempo de experimentación y empleando la misma dieta hiperlipídica, la longitud se registró en la Tabla 12. El aumento de la longitud de los animales determinó que las ratas del ensayo final no desarrollaran obesidad. El incremento en la longitud del hueso se relaciona posiblemente con el consumo de calcio, las ratas con dietas funcionales presentaron un mayor crecimiento, el resultado puede estar relacionado con el alto contenido de calcio en el nopal y el xoconostle, un aumento de este mineral en la dieta pudo repercutir directamente en la longitud del animal, en el caso de las dietas control positivo y negativo, también fueron significativamente más grandes que los animales del ensayo preliminar. Este efecto se atribuye a que se utilizaron ingredientes puros para la elaboración de la dieta, a diferencia del ensayo preliminar donde se empleó leche comercial en polvo, como un alimento base y a partir del cual se ajustaron todos los componentes de la dieta, de acuerdo a los requerimientos para una dieta hiperlipídica, por lo que el contenido de calcio posiblemente fue menor y esto influyó en un menor desarrollo de los animales. Una observación adicional es que los animales de la dieta hiperlipídica, presentaron un menor crecimiento en comparación con los animales de las dietas funcionales y la dieta referencia, esto debido a que tuvieron un menor consumo de

alimento, por lo que posiblemente no obtuvieron las mismas cantidades de calcio que los otro animales.

Tabla 11. Consumo de alimento, peso inicial, índice Lee de las ratas Wistar.

Grupo	Consumo de alimento (g)	Peso inicial (g)	Ganancia de peso (g)	Índice Lee
DNOP	26.71 ± 1.44 ^C	374.16 ± 38.71 ^A	152.25 ± 53.22 ^B	0.23 ± 0.014 ^B
DXO	27.6 ± 1.33 ^B	403.83 ± 48.35 ^A	164.75 ± 36.67 ^{AB}	0.23 ± 0.005 ^B
DMIX	27.06 ± 1.63 ^{BC}	376.83 ± 24.2 ^A	170 ± 49 ^{AB}	0.23 ± 0.005 ^{AB}
DREF	28.84 ± 2.12 ^A	362.6 ± 54.64 ^A	78 ± 5.55 ^C	0.22 ± 0.005 ^B
DHL	23.46 ± 0.84 ^D	365.16 ± 10.28 ^A	220.25 ± 50.97 ^A	0.25 ± 0.005 ^A

Media de cinco repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa, letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabla 12. Longitud final de las ratas del ensayo preliminar vs ratas del ensayo final.

Tratamiento	Longitud final de los animales (cm)
DNOP	34.75 ± 0.5 ^A
DXO	34.5 ± 1 ^{AB}
DMX	34 ± 0.81 ^{AB}
DREF	33.5 ± 1 ^{AB}
DHL	32.5 ± 0.57 ^B
Preliminar	25.33 ± 1.36 ^C

Media de cinco repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa, letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

7.10 Ensayo final *in vivo*, cuantificación de triacilgliceroles hepáticos y grasa total en hígado de ratas Wistar

El hígado graso no alcohólico se caracteriza por una acumulación de lípidos, macro o microvesicular, mayor a 5% del peso total del hígado. El porcentaje de lípidos hepáticos totales de las ratas (Tabla 13), muestran que los roedores de los grupos funcionales DNOP, DXO, DMIX y el grupo DHL, desarrollaron EHGNA, pues los lípidos representaban un porcentaje mayor al 5% del peso total del hígado. Los animales alimentados con la dieta de referencia no desarrollaron EHGNA. Sin embargo es importante resaltar que pese al desarrollo de hígado graso no alcohólico en las ratas alimentadas con las dietas hiperlipídica funcionales, podemos observar que el contenido de lípidos fue significativamente menor que el presentado en los hígados de las ratas alimentadas con la dieta hiperlipídica. Dicho efecto es atribuido a los compuestos bioactivos del nopal y el xoconostle. Para conocer los efectos hepatoprotectores de las harinas de nopal y xoconostle, en EHGNA, se cuantifico las concentración de triacilgliceroles hepáticos en los hígados de las ratas alimentadas con dietas hiperlipídicas, que contenían como alimento base galletas adicionadas con un 15% de harina de nopal, xoconostle y mezcla nopal-xoconostle. Posteriormente, se realizó un análisis estadístico, para determinar si había diferencias, entre los grupos funcionales y los grupos de animales alimentados con las dietas referencia, animales sanos y los animales enfermos, alimentados con una dieta totalmente hiperlipídica.

Los resultados del análisis estadístico mostraron que no existió diferencia significativa en las concentraciones de triacilgliceroles hepáticos (TGH), para los grupos de animales sanos, alimentados con la dieta referencia y los animales alimentados con las dietas funcionales, que contenían nopal y xoconostle. Se observó una reducción de 73% y 61% de TGH para los animales alimentados con las dietas que contenían nopal y xoconostle respectivamente, en comparación con

las concentraciones de triglicéridos hepáticos de los roedores alimentados con la dieta hiperlipídica control positivo. La dieta que contenía una mezcla de harinas de nopal y xoconostle también presentó una diferencia significativa respecto a los animales enfermos, disminuyendo un 55% la concentración de TGH, sin embargo, se puede observar que las harinas presentaron mejores resultados sobre las concentraciones de TGH cuando se emplearon de forma individual ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

Tabla 13. Contenido de grasa total hepática y triacilglicerolos hepáticos de las ratas Wistar.

