



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

FACULTAD DE QUÍMICA

**Determinación de la actividad  
antioxidante del nopal (*Opuntia ficus  
indica*): estudios *in vitro* e *in vivo***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

**Q.A. AZALIA AVILA NAVA**



Tutor: Dr. José Pedraza Chaverri

MÉXICO, D. F.

AGOSTO/2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*“El secreto de la felicidad no es hacer siempre lo que se quiere, sino querer siempre lo que se hace”*

*Tolstói*

## *Agradecimientos*

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 209 del departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. José Pedraza Chaverri.

El comité tutor para el desarrollo de esta investigación fue integrado por:

Dra. Nimbe Torres y Torres      Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ)

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre      Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Nimbe Torres y Torres del Departamento Fisiología de la Nutrición del INNSZ, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos para obtención del extracto de nopal y la determinación de la expresión génica en tejido.

Se reconoce la asesoría técnica de la M. en C. Mariel Calderón Oliver y del M. en C. Omar Medina Campos en los experimentos para la determinación de atrapamiento de especies reactivas y actividad antioxidante.

Se reconoce la asesoría del M. en C. Eduardo Molina Jijón.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT clave No. 129838 Y PAPIIT clave No. IN201910. Durante el desarrollo de la maestría goce de una beca otorgada por CONACYT.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día de Agosto del 2012.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente      Dra. Victoria Chagoya De Sánchez      Instituto de Fisiología, UNAM

Vocal      Dra. María Del Carmen Wachter Rodarte      Facultad de Química, UNAM

Vocal      Dra. Amelia Farrés González-Saravia      Facultad de Química, UNAM

Vocal      Dra. María Amanda Gálvez Mariscal      Facultad de Química, UNAM

Secretario      Dr. Armando Tovar Palacio      INNSZ

## *Agradecimientos especiales*

*Una vez más tengo la posibilidad de agradecer a la Universidad Autónoma de México por ser mi casa de estudios y hacer que mis aspiraciones personales más que sueños se conviertan en una realidad; a la facultad de Química que ha sido mi lugar de nacimiento como profesionista.*

*Como lo he dicho siempre creeré incondicionalmente en la frase “hay que endurecer sin perder la ternura jamás” (Ernesto Guevara de la Serna), de esa misma manera siempre pensaré que el apoyo personal estará por encima del apoyo profesional, sin menospreciar este último. Y esto lo escribo por el simple hecho de reconocer que las muestras de afecto hacia uno mismo y de las demás personas, por mínima que sea, siempre será el impulso para llevar a cabo las actividades del día a día.*

*Después de haber recorrido esta parte de mi vida al llevar a cabo mis estudios de maestría tengo infinidad de aprendizajes y he de reconocer que son todos buenos, pues son bastantes enseñanzas para mejorar como persona en la vida.*

*Agradecer el apoyo brindado por el Dr. José Pedraza Chaverri, en cuyo laboratorio desarrolle este trabajo.*

*Mariel tengo tantas cosas que agradecerte que no terminaría de escribir pues fuiste mi sensei, te agradezco por permitirme formar parte de su vida, por el tiempo que has brindado hacia mi persona en todos los aspectos, por darme una pausa en tu vida y compartir tu conocimiento, tus enseñanzas, a y sobre todo por ayudarme con todos esos experimentos, que si no mal recuerdo después de las 3 p.m. ya no habían condiciones de trabajo, que buen equipo hacíamos y que divertido era el trabajo con tu compañía, gracias por hacer del trabajo un gran momento diversión y felicidad.*

A Omar por todo el apoyo brindado, por sus miles de enseñanzas, por sus pláticas que siempre me dejaban pensando pues me daba una visión de la vida que nunca hubiera imaginado, por ser la única persona que encontraba los reactivos, porque según yo tiene pacto con ellos y por enseñarme a ser paciente y analizar todo antes de actuar atrabancadamente como suelo ser yo.

Lalo, bueno que puedo decir, agradezco que hayas compartido tus valiosos conocimientos, que fueron y son de gran importancia para mí, pues a pesar de muchas cosas que digo eres una de las personas a las que admiro a nivel profesional; gracias por permitirme conocerte y ser parte de tu vida y que estés presente en la mía.

Ale, bueno tu más que nadie sabe lo que significo haberte conocido y haber compartido el tiempo en el lab, gracias por haber forjado conmigo esta gran amistad, por compartir bueno y malos momentos a mi lado y por ser mi gran apoyo en tantos y tantos momentos, tqm amiga.

A los compañeros de lab Susana, que fue mi roomie por 2 años, a Sara por sus grandes aventuras tan chistosas, a Mario que además fue mi compañerito de clases y de fiestas, a Tania que aunque fue poco el tiempo que la conocí sé que es una gran persona, a Adver que siempre buscaba el momento para la diversión, a Ramses por su manera tan sutil de tratar a las personas y a Lys por las pocas pero muy buenas pláticas, porque gracias a ellos pude mantener mi sonrisa en estos 2 años.

A lo largo del tiempo he aprendido a agradecer a diario a estas personas que han estado en mi vida por largo, largo tiempo.

Mi mamá que las personas que me conocen saben que es un pilar fundamental en mi vida, es el ángel más maravilloso que el cielo mando para cuidarme y educarme. Ella es cómplice de mis

*aventuras, es fortaleza en mi camino y es la felicidad en mi vida. Gracias mamá por recorrer conmigo y ser la parte más optimista de mi vida, por siempre confiar en mí y nunca dudar de mis capacidades, por ser la mamá orgullosa que me presume con la gente que la rodea y la persona más importante en mi vida, gracias por compartir conmigo este nuevo logro en mi vida, te amo.*

*Mi papá que es la fortaleza que me ha ayudado a ser quien soy, la persona que me ha dado la convicción para llevar a cabo todos los sueños que tengo en mente y volverlos mi realidad. Gracias por estar a mi lado en esos momentos especiales que son los que forman este camino en mi vida y los cuales son los que forjan la plenitud de mi felicidad, te amo.*

*Mi abuela que es la abue más divertida que conozco, sé que he tenido desacuerdos con ella pero eso no significa que todo el amor que siento por ella cambiará, gracias por apoyarme en todas mis locuras y ser parte de ellas, te adoro abue.*

*Mi primo Carlos que más que eso es mi hermano, gracias por el apoyo que brindas y por todos los momentos de felicidad que hemos vivido, espero que esta nueva etapa de tu vida sea maravillosa.*

*Mi primo Julio que es una de mis lecciones de vida, pues no conozco persona más noble y sensible que tu, gracias por ser la persona que me reconoce más de lo que soy y por ser la persona que me hace decir: “Lo importante de ser conocido es que valga la pena conocerte”.*

*A mi familia, a mis tíos Gustavo, José, Martha, Juan, Tere y Yadira a mis primos Fátima, Servado, Tania, Amairaní, Gustavo, Pablo, Cristian y Brenda, gracias por ser mi familia y ser parte de mi vida.*

Mela gracias porque te puedo escribir: "Mi mejor amiga sabe lo que pienso, lo que quiero y lo que siento; es honesta y leal; me dice la realidad, jamás miente por hacerme sentir bien"; gracias por esta vida de amistad y por permitirme compartir a lado de Majo, las quiero.

Palomation Plus mi gemela de la vida, la niña que le da esa parte de humanidad a mi vida y que no permite que me pierda de la realidad y me enseña día a día a seguirme divirtiéndome cada instante de la vida, gracias por dejarme compartir tantos momentos a tu lado y a lado de tu hermosa familia, a tu ma, hermanos, tíos y primos. Gracias por ser parte del mejor trío perfecto de amistad, te adoro nenita.