Grupo	Grasa total en hígado (%)	Triglicéridos hepáticos $\mu\text{g} \cdot \text{mg}$ de tejido
DNOP	8.05 ± 1.06^B	104.75 ± 21.3^B
DXO	8.57 ± 2.96^B	152.64 ± 38.4^B
DMX	7.92 ± 1.05^B	175.71 ± 41.89^B
DREF	3.5 ± 0.29^C	67.42 ± 11.22^B
DHL	13.5 ± 1.65^A	389.7 ± 111.27^A

Media de 5 repeticiones \pm desviación estándar. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa ($p < 0.05$). Grupo de roedores alimentados con dieta parcialmente sustituida con galleta de nopal (DNOP), galleta de xoconostle (DXO) o galleta mixta (DMIX).

7.11 Perfil bioquímico de las ratas Wistar

Los resultados del perfil bioquímico de las ratas (Tabla 14) demuestran que las ratas desarrollaron dislipidemia diabética¹⁰⁷. El notable incremento de los TG y glucosa, fuera de los parámetros de referencia, es característico en este tipo de desorden metabólico, es asociado a una mayor actividad de TNF- α , se ha observado que la

expresión de la citocina proinflamatoria TNF- α se incrementa en sujetos obesos y de sujetos con resistencia a la insulina^{108,109}.

Se ha evidenciado el papel de TNF- α en la regulación de triacilgliceroles al inhibir la acción de la lipoproteinlipasa (LPL), repercutiendo en el aumento de TG en la circulación periférica^{110,111}. Como podemos observar los niveles de TG en todos los grupos con excepción del grupo referencia (DREF), se encuentran fuera de los límites de referencia, esto es normal debido a que son modelos de obesidad. Por otra parte, a pesar de no existir diferencia significativa en el contenido de TG plasmáticos para todos los grupos, los niveles de TG se incrementaron hasta en un 100% para las ratas alimentadas con dietas funcionales en comparación con las ratas del grupo referencia (DREF), mientras que las ratas del grupo con la dieta hiperlipídica solo incrementaron un 63%. Sin embargo, es importante recordar que las ratas alimentadas con las dietas funcionales presentaron diferencias significativas en el contenido de TAG hepáticos, hasta 70% menos depósito de TAG que los animales alimentados con DHL. Esto podría deberse a que los compuestos del nopal y xoconostle protegieron al hígado de la acumulación ectópica de lípidos. Sin embargo, pese al notable incremento de TAG en sangre, los niveles de colesterol fueron mayores en las ratas alimentadas con la dieta que contenía nopal y xoconostle.

Los niveles de colesterol total fueron significativamente diferentes para los animales alimentados con DHL presentando el menor contenido comparado con los animales alimentados con las dietas que contenían nopal y xoconostle. La disminución en la síntesis de colesterol LDL y HDL se relaciona con una mayor actividad de TNF- α , y tiene varias explicaciones una de ellas es la inhibición de LPL, la LPL es una enzima encargada de la hidrólisis de los TAG de los quilomicrones (QM) y de las VLDL, para liberar los ácidos grasos y el glicerol y así poder ser incorporados en las lipoproteínas^{112,113}. Cabe mencionar que el aumento de la actividad de TNF- α está relacionado con una reducción en la síntesis de colesterol HDL. Se ha reportado que TNF- α interviene en diferentes procesos como: 1) Inhibir la expresión de APO AI y APO E en hepatocitos, interfiriendo en la síntesis de HDL. 2) Se ha observado

que TNF- α disminuye la síntesis de HDL en células intestinales. 3) TNF- α disminuye la expresión de ABCA1 (transportador de la superficie celular llamada ABCA1) el cual facilita el transporte reverso del colesterol. Todo esto influye en los niveles bajos de colesterol HDL^{114,115}. En este estudio a pesar de que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el contenido de colesterol HDL para todos los grupos, se observó 22.94% más colesterol HDL en los animales alimentados dietas funcionales que los animales del grupo alimentados con DHL, posiblemente los compuestos del nopal y xoconostle inhibían parcialmente el factor TNF- α , se ha observado en estudios que la administración de anticuerpos monoclonales anti-TNF α humano (Infliximab) a pacientes con artritis reumatoide, aumenta los niveles de HDL-C y disminuye el índice aterogénico^{116,117}. El colesterol HDL es encargado del transporte reverso de colesterol, este mecanismo es esencial para la homeostasis del colesterol y se considera clave para impedir la acumulación de lipoproteínas de baja densidad LDL y VLDL, las cuales debido a su carácter aterogénico suelen aglomerarse en los macrófagos de la íntima arterial. El transporte reverso de colesterol, consiste en remover estos lípidos de las arterias y llevarlos hacia el hígado donde servirán para la síntesis de colesterol de alta densidad HDL.

Es importante resaltar que los valores de C-HDL encontrados en el grupo de ratas alimentados con la dieta DNOP fueron similares al de los alimentados con la DREF en cuanto al porcentaje que representan del colesterol total, siendo para DNOP de 74.79% y para DREF de 75.0%. El menor valor del porcentaje de HDL con respecto al colesterol total fue para los roedores alimentados con la DMIX (68.61%), DHL (69.0%) y DMIX (69.62%).

Otro parámetro importante en este ensayo, son los niveles de glucosa en sangre, estos se encontraron por encima del límite referencia, por lo que las ratas desarrollaron diabetes tipo 2. Este tipo de diabetes se presenta cuando aumenta el contenido de grasa visceral, la cual interfiere con la funcionalidad de la insulina y desencadena procesos inflamatorios. El aumento de la actividad de TNF- α en paciente obesos disminuye la señalización intracelular del receptor de insulina en

adipocitos. La inhibición de IRS-1 (substrato del receptor de insulina-1) hace a esta molécula un pobre sustrato para fosforilación de los residuos de tirosina mediada por el receptor de insulina, y disminuyendo la amplificación intracelular de la señal del receptor insulínico, generando un estado de resistencia a la insulina¹¹⁸⁻¹¹⁹. TNF- α también altera la función de moléculas llamadas transportadoras de glucosa (GLUT) de la membrana celular, como la GLUT 4. Otro punto es el desarrollo de diabetes tipo 1, debido a la carga de lípidos en los islotes produciendo una reducción de la secreción de insulina¹²⁰⁻¹²².

Como marcadores adicionales de daño hepático y renal atribuido al desorden metabólico de los modelos biológicos, son concentraciones altas de urea y creatinina en sangre, los cuales evidentemente en las ratas de este ensayo se vieron en el límite o por encima del límite superior, debido al síndrome metabólico por el que estaban pasando¹²³. Cabe mencionar que los animales alimentados con la dieta control, también desarrollaron diabetes, existen reportes que sugieren que la dieta AIN-93 empleada en este estudio, es promotora de desórdenes metabólicos debido al alto contenido de carbohidratos, por lo que dicho evento podría relacionarse con el aumento de glucosa en sangre.

Tabla 14. Perfil bioquímico de las ratas Wistar.

Metabolito	Valores referencia	DREF	DHL	DNOP	DXO	DMIX
Colesterol total (mg/dL)	37-85	68.76 ± 13.04 ^{AB}	57.78 ± 6.22 ^B	70.81 ± 13.58 ^{AB}	85.61 ± 8.27 ^A	74.39 ± 10.93 ^{AB}
HDL (mg/dL)	20 - 90	51.74 ± 12.92 ^A	39.87 ± 5.69 ^A	52.96 ± 11.19 ^A	59.61 ± 5.63 ^A	51.04 ± 6.12 ^A
LDL (mg/dL)	20 -30	9.87 ± 1.62 ^{AB}	5.10 ± 1.20 ^B	9.67 ± 4.98 ^B	16.67 ± 1.55 ^A	10.62 ± 1.43 ^{AB}
TG (mg/dL)	20 -114	102.16 ± 6.17 ^A	166.53 ± 47.82 ^A	216.30 ± 92.88 ^A	237.61 ± 48.36 ^A	233.03 ± 130.78 ^A
Glucosa (mg/dL)	70 - 208	247.19 ± 51.62 ^A	280.88 ± 52.76 ^A	230.53 ± 51.40 ^A	303.28 ± 91.28 ^A	288.45 ± 76.39 ^A
Urea (mg/dL)	12.3 - 24.6	33.59 ± 5.90 ^A	34.10 ± 6.53 ^A	43.06 ± 2.64 ^A	42.94 ± 5.81 ^A	40.64 ± 7.06 ^A
Creatinina (mg/dL)	0.2 - 0.5	0.53 ± 0.05 ^A	0.50 ± 0 ^A	0.50 ± 0 ^A	0.53 ± 0.05 ^A	0.46 ± 0.15 ^A
Ácido úrico (mg/dL)	0.88 - 4.72	1.56 ± 0.83 ^A	1.40 ± 0.36 ^A	1.35 ± 0.87 ^A	1.70 ± 1.13 ^A	1.26 ± 0.32 ^A

Media de 5 repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales en la misma fila no muestran diferencia significativa ($p < 0.05$). Grupo de roedores alimentados con dieta parcialmente sustituida con galleta de nopal (DNOP), galleta de xoconostle (DXO) o galleta mixta (DMIX).

7.12 Perfil hepático de las ratas Wistar

La Tabla 15 muestra los resultados de las pruebas de perfil hepático en los sueros de las ratas, los resultados mostraron niveles de actividad enzimática para ALT y AST cercanos al límite superior para las ratas alimentadas con las dietas funcionales y la dieta hiperlipídica. La actividad de estas enzimas se encuentra elevada en el 85 y 90% de las personas que padecen EHGNA, en cambio las enzimas GGTP Y FA se ha observado que solo aumentan en el 50 % de los pacientes. La bilirrubina, albúmina y globulina generalmente permanecen normales hasta etapas avanzadas de enfermedad hepática, en esta ocasión tanto la bilirrubina como la globulina se encontraron en el límite superior, lo que podría sugerir que la enfermedad estaba avanzando^{124,125}.