Qbo, woow que cambio, siempre he dicho que es una bendición para tu vida habernos conocido. Pero tengo que agradecer infinitamente que me hayas permitido seguir compartiendo esta vida contigo y que me hayas permitido entrar en tu casa y conocer a tu hermosa familia. Somos el trío perfecto, espero que sigamos compartiendo grandes aventuras de diversión, tqM.

Vel, nenita hermosa, poco tiempo en realidad pero un sueño esta amistad, gracias por estar siempre conmigo, por ser de las personas con las que puedo contar incondicionalmente, por ser la niña que me hace sentir que mis esfuerzos en la amistad no son en vano pues tu siempre me das un poco más de cariño y apoyo, gracias por estar en mi vida y dejarme compartir la tuya, te adoro.

Mine, te digo ahora, me da gusto que me digas que no te alcanza, un triunfo más que compartimos amiga, un momento más que queda plasmado en nuestra historia de amistad, sigamos caminando juntas por la vida, tqm.

Amigato mi mejor amigo, la persona que me ha enseñado que la distancia no hace perder las amistades que se han sabido

*cultivar día a día aún cuando la persona física no está, siempre estás en mis pensamientos, te adoro amigo.*

*Sol, la niña preciosa que me ha enseñado a valorar el tiempo de la amistad, la persona que hace que no exista más que nuestra, gracias por valorar tanto nuestra amistad, tqm.*

*Dona, preciosa que te puedo escribir gracias por ser la alegría de mi vida, por enseñarme que la vida aún con los obstáculos más grandes siempre tiene calma y diversión, la niña de la sonrisa eterna, tqm.*

*Mi vaquero preferido, gracias por esta larga amistad y por este cariño maravilloso que a través de los años ha perdurado, tqm.*

*A la vida agradeciendo que me haya permitido vivir un momento más de felicidad a lado de las personas que son parte esencial en mi vida y que gracias a ellos he podido llegar a ser la persona que soy, porque cada una de ellas forma parte de mi corazón.*

*“Por muy lejos que el espíritu vaya, nunca irá más lejos que el corazón”*

*Confucio*

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Estrés oxidante. Causas y consecuencias.	5
1.2 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Su papel en el estrés oxidante.	5
1.3 El estrés oxidante en la obesidad y diabetes tipo 2.	7
1.4 Antioxidantes.	8
1.4.1 Enzimas antioxidantes.	9
1.4.2 Antioxidantes naturales.	10
1.4.3 Los polifenoles como antioxidantes.	11
1.5 El Nopal ( <i>Opuntia ficus indica</i> ).	12
1.5.1 Composición química del nopal.	12
<b>2. ANTECEDENTES</b>	
2.1 El nopal, un alimento con propiedades benéficas para la salud.	15
2.2 Propiedades antioxidantes del nopal.	16
<b>3. OBJETIVOS</b>	
3.1 Objetivo general.	17
3.2 Objetivos específicos.	17
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>17</b>
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>18</b>
5.1 Obtención y tratamiento del nopal.	19
5.2 Extracción de polifenoles totales.	19
5.2.1 Cuantificación de polifenoles.	20
5.3 Actividad antioxidante <i>in vitro</i> .	
5.3.1 Radicales libres (DPPH).	20
5.3.2 Atrapamiento del radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ).	21
5.3.3 Atrapamiento del anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ).	23
5.3.4 Atrapamiento del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).	24
5.3.5 Atrapamiento del anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ).	26
5.3.6 Atrapamiento del ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ).	27
5.3.7 Comparación de la actividad antioxidante de diferentes alimentos mediante el método ORAC.	27
5.4 Determinación <i>in vivo</i> de la actividad antioxidante del nopal.	28
5.4.1 Determinación de la expresión y actividad de enzimas antioxidantes.	28
5.4.1.1 Extracción del ARN.	30
5.4.2 Reacción de transcripción reversa para la generación de ADNc a partir de ARN.	31

<b>5.4.3 PCR en tiempo real.</b>	<b>31</b>
<b>5.5 Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes.</b>	<b>32</b>
5.5.1 Obtención de homogenizados de tejido hepático.	32
5.5.2 Determinación de la actividad de la enzima catalasa.	33
5.5.3 Determinación de la actividad de la enzima glutatión reductasa.	33
5.5.4 Determinación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa.	35
5.5.5 Determinación de la actividad de la enzimas superóxido dismutasa total.	36
<b>5.6 Determinación de marcadores de estrés oxidante en hígado de ratas Zucker (fa/fa).</b>	
5.6.1 Determinación de especies reactivas de oxígeno en tejido.	38
5.6.2 Determinación de lipoperoxidación mediante malondialdehído.	38
<b>5.7 Determinación de la actividad antioxidante del nopal en humanos sanos y pacientes diabéticos.</b>	<b>40</b>
5.7.1 Método de DPPH para determinación de actividad antioxidante en sangre.	43
<b>5.8 Análisis estadístico</b>	<b>43</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	
<b>6.1 Estudios <i>in vitro</i>. Actividad antioxidante del extracto de nopal.</b>	<b>44</b>
6.1.1 Atrapamiento de especies reactivas: OH <sup>•</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ONOO <sup>-</sup> , O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> y HOCl.	46
6.1.2 Comparación de la actividad antioxidante del nopal y diferentes alimentos.	49
<b>6.2 Estudios <i>in vivo</i>.</b>	
6.2.1 Determinación de la expresión génica, actividad de enzimas antioxidantes y marcadores de estrés oxidante en hígado de ratas Zucker (fa/fa).	51
6.2.2 Determinación de marcadores de estrés oxidante en hígado de ratas Zucker (fa/fa).	54
6.2.3 Determinación de actividad antioxidante del nopal en plasma, eritrocitos y sangre de sujetos sanos y pacientes con DT2.	56
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>59</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>66</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>10.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>68</b>

## ABREVIATURAS

<b>AAPH</b>	Dihidrocloreuro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina)
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>AGE</b>	Productos finales de glucosilación
<b>ARE</b>	Elementos de respuesta antioxidante
<b>ARN</b>	Ácido de ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido de ribonucleico mensajero
<b>AUC</b>	Área bajo la curva
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>DAP</b>	Desayuno alto en proteína
<b>DCF-DA</b>	2'7'-diclorofluoresceína diacetato
<b>DCD-FDA</b>	Diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína
<b>DMTU</b>	Dimetiltiourea
<b>DT2</b>	Diabetes tipo 2
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
<b>DTPA</b>	Ácido dietilentriaminopentaacético
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EO</b>	Estrés oxidante
<b>ER</b>	Especies reactivas
<b>ERN</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>ERO</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>HBSS</b>	Solución de sales balanceadas Hank's
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HOCl</b>	Ácido hipocloroso
<b>IC<sub>50</sub></b>	Cantidad necesaria para tener el 50% de la actividad antioxidante
<b>IL</b>	Interleucinas

<b>MAC</b>	Metabolismo ácido crasuláceo
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>NADPH</b>	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
<b>NBT</b>	Azul de nitrotetrazolio
<b>NDGA</b>	Ácido nordihidroguaiarético
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear kapa
<b>NO<sup>•</sup></b>	Óxido nítrico
<b>ORAC</b>	Capacidad de absorbanca de los radicales de oxígeno
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Anión superóxido
<b>•OH</b>	Radical hidroxilo
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Anión peroxinitrito
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>p38 MAPK</b>	Proteína cinasa p38 activada por mitógenos
<b>ROO<sup>•</sup></b>	Radical peroxilo
<b>SOD</b>	Super óxido dismutasa
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>U</b>	Actividad enzimática
<b>XO</b>	Xantina oxidasa