La deshidrogenasa láctica (DHL) es una enzima que cataliza la oxidación de los ácidos pirúvico y láctico. Tiene valor en oncología pues su incremento es acorde a la velocidad de duplicación de las células neoplásicas, con una relación directamente proporcional al volumen tumoral^{126,127}. En este estudio los valores de (DHL) estuvieron dentro de los parámetros normales a pesar del síndrome metabólico del que eran sujetas y la gran cantidad de lípidos depositados en los hígados al parecer aun no desarrollaban neoplasia de hígado. Cabe mencionar que las ratas alimentadas con las dietas funcionales también desarrollaron EHGNA, sin embargo los niveles de grasa en hígado fueron significativamente menores, que los niveles de lípidos en los roedores alimentados con la dieta hiperlipídica.

Tabla 15. Perfil hepático de las ratas del ensayo experimental.

Metabolito	Valores de referencia	DREF	DHL	DNOP	DXO	DMIX
AST U/L	63-175	84.41 ± 5.03 ^A	141.17 ± 59.85 ^A	126.07 ± 33.70 ^A	132.7 ± 38.17 ^A	131.13 ± 13.91 ^A
ALT U/L	19-48	28.46 ± 2.28 ^A	41.92 ± 6.92 ^A	43.72 ± 2.53 ^A	49.56 ± 19.39 ^A	52.03 ± 25.28 ^A
FA U/L	36-131	78.93 ± 27.35 ^B	79.87 ± 18.37 ^B	135.17 ± 5.91 ^{AB}	203.5 ± 87.03 ^A	150.36 ± 22.31 ^{AB}
BT mg/dL	0.04-0.2	0.06 ± 0.05 ^A	0.05 ± 0.05 ^A	0 ^A	0.06 ± 0.05 ^A	0.03 ± 0.05 ^A
GGTP U/L	0-3.13	0	0	0	0	0
DHL U/L	272- 1965	727.83 ± 186.88 ^A	619.03 ± 480.32 ^A	1176.5 ± 252.47 ^A	1005.2 ± 267.76 ^A	790.33 ± 72.5 ^A
PT g/dL	5.6- 7.6	6.23 ± 0.3 ^A	6.22 ± 0.17 ^A	6.2 ± 0.11 ^A	6.3 ± 0.45 ^A	6.2 ± 0.2 ^A
ALB g/dL	3.6-4.7	4.3 ± 0.2 ^A	4.01 ± 0.17 ^A	4.09 ± 0.16 ^A	3.98 ± 0.4 ^A	4.01 ± 0.16 ^A
Globulina g/dL	1.8-2.5	1.93 ± 0.22 ^B	2.21 ± 0.05 ^A	2.1 ± 0.08 ^{AB}	2.32 ± 0.05 ^A	2.18 ± 0.1 ^{AB}

Media de 5 repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales en la misma fila no muestran diferencia significativa ($p < 0.05$). Grupo de roedores alimentados con dieta parcialmente sustituida con galleta de nopal (DNOP), galleta de xoconostle (DXO) o galleta mixta (DMIX).

7.13 Pruebas antioxidantes de las harinas de cladodios de *O.atropes* y xoconostle de *O.joconostle spp*

La Tabla 16 muestra los resultados de las pruebas antioxidantes. La cuantificación de fenoles totales y flavonoides totales, indicó mediante el análisis de t de student, (valor t de 0.0001), que las medias fueron significativamente diferentes, obteniéndose una cantidad mayor de flavonoides y polifenoles, en los extractos de la harina de xoconostles en comparación con los extractos de la harina de cladodios de nopal. En cuanto a la actividad antioxidante de las harinas, se observa que la harina de xoconostle presentó mejores resultados capturando radicales DPPH·, en comparación con los extractos de la harina de nopal. Cabe mencionar, que la capacidad antioxidante de los extractos de xoconostle, podría no solo atribuirse a la cantidad superior de flavonoides y polifenoles, sino también a la presencia de otro metabolito llamado betacianina. Debido a que la extracción fue de carácter hidrofílico, y las betacianinas son polares, la capacidad antioxidante de la harina de xoconostle, puede estar influenciada por la presencia de betalaínas, las cuales se han descrito como poderosos antioxidantes y estabilizadores de radicales libres. Por lo que es importante efectuar un ensayo más amplio, sobre la actividad antioxidante del nopal y xoconostle, para conocer si los compuestos polifenólicos presentes en los extractos tienen actividad antioxidante igual o inferior a los compuestos betalaínicos, presentes en la harina de xoconostle, ya que es una característica que está directamente relacionada con los efectos benéficos a la salud.

Tabla 16. Pruebas antioxidantes de las harinas de nopal *Opuntia atropes* y fruto xoconostle de *Opuntia joconostle spp.*

Prueba antioxidante	Harina de nopal <i>O.atropes</i>	Harina de xoconostle <i>O.joconostle spp</i>
Polifenoles totales	1.09 ± 0.02 ^B mg EAG/g	6.22 ± 0.2 ^A mg EAG/g
Flavonoides totales	4.24 ± 0.06 ^B mg EQ/g	12.74 ± 0.19 ^A mg EQ/g
DPPH.	0.59 ± 0.02 ^B mg EAG/g	1.60 ± 0.04 ^A mg EAG/g

Media de 5 repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales en la misma fila no muestran diferencia significativa ($p < 0.05$).