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN.** El nopal (*Opuntia ficus indica*) es un alimento en el que se ha identificado la presencia de compuestos bioactivos benéficos para la salud con las siguientes propiedades: hipoglucémico, hipolipidémico, antiviral, analgésico, antiinflamatoria y antioxidante. Es esta última propiedad de importancia terapéutica en enfermedades cuya progresión está asociada a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN). El aumento de estas especies reactivas (ER) genera estrés oxidante (EO), lo que provoca daño celular generalizado. Ejemplo de estas enfermedades son la obesidad y la diabetes tipo 2 (DT2). **JUSTIFICACIÓN.** Existen reportes respecto a las diferentes propiedades terapéuticas del nopal. Sin embargo no se han llevado a cabo estudios *in vitro* e *in vivo* acerca de la actividad antioxidante del nopal. **HIPÓTESIS.** El nopal tiene compuestos que le confieren actividad antioxidante, por lo que atraparán diversas especies reactivas *in vitro*, así como también inducirá la expresión de enzimas antioxidantes en el hígado de ratas Zucker (*fa/fa*) y la disminución de marcadores de EO en estos estudios *in vivo*. Además, aumentará la capacidad antioxidante del plasma y los eritrocitos de sujetos sanos y con DT2. **METODOLOGÍA.** Se determinó la actividad antioxidante *in vitro* del extracto de nopal. Se evaluó el efecto *in vivo* del nopal como antioxidante hígado de ratas Zucker (*fa/fa*), en sujetos sanos y en pacientes con DT2. La capacidad atrapadora de las ER en el extracto del nopal se evaluó mediante el método DPPH, métodos espectrofotométricos y fluorométricos. Se determinó de la expresión de las enzimas antioxidantes por técnicas de biología molecular y métodos bioquímicos para la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes y los marcadores de estrés oxidante. La determinación de la actividad antioxidante *in vivo* en plasma y eritrocitos de seres humanos se realizó mediante un método espectrofotométrico con DPPH. **RESULTADOS.** En el estudio *in vitro* el extracto de nopal presentó actividad antioxidante determinado por método DPPH ( $IC_{50}$  0.33  $\pm$  0.02 mg/mL), así como actividad atrapadora específica de las ER: radical hidroxilo ( $\cdot$ OH,  $IC_{50}$  4.2  $\pm$  0.89 mg/mL), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ,  $IC_{50}$  7.01  $\pm$  1.1 mg/mL), anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ,  $IC_{50}$  817.6  $\pm$  60.13  $\mu$ g/mL), anión superóxido

( $O_2^{\bullet-}$ ,  $IC_{50}$   $37.45 \pm 0.75 \mu\text{g/mL}$ ) y ácido hipocloroso (HOCl,  $IC_{50}$   $0.184 \pm 0.09$  mg/mL), lo que sugiere que el nopal es atrapador eficiente de las especies  $H_2O_2$ , HOCl y  $O_2^{\bullet-}$  debido a la similitud del  $IC_{50}$  con los compuestos atrapadores específicos de cada una de estas especies. Estudios *in vivo*: El nopal en el hígado de ratas Zucker (*fa/fa*) presenta efecto antioxidante directo, al disminuir los niveles de lipoperoxidación y la cantidad de ERO. Sin embargo, no presentó un efecto como antioxidante indirecto, debido a que no indujo la actividad de enzimas antioxidantes estudiadas en el hígado. Además se demostró que el consumo de nopal en humanos, aumentó significativamente la capacidad antioxidante en el plasma y eritrocitos. **CONCLUSIÓN.** El nopal es un antioxidante directo, ya que presenta la capacidad de atrapar ER, efecto que puede estar relacionado con la disminución de EO en estudios *in vivo*, al disminuir los marcadores de estrés en ratas Zucker (*fa/fa*) y un aumento en la capacidad antioxidante en el plasma de sujetos sanos y con DT2.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Estrés oxidante. Causas y consecuencias.**

El estrés oxidante (EO) se define como el desequilibrio entre factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas (Parcker y Cadenas, 2002). El EO puede ser provocado por la disminución en la transcripción o actividad del sistema enzimático celular, en el que participan enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) o antioxidantes no enzimáticos como el glutatión reducido (GSH) y la vitamina E. En el EO también está involucrado el incremento en la producción de especies reactivas (ER). La producción excesiva de las ER proviene de diferentes fuentes, como la exposición a grandes cantidades de O<sub>2</sub>, la activación de sistemas de defensa “natural” que involucre la producción de ER o activación de procesos inflamatorios (Parcker y Cadenas, 2007).

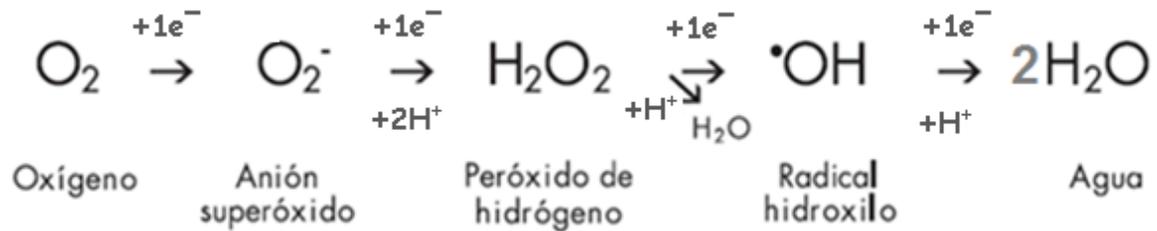
### **1.2 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Su papel en el estrés oxidante.**

Las ER desempeñan un papel dual en los sistemas celulares, ya que se generan de manera constante en el metabolismo celular (Stańczyk *et al.*, 2005) pero una producción excesiva de especies reactivas está implicada en el daño oxidante a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, esto se conoce como mecanismo general de daño celular (Venereo, 2002).

Las especies reactivas son aquellas moléculas que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en el orbital externo. Esta estructura genera gran inestabilidad, por lo que tienen una vida media corta. Debido a esta característica reaccionan con cualquier otra molécula que esté a su alcance, generando así moléculas que son altamente tóxicas para el funcionamiento adecuado de la célula (Venereo, 2002).

Ejemplos de las especies reactivas de mayor importancia son las que se generan por elementos que se encuentran normalmente en la atmósfera, como son el

oxígeno y el nitrógeno. Dichas especies a bajas concentraciones tienen un papel regulatorio en diversos procesos fisiológicos, mientras que a altas concentraciones pueden ser tóxicas, debido a que aumenta la formación de ERO y ERN (Hansberg, 2002). Las ERO se generan a partir de la reducción univalente del oxígeno (Fig. 1), las cuales son más reactivas que el oxígeno en su estado basal de energía.



**Figura 1. Reducción univalente del oxígeno. Mecanismo de formación de las especies reactivas de oxígeno a través de la ganancia de electrones (Galatro *et al.*, 2006).**

Se consideran también como ERO al ozono ( $\text{O}_3$ ) que se genera de la unión del  $\text{O}$  al  $\text{O}_2$ ; además el oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) que se produce con la excitación de uno de los electrones desapareados del  $\text{O}_2$ , y las más comunes ERO son el superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) que son especies del oxígeno parcialmente reducidas (Hansberg, 2002).

Otras especies que han cobrado gran importancia en la célula son las ERN, las cuales son generadas a partir de compuestos que contienen en su estructura química nitrógeno. Uno de los compuestos que se genera es el monóxido de nitrógeno u óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), el cual es altamente reactivo y dañino para la célula y para los procesos fisiológicos. El  $\text{NO}^\bullet$  es soluble en disolventes orgánicos y por lo tanto en las membranas celulares, por lo que difunde fácilmente a través de las células. En los organismos se forma a través de la enzima sintasa de óxido nítrico (NOS, por sus siglas en inglés) a partir del grupo guanidino de la L-arginina. Cuando el  $\text{NO}^\bullet$  reacciona con el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  se genera el anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), el

cual es el principal responsable de la nitración de las biomoléculas (Hansberg, 2002). En esta tesis nos vamos a referir a las ERO y ERN en su conjunto con el término especies reactivas (ER).

### **1.3 El estrés oxidante en la obesidad y diabetes tipo 2.**

Las ER generan EO, esto produce alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado. Estas modificaciones son causa de diversas patologías y/o complicaciones de las mismas (Olinescu y Smith, 2002), y ejemplos de las cuales son la obesidad (Furukawa *et al.*, 2004) y la DT2 (Evans *et al.*, 2002).

La obesidad es una patología en la que la ingesta calórica es mayor que el gasto energético, por lo que existe una acumulación de lípidos generalizada. Un modelo de obesidad muy utilizado son las ratas Zucker (*fa/fa*), las cuales son un modelo genético de obesidad e hipertensión. Este modelo presenta una mutación en el gen que codifica para el receptor de la leptina, dando lugar a ratas homocigotas para la mutación. La leptina es una hormona que tiene efecto sobre el peso corporal. La actividad de esta hormona es mediada a través de los centros hipotalámicos que controlan el hambre, la temperatura corporal y el gasto energético. La deficiencia en este receptor induce ausencia de saciedad, provocando un exceso en la ingesta de alimento y por tanto obesidad (Muñoz *et al.*, 2004). Las ratas obesas Zucker (*fa/fa*) presentan altos niveles de lípidos y colesterol en la sangre, lo que genera un estado pro-inflamatorio (Rosen y Spiegelman, 2006), en el que se eleva la cantidad de compuestos pro-inflamatorios como el factor de necrosis tumoral- alfa (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés), las interleucinas (IL), el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B, por sus siglas en inglés) y la proteína cinasa p38 activada por mitógenos (p38 MAPK, por sus siglas en inglés) (Evans *et al.*, 2003). Estas moléculas presentes en el tejido adiposo generan cambios en el metabolismo general del organismo, entre los cuales se encuentra el aumento en la producción de ER, en los triglicéridos en plasma (hipertrigliceridemia) (Rosen y Spiegelman, 2006), que junto con el aumento de

producción de las ER provocan la oxidación de lípidos, así como también resistencia a la insulina (Evans *et al.*, 2003), lo que induce el desarrollo de DT2.

La DT2 (llamada anteriormente diabetes no insulino dependiente o del adulto) tiene su origen en la incapacidad del cuerpo para utilizar eficazmente la insulina, lo que a menudo es consecuencia del exceso de peso o la inactividad física (definición según la Organización Mundial de la Salud). En esta patología la principal manifestación es la hiperglucemia (aumento de la glucosa en sangre), la cual está implicada en la aparición de las complicaciones asociadas con la enfermedad (O'Keefe *et al.*, 2008). Estas complicaciones consisten en un grupo heterogéneo de disfunciones clínicas que afectan el sistema nervioso, el sistema vascular, el riñón, la retina, el nervio periférico y la piel (Clapés *et al.*, 2001; Obrosova *et al.*, 1998; Vassort y Turan, 2010).

Se ha reportado que altos valores de glucemia conducen a EO (Rains y Jain, 2011). Existen diversas vías por las cuales este desequilibrio en el metabolismo genera ER. Una de ellas es la autooxidación de la glucosa que da lugar a la formación de  $\alpha$ -cetoaldehídos,  $H_2O_2$  y  $O_2^{\bullet-}$ , entre otras ERO. También se conoce que el descontrol en la glucemia aumenta el proceso de glucosilación, en el cual se generan moléculas que se conocen como productos finales de la glucosilación avanzada (AGE, por sus siglas en inglés). Estas sustancias que se forman de modo irreversible son capaces de unirse mediante enlaces covalentes con otras proteínas para potenciar así la oxidación de lípidos y proteínas de membrana, lo que provoca cambios conformacionales de estas macromoléculas y por lo tanto el deterioro de sus funciones (Clapés *et al.*, 2001).

#### **1.4 Antioxidantes.**

Un antioxidante es una sustancia que retrasa, previene, disminuye o remueve significativamente la oxidación de moléculas blanco de las ER (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Los antioxidantes se clasifican en antioxidantes directos, indirectos o bifuncionales dependiendo de su mecanismo de acción, estos últimos poseen ambas

características. Los antioxidantes directos actúan sobre las ER, y los antioxidantes indirectos actúan sobre vías de señalización que activan mecanismos de defensa antioxidante (Dinkova y Talalay, 2008).

#### 1.4.1 Enzimas antioxidantes.

El mecanismo antioxidante presente en los sistemas biológicos involucra a enzimas que intervienen en la disminución y metabolismo de las ER. Estas enzimas son muy importantes para mantener el equilibrio redox y el funcionamiento adecuado de las células. Entre estas enzimas se encuentran la GR, la GPx, la SOD, la CAT, la glutatión sintetasa y la hemo oxigenasa (HO) (Tabla 1).

**Tabla 1. Enzimas antioxidantes presentes en los sistemas biológicos y su función específica para mantener el equilibrio en las células (Halliwell y Gutteridge, 2007)**

<b>Enzima</b>	<b>Función</b>	<b>Localización</b>
<b>Glutatión reductasa (GR)</b>	Cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH).	Citoplasmática
<b>Glutatión peroxidasa (GPx)</b>	Cataliza la reducción de peróxidos, utilizando GSH que se transforma en GSSG.	Citoplasmática
<b>Glutatión sintetasa</b>	Forma GSH, a partir del dipéptido gama-glutamilcisteína y glicina.	Citoplasmática
<b>Superóxido dismutasa (SOD)</b>	Cataliza la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno.	Citoplasmática (SOD1) Mitocondrial (SOD2)
<b>Hemo oxigenasa (HO)</b>	Degrada el grupo hemo, que es un compuesto prooxidante (requiere oxígeno molecular y NADPH).	Citoplasmática. Retículo endoplasmático
<b>Catalasa (CAT)</b>	Cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua.	Citoplasmática. Peroxisomas

Una de las principales vías de regulación en la expresión de genes de enzimas antioxidantes, es a través de una secuencia específica en el ácido desoxirribonucleico (ADN) conocida como elementos de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés). Esta secuencia de ADN es importante para inducción de genes citoprotectores. Esta región promotora se puede activar por diversos compuestos antioxidantes y/o electrófilos de naturaleza química diversa. Algunos antioxidantes de origen natural como la quercetina (Yao *et al.*, 2007; Miyamoto *et al.*, 2011) y resveratrol (Zhang y Go, 2011) inducen la expresión y actividad de estas enzimas antioxidantes. Se ha demostrado que la inducción de estas enzimas mediante antioxidantes naturales contribuye a la protección contra diversas patologías como el cáncer, la hepatotoxicidad y los procesos inflamatorios (Königsberg, 2007).