8.- CONCLUSIONES

La formulación de una galleta adicionada con harinas de nopal-xoconostle presentó una buena aceptación sensorial por parte de los panelistas. Sin embargo, la sustitución de harina de trigo por harina funcional es adecuada hasta un 10 %, para no afectar las propiedades de dureza y fracturabilidad del alimento.

La administración de una dieta hiperlipídica en ratas Wistar favorece el desarrollo de obesidad, dislipidemia diabética y es un inductor de hígado graso no alcohólico. No obstante, los roedores pudieron desarrollar EHGNA sin llegar a ser obesos.

Pese al contenido elevado de lípidos dietéticos, la galleta si presentó un efecto sobre EHGNA, disminuyendo el depósito de triacilgliceroles e incrementando la síntesis de colesterol HDL. Por lo tanto, la incorporación de harinas funcionales provenientes de alimentos como el nopal y el xoconostle, en alimentos de consumo cotidiano, presentan un efecto positivo en el control de obesidad y desarrollo de EHGNA en ratas Wistar como modelo biológico.

9.- REFERENCIAS

1. Ràfols, M. E. (2014). "Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional". *Endocrinología y Nutrición* **61**(2): 100-112.
2. Gerlach, G., et al. (2015). "Personality traits and obesity: a systematic review". *Obesity Reviews* **16**(1): 32-63.
3. Piché, M.-E., et al. (2018). "Overview of epidemiology and contribution of obesity and body fat distribution to cardiovascular disease: an update". *Progress in Cardiovascular Diseases* **61**(2): 103-113.
4. Mazic, S., et al. (2009). "Overweight in trained subjects-are we looking at wrong numbers?(Body mass index compared with body fat percentage in estimating overweight in athletes.)". *Gen Physiol Biophys* **28**: 200-204.
5. Deurenberg, P., et al. (1991). "Body mass index as a measure of body fatness: age-and sex-specific prediction formulas". *British Journal of Nutrition* **65**(2): 105-114.
6. Ibáñez, N. R., et al. (2011). "Exactitud de las mediciones de adiposidad para identificar síndrome metabólico y sus componentes". *Medicina Interna de México* **27**(3): 244-252.
7. Chiquete, E., et al. (2014). "The Quételet index revisited in children and adults". *Endocrinología y Nutrición (English Edition)* **61**(2): 87-92.
8. Jonnalagadda, S. S., et al. (2004). "Overweight athlete: fact or fiction?". *Current_Sports Medicine Reports* **3**(4): 198-205.
9. Villatoro-Villar, M., et al. (2015). "Correlación del índice de masa corporal y el porcentaje de grasa corporal en la evaluación del sobrepeso y la obesidad". *Revista de Sanidad Militar* **69**(6): 568-578.
10. Després, J.-P. and I. Lemieux (2006). "Abdominal obesity and metabolic syndrome". *Nature* **444**(7121): 881-887.
11. Galassi, A., et al. (2006). "Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis". *The American journal of medicine* **119**(10): 812-819.

12. Ràfols, M. E. (2014). "Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional". *Endocrinología y Nutrición* **61**(2): 100-112.
13. Frayn, K., et al. (2003). "Integrative physiology of human adipose tissue". *International Journal of Obesity* **27**(8): 875-888.
14. Zuk, P. A., et al. (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells". *Molecular biology of the cell* **13**(12): 4279-4295.
15. Juge-Aubry, C. E., et al. (2005). "Adipose tissue: a regulator of inflammation". *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **19**(4): 547-566.
16. Juge-Aubry, C. E., et al. (2005). "Adipose tissue: a regulator of inflammation". *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **19**(4): 547-566
17. Pérez, M. R. and G. Medina-Gómez (2011). "Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina". *Endocrinología y Nutrición* **58**(7): 360-369.
18. Hosoi, T., et al. (2002). "Leptin regulates interleukin-1 β expression in the brain via the STAT3-independent mechanisms". *Brain Research* **949**(1-2): 139-146.
19. Fernández-Real, J. M. and W. Ricart (2003). "Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome". *Endocrine Reviews* **24**(3): 278-301.
20. Trujillo, M. E., et al. (2004). "Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**(11): 5577-5582.
21. Van Hall, G., et al. (2003). "Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88**(7): 3005-3010.
22. Torti, F. M., et al. (1985). "A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia". *Science* **229**(4716): 867-869.
23. Zechner, R., et al. (1988). "Recombinant human cachectin/tumor necrosis factor but not interleukin-1 alpha downregulates lipoprotein lipase gene expression at the transcriptional level in mouse 3T3-L1 adipocytes". *Molecular and Cellular Biology* **8**(6): 2394-2401.