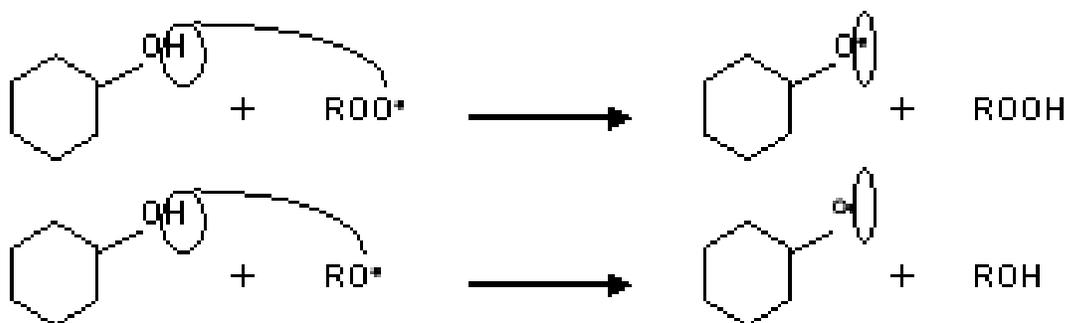
Por lo anterior, se ha ampliado la búsqueda de estrategias para mantener el equilibrio redox o disminuir y/o prevenir el daño oxidante que causan las ER. Como alternativas se encuentran moléculas exógenas que ayudan a la activación de estos mecanismos de protección celular.

#### **1.4.2 Antioxidantes naturales.**

Otra manera de clasificar a los antioxidantes es dependiendo de su origen, ejemplo de esto son los antioxidantes naturales. Los antioxidantes naturales pueden estar presentes en alimentos que forman parte de la dieta diaria del ser humano. Dentro de estos alimentos se encuentran frutas y vegetales, en los cuales se ha descrito la presencia de compuestos con actividad antioxidante (Jacobo y Cisneros, 2009; Kumar y Devasagayam, 2010; Borek, 2001; Shivashankara *et al.*, 2011). Se ha descrito que los compuestos que confieren actividad antioxidante a los alimentos son los polifenoles, los carotenoides, las vitaminas y los flavonoides (Gil *et al.*, 2002; Jacobo y Cisneros, 2009).

### 1.4.3 Los polifenoles como antioxidantes.

Los compuestos polifenólicos son micronutrientes presentes en los vegetales, por lo que forman parte importante en la dieta humana. Constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad. Los compuestos polifenólicos tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo  $-OH$  (Bravo, 1998). Su estructura química es propicia para reaccionar con los radicales libres, debido a la facilidad con la que puede donar el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo aromático (Fig. 2) (Pannala *et al.*, 2001).



**Figura 2. Estructura química de los polifenoles. La capacidad de donar H le confiere la actividad atrapadora de especies reactivas y su estructura se estabiliza por resonancia.**

Uno de los factores más importantes que determina la actividad antioxidante de los polifenoles es la posición de los grupos hidroxilos en la molécula (Rice *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 1997).

La importancia en el consumo de frutas y vegetales está asociada a la presencia de polifenoles debido a su efecto antioxidante. Como se mencionó anteriormente, uno de los alimentos en los que se ha descrito la presencia de compuestos

polifenólicos es el nopal (Stintzing y Carle, 2005) que es un alimento de gran valor y tradición para los mexicanos (Mayer y Mc Laughlin 1981).

### **1.5 El Nopal (*Opuntia ficus indica*).**

El nopal es una especie que pertenece al género *Opuntia* subfamilia *Opuntioideae*, familia Cactácea. *Opuntia spp* (nopal) es una cactácea endémica del continente americano, la cual crece en regiones áridas y semiáridas de nuestro país. Por ello esta especie posee adaptaciones que le permiten almacenar y conservar el agua en sus tejidos. Esto se debe a que *Opuntia ficus-indica* presenta metabolismo del ácido crasuláceo (MAC). MAC es el proceso fotosintético, en el cual los estomas están cerrados durante el día y abiertos durante la noche, evitando la pérdida de agua por transpiración, lo que le permite soportar las condiciones extremas en las que se desarrolla.

#### **1.5.1 Composición química del nopal.**

La composición del nopal es difícil de exponer, debido a que las cantidades de los diferentes compuestos en el nopal pueden variar en un rango que no es significativamente amplio. Sin embargo, existen diferencias de especie a especie, así como en la etapa de desarrollo (madurez) en el que se encuentre el nopal (Stintzing y Carle, 2005), y también en los procesos a los que se somete antes de llevar a cabo el análisis proximal de sus componentes. Una de las determinaciones de la composición del nopal se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2. Composición química del nopal *Opuntia ficus indica* (adaptado de Ayadi *et al.*, 2009).**

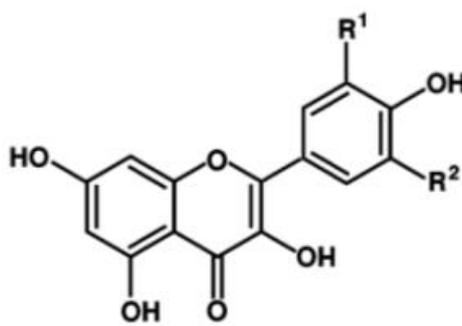
Composición química del Nopal	
Componente	Cantidad en g presentes en 100 g de nopal
H <sub>2</sub> O	91.04
Proteína	0.8
Lípidos	0.42
<b>Carbohidratos digeribles</b>	
Almidón	1.17
Azúcares	0.54
Fibra	3.17
Minerales	2.09

Entre los minerales que se encuentran presentes en la composición del nopal están, el potasio (K) que representa hasta el 60% del total de los minerales ya que contiene 166, seguido por el calcio (Ca) con 93, el sodio (Na) con 2 y el hierro (Fe) con 1.6 (cantidades reportadas en mg/100 g de nopal fresco). El contenido de azúcares es muy variable, ya que su contenido puede variar desde 0.32 hasta 0.84 (cantidad reportada en g/100 g de nopal fresco), el rango en las variaciones se dan por el estado de madurez del nopal, así como también de la especie analizada. Los ácidos orgánicos son variables dependiendo del tipo de especie, ya que en *Opuntia ficus indica* no se ha reportado la presencia de ácido málico y en otras especies se encuentra en una mayor proporción, así como también en esta especie hay un menor contenido de ácido cítrico (Stintzing y Carle, 2005). La cantidad de los aminoácidos también es muy variable, y uno de los principales factores que modifican las cantidades de aminoácidos presentes en el nopal es la madurez en la que se encuentra el nopal (Stintzing y Carle, 2005). Las cantidades de vitaminas presentes en *Opuntia spp* se muestran en la tabla 3 (cantidades que varían de especie a especie).

Tabla 3. Contenido de vitaminas en *Opuntia spp* (Stintzing y Carle, 2005).

Componente	Por 100 g de Nopal
Ácido ascórbico	7-22 mg
Niacina	0.46
Rivoflavina	0.60 mg
Tiamina	0.14 mg
β- caroteno	11.3-53.4 μg

Uno de los componentes del nopal son los polifenoles. El contenido de polifenoles en nopal es de 8 a 9 mg/ 100 g de nopal. La estructura química de los compuestos polifenólicos que se encuentran en el nopal se muestra en la figura 3.



Quercetina (R<sup>1</sup> = OH; R<sup>2</sup> = H)

Kaempferol (R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H)

Isoramnetina (R<sup>1</sup> = OCH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup> = H)

Figura 3. Estructura química de los compuestos polifenólicos encontrados en el nopal quercetina, kaempferol e isoramnetina (Tomado de Kuti, 2009).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 El nopal, un alimento con propiedades benéficas para la salud.