24. Mathieu, P., et al. (2009). "Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease". *Hypertension* **53**(4): 577-584.
25. Després, J.-P. and I. Lemieux (2006). "Abdominal obesity and metabolic syndrome". *Nature* **444**(7121): 881-887.
26. Arsenault, B. J., et al. (2007). "Cholesterol levels in small LDL particles predict the risk of coronary heart disease in the EPIC-Norfolk prospective population study". *European Heart Journal* **28**(22): 2770-2777.
27. Reaven, G. M. (2005). "The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment". *Annual Review of Nutrition*. **25**: 391-406
28. Unger, R. H. (2003). "Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome". *Endocrinology* **144**(12): 5159-5165.
29. Unger, R. H. and L. Orci (2000). "Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity". *International Journal of Obesity* **24**(4): S28-S32.
30. Maeda, N., et al. (2002). "Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30". *Nature Medicine* **8**(7): 731-737.
31. Heymsfield, S. B. and T. A. Wadden (2017). "Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity". *New England Journal of Medicine* **376**(3): 254-266.
32. Kawano, Y. and D. E. Cohen (2013). "Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease". *Journal of Gastroenterology* **48**(4): 434-441.
33. Aguilera-Méndez, A., et al. (2013). "Hepatic diseases related to triglyceride metabolism." *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **13**(12): 1691-1699.
34. Martín-Domínguez, V., et al. (2013). "Etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólica". *Revista española de Enfermedades Digestivas* **105**(7): 409-420.
35. Palekar, N. A., et al. (2006). "Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease". *Liver International* **26**(2): 151-156.

36. Marchesini, G., et al. (2016). "Diet, weight loss, and liver health in nonalcoholic fatty liver disease: Pathophysiology, evidence, and practice". *Hepatology* **63**(6): 2032-2043.
37. Harrison, S. A., et al. (2003). "Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis". *The American Journal of Gastroenterology* **98**(11): 2485-2490.
38. Kwon, D. Y., et al. (2009). "Impaired sulfur-amino acid metabolism and oxidative stress in nonalcoholic fatty liver are alleviated by betaine supplementation in rats". *The Journal of Nutrition* **139**(1): 63-68.
39. Pereira-Lancha, L. O., et al. (2010). "Body fat regulation: is it a result of a simple energy balance or a high fat intake?". *Journal of the American College of Nutrition* **29**(4): 343-351.
40. Acheson, K., et al. (1988). "Glycogen storage capacity and de novo lipogenesis during massive carbohydrate overfeeding in man". *The American Journal of Clinical Nutrition* **48**(2): 240-247.
41. Salmon, D. and J. Flatt (1985). "Effect of dietary fat content on the incidence of obesity among ad libitum fed mice". *International Journal of Obesity* **9**(6): 443-449.
42. Wang, H., et al. (2002). "Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression". *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **282**(6): E1352-E1359
43. Frederich, R. C., et al. (1995). "Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action". *Nature Medicine* **1**(12): 1311-1314.
44. Batterham, R. L., et al. (2003). "Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3–36". *New England Journal of Medicine* **349**(10): 941-948.
45. French, S. A., et al. (2001). "Environmental influences on eating and physical activity". *Annual Review of Public Health* **22**(1): 309-335.
46. Badui Dergal, S. (2016). *Química de los alimentos*, México, Pearson Educación.

47. Frewer, L., et al. (2003). "Consumer acceptance of functional foods: issues for the future". *British food journal*.
48. Khan, R. S., et al. (2013). "Functional food product development— Opportunities and challenges for food manufacturers". *Trends in Food Science & Technology* **30**(1): 27-37.
49. Shoji, Y. and H. Nakashima (2004). "Nutraceuticals and delivery systems". *Journal of drug targeting* **12**(6): 385-391.
50. Daniel, H. (2002). "Genomics and proteomics: importance for the future of nutrition research". *British journal of nutrition* **87**(S2): S305-S311.
51. Cooper, D. A. (2004). "Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer". *The Journal of nutrition* **134**(1): 221S-224S.
52. Elliott, R. (2005). "Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1740**(2): 147-154.
53. Bendich, A. and J. A. Olson (1989). "Biological actions of carotenoids". *The FASEB journal* **3**(8): 1927-1932.
54. Manach, C., et al. (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability". *The American journal of clinical nutrition* **79**(5): 727-747.
55. Moreno, D. A., et al. (2008). "Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health". *Phytochemistry Reviews* **7**(2): 261-280.
56. Ravichandran, K., et al. (2013). "Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity". *Food Research International* **50**(2): 670-675.
57. Jáuregui, A. M. M., et al. (2011). "Fitoesteroles y fitoestanoles: Propiedades saludables". *Horizonte Médico* **11**(2): 93-100.
58. Sanclemente, T., et al. (2012). "Beneficios dietéticos asociados a la ingesta habitual de dosis moderadas de fitoesteroles presentes de forma natural en los alimentos". *Clínica e investigación en Arteriosclerosis* **24**(1): 21-29.