En la actualidad se conocen numerosos alimentos que tienen propiedades benéficas para la salud de los seres humanos. Uno de estos alimentos es el nopal ya que por su composición química otorga múltiples beneficios. Este vegetal es una fuente importante de fibra y de calcio, los cuales son componentes necesarios para integrar una dieta saludable (Sáenz *et al.*, 2004). Dentro de los beneficios del nopal se encuentran los siguientes:

**Actividad hipoglucémica:** Estudios realizados en los años 80's demostraron que los pacientes con DT2 tras una dieta de 10 días que incluía nopal, mantenían los niveles de glucosa e insulina dentro de los niveles normales, debido a una reducción en la absorción azúcar postprandial (Muñoz de Chávez *et al.*, 1995; Meckes y Roman, 1986). Esto es una contribución a la medicina como estrategia para disminuir las complicaciones presentes en la DT2, sin embargo han tenido poca divulgación estos de estudios.

**Actividad hipolipidémica:** En diversos estudios se ha demostrado que las pectinas aisladas del nopal provocan una disminución de lípidos en sangre de cobayos (Fernández *et al.*, 1990; Fernández *et al.*, 1992,1994; Budinsky *et al.*, 2001; Wolfran *et al.*, 2002).

**Actividad analgésica:** Se encontró que una dosis de 300-600 mg/kg peso corporal de un extracto etanólico del nopal indujo un efecto analgésico similar a una dosis de 200 mg/kg de peso corporal de ácido acetilsalicílico administrado en ratones (Parck *et al.*, 1998).

**Actividad anti-inflamatoria:** Se ha informado que una dosis de 300 µL/mL de un extracto de nopal administrada vía oral a ratas provoca la disminución de enzimas del lisosoma que se relacionan con el proceso inflamatorio (Park *et al.*, 2001).

## **2.2 Propiedades antioxidantes del nopal.**

La mayoría de las investigaciones para evaluar la actividad antioxidante se han realizado en el fruto del nopal, la tuna (Dok-Go *et al.*, 2003; Tesoriere *et al.*, 2003; Gentile *et al.*, 2004; Siriwardhana *et al.*, 2006; Tesoriere *et al.*, 2004, 2005).

Aunque se sabe que el nopal contiene polifenoles, carotenoides y vitamina C, existen pocos estudios que describen su capacidad antioxidante.

En algunos estudios en los que se ha explorado la actividad antioxidante del nopal se ha descrito que este alimento ejerce una función protectora frente algunas patologías a nivel neuronal (Dok-Go *et al.*, 2003), ante daño inducido por níquel (Hfaiedh *et al.*, 2008) y el daño hepático inducido por micotoxinas (Zourgui *et al.*, 2008). Aunque se conocen los efectos benéficos del nopal se sabe poco acerca de la actividad antioxidante de este alimento; ya que no existen estudios donde se explore su actividad antioxidante en estudios *in vitro* e *in vivo*.

En este estudio se explorará la actividad antioxidante del nopal *in vitro* hacia diversas ER, e *in vivo* en un modelo de obesidad en ratas Zucker (*fa/fa*) y en sujetos sanos y con DT2.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general.

Determinar la actividad antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo* del nopal (*Opuntia ficus indica*) en diversos modelos de estudio.

#### 3.2 Objetivos específicos.

##### Estudios *in vitro*

- Determinar la actividad antioxidante del extracto de nopal mediante el método DPPH.
- Determinar la actividad atrapadora del extracto de nopal hacia distintas especies reactivas como  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{HOCl}$  y compararla con extractos de diferentes alimentos.

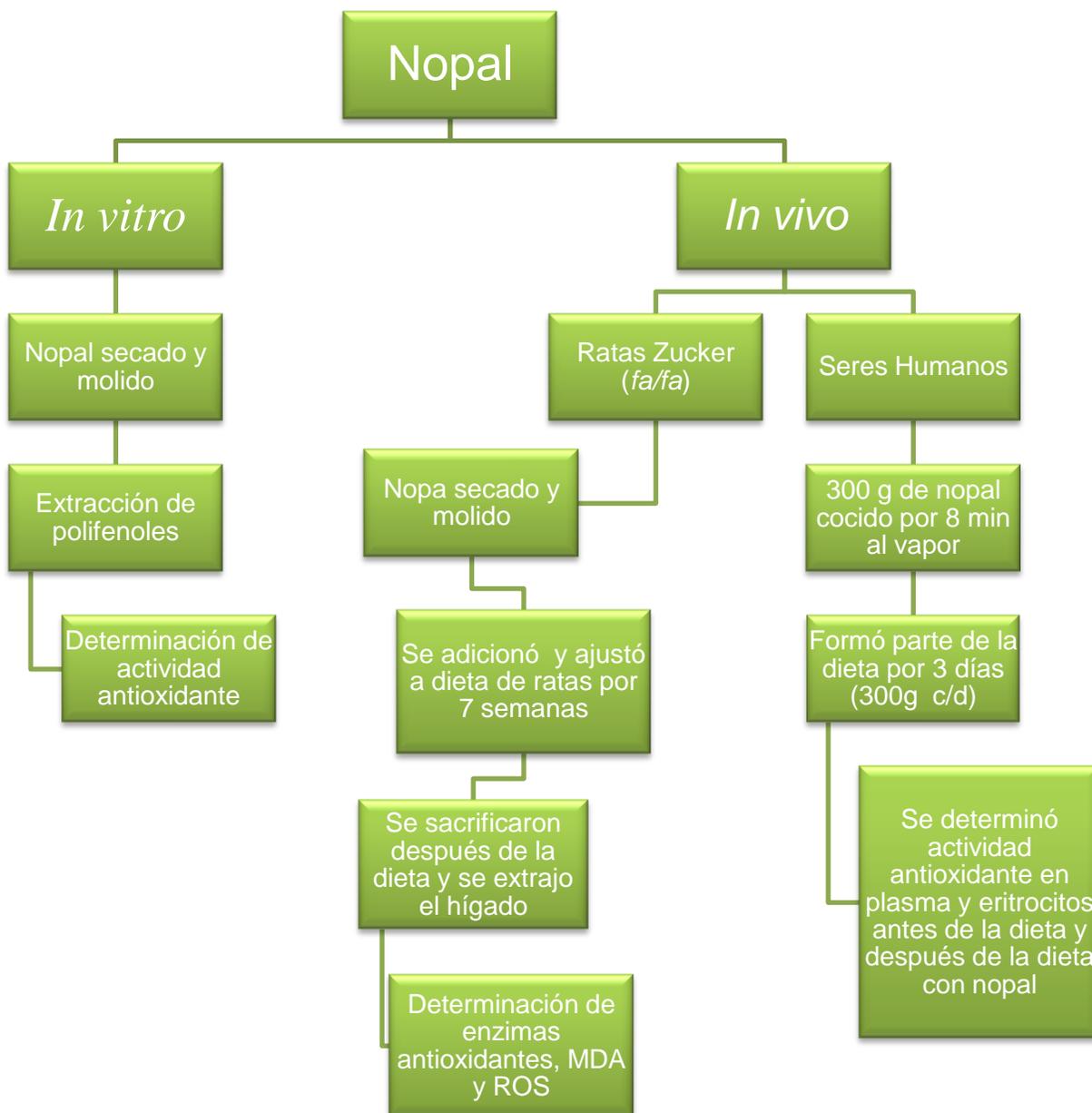
##### Estudios *in vivo*

- Determinar si el nopal induce la expresión del ARNm de las enzimas antioxidantes CAT, GR, GPx y SOD en el hígado de ratas Zucker (*fa/fa*).
- Determinar si el nopal induce la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, GR, GPx y SOD en el hígado de ratas Zucker (*fa/fa*).
- Determinar la relación entre la actividad antioxidante del nopal y la disminución de marcadores de estrés oxidante como lipoperoxidación y producción de ERO en el hígado de ratas Zucker (*fa/fa*).
- Determinar el efecto del consumo de nopal sobre la actividad antioxidante del plasma y los eritrocitos de humanos sanos y en pacientes con DT2.

### 4. HIPÓTESIS

El nopal tiene compuestos que le confieren actividad antioxidante, por lo que atraparé diversas especies reactivas *in vitro*, así como también induciré la expresión de enzimas antioxidantes en el hígado de ratas Zucker (*fa/fa*) y la disminución de marcadores de EO en estos estudios *in vivo*, además, aumentará la capacidad antioxidante del plasma y los eritrocitos de sujetos sanos y con DT2.

## 5. METODOLOGÍA



### **5.1 Obtención y tratamiento del nopal.**

Las muestras de nopal provienen de la zona de Milpa Alta en el Distrito Federal. Los agricultores facilitaron el nopal de una longitud de 17-20 cm y sin espinas. Para obtener la muestra que se utilizó en los ensayos *in vitro* y que formó parte de la dieta de las ratas Zucker (*fa/fa*), se llevó a cabo el siguiente procedimiento. El nopal se molió y se deshidrató; para ello, se lavó con una solución diluida de hipoclorito de sodio (40%) y posteriormente se secó en una estufa, donde la temperatura utilizada no fue mayor a 55°C, para evitar que el tratamiento térmico afectara la composición química del nopal. Posteriormente se pulverizó mecánicamente en licuadora. Una vez que se obtuvo el polvo se tamizó en una malla de 20 mm y la muestra se almacenó en un recipiente de vidrio cerrado, a temperatura ambiente.

### **5.2 Extracción de polifenoles totales.**

Para obtener el extracto polifenólico del nopal se realizó una extracción con metanol, acetona y agua. El procedimiento que se realizó se describió previamente (Waterman y Mole, 1994).

#### **Ensayo**

Se pesaron 10 g de nopal deshidratado y se adicionaron a 50 mL de una mezcla metanol/agua (50/50 volumen). La extracción se realizó en un vaso de precipitado con agitación magnética constante durante 1 h. Posteriormente se filtró con papel filtro. El filtrado se guardó, y al residuo se le realizó una segunda extracción durante una hora, utilizando 50 mL de acetona/agua (70/30 volumen). Se filtró nuevamente y se guardó. Se realizó una tercera extracción por 15 min con 50 mL de agua destilada. Los filtrados resultantes se juntaron y se hidrolizaron mediante un sistema de reflujo por 3 h empleando 5 mL de ácido clorhídrico concentrado. El extracto resultante se evaporó a sequedad en un concentrador de vacío modelo AS160 (Savant instrument Inc) durante 3 h, y después se resuspendió en 1 mL de agua.

### **5.2.1 Cuantificación de polifenoles.**

El método Folin-Ciocalteu se utiliza comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales; se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (Petereson, 1979). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, que son cromógenos de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ) de color azul intenso (Julkunen, 1985).

#### **Ensayo**

Para la determinación de polifenoles en la muestra de nopal se utilizó la metodología descrita por Koren y col. (2010). En un tubo eppendorf se colocaron 50  $\mu$ L de muestra y 250  $\mu$ L de Folin, se mezclaron y se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se agregaron 500  $\mu$ L de  $Na_2CO_3$  al 20% se mezcló nuevamente y se dejó 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se determinó la absorbancia a 760 nm en espectrofómeto DU 640 Beckman Coulter. Como estándar para el ensayo se utilizó una curva estándar de ácido gálico (Sigma) cuyo rango de concentración fue entre 1-50 mg/L.

### **5.3 Actividad antioxidante *in vitro*.**

#### **5.3.1 Atrapamiento de radicales libres por el método DPPH.**

El método de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) se utiliza para evaluar la actividad antioxidante de un compuesto o de una mezcla. Se basa en la reducción del DPPH, un radical libre que por su electrón desapareado presenta absorbancia a 517 nm (púrpura) y en presencia de un antioxidante (donador de hidrógeno o electrones) la absorbancia disminuye (Fig. 4).

A partir del ensayo con DPPH se obtiene la concentración efectiva ( $IC_{50}$ ) que se define como la concentración a la cual se disminuye en un 50% la concentración inicial de DPPH.

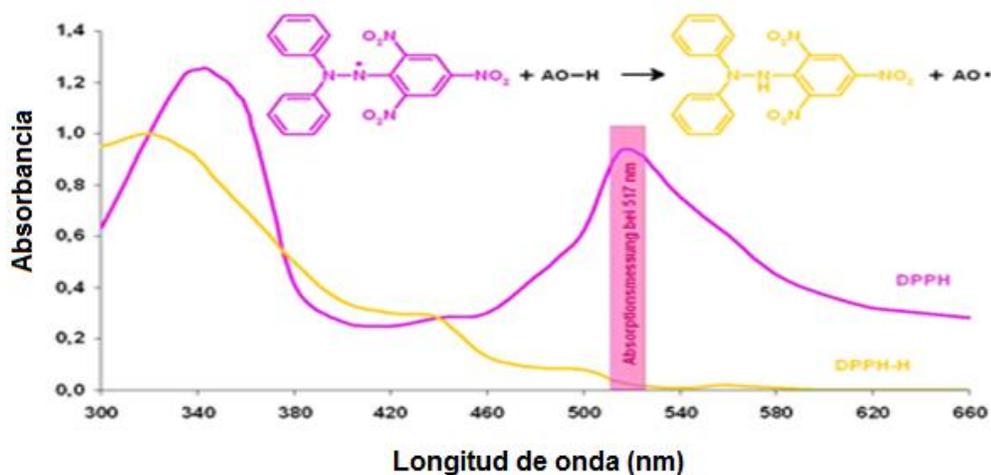


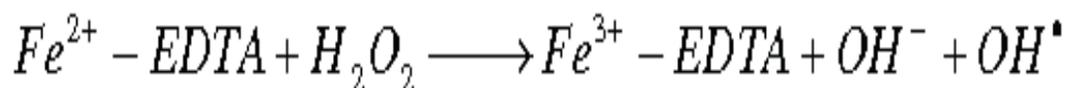
Figura 4. Reacción del DPPH con un agente atrapador (antioxidante), en el que el DPPH vira de color debido a la reacción de reducción.

### Ensayo

En un tubo de ensayo se colocaron 50  $\mu$ L de muestra y se agregaron 2.95 mL de DPPH 100  $\mu$ M. La mezcla se agitó y se dejó en oscuridad a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente se leyó la absorbancia en un espectrofómetro DU 640 Beckman Coulter a 517 nm. De manera paralela se realizó una prueba utilizando como atrapador el ácido ascórbico (vitamina C) bajo las mismas condiciones en que se realizó la mezcla de la muestra (Govindarajan *et al.*, 2003).

#### 5.3.2 Atrapamiento del radical hidroxilo ( $\cdot$ OH).

El radical hidroxilo se genera mediante la reacción de Fenton (Fig. 5).



**Figura 5. Reacción de Fenton en la que se genera el radical hidroxilo. En esta reacción se utiliza como catalizador al hierro (II).**

Una de las estrategias para detectar especies reactivas es el uso de compuestos fluorescentes, tal es el caso del tereftalato, el cual es un compuesto específico para identificar al  $\cdot OH$ . Cuando el tereftalato interactúa con el radical hidroxilo presenta fluorescencia, la cual disminuye en presencia de un compuesto antioxidante, ya que no hay  $\cdot OH$  que reaccione con éste.