59. de Mora, B. R.-R. C. and L. P.-O. Conde (2010). "Avance de resultados sobre consumo de fibra en España y beneficios asociados a la ingesta de fibra insoluble". *Revista Española de Nutrición Comunitaria* **16**(3): 147-153.
60. Martinez-Flores, H. E., et al. (2004). "Effect of high fiber products on blood lipids and lipoproteins in hamsters". *Nutrition research* **24**(1): 85-93.
61. Champ, M., et al. (2003). "Advances in dietary fibre characterisation. 1. Definition of dietary fibre, physiological relevance, health benefits and analytical aspects". *Nutrition Research Reviews* **16**(1): 71-82.
62. Ayadi, M., et al. (2009). "Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making". *Industrial Crops and Products* **30**(1): 40-47.
63. Scheinvar, L. (2009). *Subfamilia Opuntioideae (Cactaceae), México: Universidad Nacional Autónoma de México*
64. Rodríguez-García, M., et al. (2007). "Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus indica*) and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation". *Plant Foods for Human Nutrition* **62**(3): 107-112.
65. Stintzing, F. C. and R. Carle (2005). "Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses". *Molecular Nutrition & Food Research* **49**(2): 175-194.
66. Kaur, M., et al. (2012). "Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: A Review". *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2**(7): 15-18.
67. Livrea, M. A. and L. Tesoriere (2006). "Health benefits and bioactive components of the fruits from *Opuntia ficus-indica* [L.] Mill". *Journal of the Professional Association for Cactus Development* **8**(1): 73-90.
68. Kaur, M., et al. (2012). "Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: A Review". *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2**(7): 15-18.
69. Tesoriere, L., et al. (2004). "Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C". *The American Journal of Clinical Nutrition* **80**(2): 391-395.

70. Morán-Ramos, S., et al. (2012). "Opuntia ficus indica (nopal) attenuates hepatic steatosis and oxidative stress in obese Zucker (fa/fa) rats". *The Journal of Nutrition* **142**(11): 1956-1963.
71. Hassan, F., et al. (2011). "Nutritional value and hypoglycemic effect of prickly cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit juice in alloxan-induced diabetic rats.}. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **5**(10): 356-377.
72. Park, E.-H., et al. (2001). "An anti-inflammatory principle from cactus". *Fitoterapia* **72**(3): 288-290.
73. Loro, J., et al. (1999). "Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Opuntia dillenii* aqueous extract". *Journal of Ethnopharmacology* **67**(2): 213-218
74. Lee, J.-C., et al. (2002). "Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(22): 6490-6496.
75. Bensadón, S., et al. (2010). "By-products of *Opuntia ficus-indica* as a source of antioxidant dietary fiber". *Plant Foods for Human Nutrition* **65**(3): 210-216.
76. Kim, J.-H., et al. (2006). "*Opuntia ficus-indica* attenuates neuronal injury in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia". *Journal of Ethnopharmacology* **104**(1-2): 257-262.
77. Srekanth, D., et al. (2007). "Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562". *Phytomedicine* **14**(11): 739-746.
78. AACC, C. (2000). "Approved methods of the American association of cereal chemists". *Methods* **54**: 21.
79. Sudha, M., et al. (2007). "Influence of fibre from different cereals on the rheological characteristics of wheat flour dough and on biscuit quality". *Food Chemistry* **100**(4): 1365-1370.
80. Gallegos-Infante, J., et al. (2010). "Quality of spaghetti pasta containing Mexican common bean flour (*Phaseolus vulgaris* L.)". *Food Chemistry* **119**(4): 1544-1549.

81. AOAC International. (2000). Official methods of analysis of AOAC International. 17^a edición. 934.01
82. Prosky, L., et al. (1985). "Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study". Journal of the Association of Official Analytical Chemists **68**(4): 677-679.
83. Reeves P. (1997). Symposium: Animal Diets for Nutritional and Toxicological Research. U.S. Department of Agriculture. 838-841.
84. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. (2001). pp 110-155
85. AACC, C. (2000). "Approved methods of the American association of cereal chemists". Methods **54**: 21.
86. Aguilera-Méndez, A. and C. Fernández-Mejía (2012). "The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation". Biofactors **38**(5): 387-394.
87. Gandía-Herrero, F., et al. (2010). "Stabilization of the bioactive pigment of Opuntia fruits through maltodextrin encapsulation". Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(19): 10646-10652.
88. Butera, D., et al. (2002). "Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin". Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(23): 6895-6901.
89. Makkar, H. P., et al. (1993). "Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods". Journal of the Science of Food and Agriculture **61**(2): 161-165.
90. Liu, C.-L., et al. (2002). "In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity". Food and Chemical Toxicology **40**(5): 635-641.
91. Randhir, R. and K. Shetty (2007). "Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management". Innovative Food Science & Emerging Technologies **8**(2): 197-204.

92. Morgado, H. and E. Castro Montero (2007). "Parámetros mecánicos y textura de los alimentos". Universidad de Chile.
93. Talens Oliag, P. (2017). "Caracterización de las propiedades mecánicas de alimentos mediante análisis de perfil de textura". Universidad de Valencia, España
94. Gupta, M., et al. (2011). "Effect of barley flour and freeze–thaw cycles on textural nutritional and functional properties of cookies". Food and Bioproducts Processing **89**(4): 520-527
95. Ayadi, M., et al. (2009). "Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making". Industrial Crops and Products **30**(1): 40-47.
96. Liu, J., et al. (2016). "Free fatty acids, not triglycerides, are associated with non-alcoholic liver injury progression in high fat diet induced obese rats". Lipids in Health and Disease **15**(1): 27.
97. Bernardis, L. and B. Patterson (1968). "Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions". Journal of Endocrinology **40**(4): 527-528.
98. Aguilera-Méndez, A. (2019). "Esteatosis hepática no alcohólica: una enfermedad silenciosa". Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social **56**(6): 544-549.
99. Poulsen, M. M., et al. (2012). "Resveratrol up-regulates hepatic uncoupling protein 2 and prevents development of nonalcoholic fatty liver disease in rats fed a high-fat diet". Nutrition Research **32**(9): 701-708.
100. Demori, I., et al. (2006). "Combined effects of high-fat diet and ethanol induce oxidative stress in rat liver". Alcohol **40**(3): 185-191.
101. Aguilera-Mendez, A., et al. (2018). "Protective effect of supplementation with biotin against high-fructose-induced metabolic syndrome in rats". Nutrition Research **57**: 86-96.

102. Palekar, N. A., et al. (2006). "Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease". *Liver International* **26**(2): 151-156.
103. Maldonado Saavedra, O., et al. (2012). "Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas". *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **43**(2): 7-22.
104. Poulsen, M. M., et al. (2012). "Resveratrol up-regulates hepatic uncoupling protein 2 and prevents development of nonalcoholic fatty liver disease in rats fed a high-fat diet". *Nutrition Research* **32**(9): 701-708.
105. Demori, I., et al. (2006). "Combined effects of high-fat diet and ethanol induce oxidative stress in rat liver". *Alcohol* **40**(3): 185-191.
106. Aguilera-Mendez, A., et al. (2018). "Protective effect of supplementation with biotin against high-fructose-induced metabolic syndrome in rats". *Nutrition Research* **57**: 86-96.
107. Hotamisligil, G. S., et al. (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance." *Science* **259**(5091): 87-91.
108. Rotter, V., et al. (2003). "Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- α , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects." *Journal of Biological Chemistry* **278**(46): 45777-45784.
109. Bullo, M., et al. (2002). "TNF α expression of subcutaneous adipose tissue in obese and morbid obese females: relationship to adipocyte LPL activity and leptin synthesis." *International Journal of Obesity* **26**(5): 652-658.
110. Kern, P. A., et al. (1995). "The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase." *The Journal of clinical investigation* **95**(5): 2111-2119.
111. Fried, S. K. and R. Zechner (1989). "Cachectin/tumor necrosis factor decreases human adipose tissue lipoprotein lipase mRNA levels, synthesis, and activity." *Journal of Lipid Research* **30**(12): 1917-1923.

112. Hauner, H., et al. (1995). "Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF α) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture." Diabetologia **38**(7): 764-771.
113. Haas, M. J., et al. (2003). "Suppression of apolipoprotein AI gene expression in HepG2 cells by TNF α and IL-1 β ." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **1623**(2-3): 120-128.
114. Song, H., et al. (1998). "IL-1 β and TNF- α suppress apolipoprotein (apo) E secretion and apo AI expression in HepG2 cells." Cytokine **10**(4): 275-280.
115. Mehran, M., et al. (1995). "Tumor necrosis factor-alpha inhibits lipid and lipoprotein transport by Caco-2 cells." American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology **269**(6): G953-G960.
116. Popa, C., et al. (2005). "Influence of anti-tumour necrosis factor therapy on cardiovascular risk factors in patients with active rheumatoid arthritis." Annals of the rheumatic diseases **64**(2): 303-305.
117. Spanakis, E., et al. (2006). "Modest but sustained increase of serum high density lipoprotein cholesterol levels in patients with inflammatory arthritides treated with infliximab." The Journal of Rheumatology **33**(12): 2440-2446.
118. Moschen, A. R., et al. (2010). "Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor α expression." Gut **59**(9): 1259-1264.
119. Fernandez-Veledo, S., et al. (2009). "c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor- α induces insulin resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: reversal by liver X receptor agonists." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **94**(9): 3583-3593.
120. Gupta, D., et al. (2007). "Long-term effects of tumor necrosis factor- α treatment on insulin signaling pathway in HepG2 cells and HepG2 cells overexpressing constitutively active Akt/PKB." Journal of cellular biochemistry **100**(3): 593-607.

121. Bouzakri, K. and J. R. Zierath (2007). "MAP4K4 gene silencing in human skeletal muscle prevents tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance." Journal of Biological Chemistry **282**(11): 7783-7789.
122. Brunham, L. R., et al. (2010). "Cholesterol in β -cell dysfunction: the emerging connection between HDL cholesterol and Type 2 diabetes." Current diabetes reports **10**(1): 55-60.
123. Brinkworth, G., et al. (2004). "Long-term effects of a high-protein, low-carbohydrate diet on weight control and cardiovascular risk markers in obese hyperinsulinemic subjects." International Journal of Obesity **28**(5): 661-670.
124. Fierbinteanu-Braticevici, C., et al. (2010). "Noninvasive investigations for non alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis." World Journal of Gastroenterology: WJG **16**(38): 4784.
125. Festi, D., et al. (2013). "the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease—availability and accuracy of non-invasive methods." Alimentary pharmacology & therapeutics **37**(4): 392-400.
126. Spanier, S., et al. (1990). "The effect of local extent of the tumor on prognosis in osteosarcoma." The Journal of bone and joint surgery. American volume **72**(5): 643-653.
127. Koukourakis, M. I., et al. (2006). "Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer: strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway—a report of the Tumour Angiogenesis Research Group." Journal of clinical oncology **24**(26): 4301-4308.