### Ensayo

Se realizó la siguiente mezcla de reacción (Tabla 4) en una placa negra de 96 pozos (marca Corning Costar). Los reactivos se colocaron en el orden en el que se presentan en la tabla 4 (Qu *et al.*, 2000). De manera paralela se realizó un ensayo utilizando el atrapador específico de esta especie dimetiltiurea (DMTU), en las mismas condiciones en que se analizó la muestra.

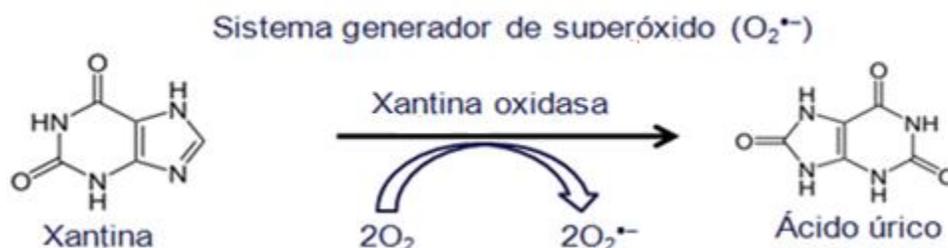
**Tabla 4. Mezcla de reacción para llevar a cabo el ensayo de determinación de la actividad atrapadora de radical hidroxilo.**

Hidroxilo-tereftalato			
	Conc. Inicial	$\mu L$	Conc. Final
Ácido ascórbico	1 mM	40	0.2 mM
Peróxido de hidrógeno	10 mM	20	1 mM
Amortiguador fosfatos pH 7.4	50 mM	40	10 mM
Muestra	-	20	-
Tereftalato	3.5 mM	40	0.7 mM
EDTA/FeCl <sub>3</sub>	1 mM/1 mM	40	0.2 mM/0.2 mM

En este método fluorométrico se hicieron lecturas cada minuto durante 30 min. Estas mediciones se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT se utilizaron las longitudes de excitación de 326 nm y de emisión de 432 nm.

### 5.3.3 Atrapamiento del anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).

El ensayo se basa en el uso del sistema xantina- xantina oxidasa (Fig. 6).



**Figura 6. Reacción del sistema xantina-xantina oxidasa, en el que se genera  $O_2^{\bullet-}$  por la reacción catalizada por la enzima xantina oxidasa (XO) que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina en ácido úrico.**

### Ensayo

Para esta metodología se preparó una mezcla de reacción, la cual se presenta en la tabla 5. Lo único que no se agregó fue la XO (Sigma), que es el reactivo que comienza la reacción (Medina-Campos *et al.*, 2007).

**Tabla 5. Mezcla general de reacción para método enzimático. Generación del anión superóxido mediante el sistema xantina- xantina oxidasa.**

Mezcla de reacción general		
	Conc. inicial	mL
Xantina	0.3 mM	3
$Na_2CO_3$	0.4 mM	0.4
Amortiguador de fosfatos pH 7.4	50 mM	4.35
<b>Volumen Total</b>		<b>7.75</b>

Se colocaron 98  $\mu\text{L}$  de esta mezcla en diferentes tubos de ensayo y posteriormente se agregaron 22  $\mu\text{L}$  el extracto de nopal y 16  $\mu\text{L}$  de XO para iniciar la reacción. (Tabla 6). Como compuesto de referencia se utilizó el ácido ascórbico (Maldonado *et al.*, 2005).

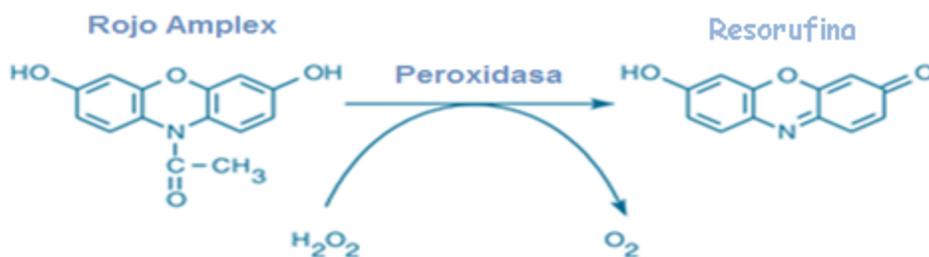
**Tabla 6. Mezcla de reacción utilizada en cada ensayo. Se utilizó ácido ascórbico como compuesto de referencia.**

Mezcla de reacción			
	Concentración	Ensayo con atrapador	Ensayo con muestra
Mezcla de reacción	-	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$
Compuesto de referencia (ácido ascórbico)	curva estándar	75 $\mu\text{L}$	-
Extracto de nopal	-	-	75 $\mu\text{L}$
Xantina oxidasa	156 U	25 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
<b>Volumen total</b>		500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$

La lectura se hizo 10 min después de haber iniciado la reacción. Se midió la absorbancia durante 3 min cada min en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT a una longitud de onda de 560 nm.

#### **5.3.4 Atrapamiento del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).**

El método se basa en la emisión de fluorescencia producida por la reacción entre la mezcla de peroxidasa de rábano, rojo amplex y peróxido de hidrógeno. El producto de esta reacción puede ser determinado fluorométricamente (Fig. 7).



**Figura 7. Reacción del rojo amplex con peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno, cuyo producto de reacción es la resorufina.**

### Ensayo

Para llevar a cabo el ensayo se preparó la siguiente mezcla de reacción (Tabla 7). En una placa negra de 96 pozos (marca Corning Costar) se colocaron 100  $\mu$ L de mezcla de reacción, 50  $\mu$ L de  $H_2O_2$  (5  $\mu$ M) y 20  $\mu$ L de muestra; se incubó 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se hizo lectura de punto final en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT, utilizando longitudes de excitación de 530 nm y de emisión de 590 nm. Como atrapador específico se utilizó al piruvato (Medina- Campos *et al.*, 2007).

**Tabla 7. Mezcla de reacción para determinar la actividad atrapadora del peróxido de hidrógeno.**

Mezcla de reacción	
	Concentración inicial
Amplex red	10 mM
Peroxidasa de rábano	10 U/mL
Amortiguador fosfatos pH 7.4	50 mM

### 5.3.5 Atrapamiento del anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ).

El fundamento de este método se basa en la determinación de la fluorescencia emitida por el diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína (DCD-FDA) el cual se desacetila en un medio básico formando 2'7'-diclorodihidrofluoresceína, el cual en presencia de ER como lo es el anión peroxinitrito, se oxida y se forma el 2',7'-diclorofluoresceína, el cual emite fluorescencia. Al estar frente a un compuesto antioxidante, que atrape al  $\text{ONOO}^-$ , la fluorescencia emitida disminuye (Crow, 1997).

#### Ensayo

Para llevar a cabo el ensayo de peroxinitrito (Saito *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 1998) se preparó la siguiente mezcla de reacción (Tabla 8). Los volúmenes especificados en la tabla se colocaron en una placa negra de 96 pozos (marca Corning Costar).

**Tabla 8. Mezcla de reacción para determinar la actividad atrapadora de peroxinitrito. DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético).**

	Concentración inicial	$\mu\text{L}$
$\text{H}_2\text{O}$	-	180
Muestra	-	20
DTPA	1 mM	6.66
$\text{ONOO}^-$	0.62 mM	6.66
DCD-FDA	3.5 mM	6.66
Volumen Total		220

Como compuesto de referencia que se utilizó fue penicilamina. Se dejó incubar 30 min a temperatura ambiente. La lectura de punto final se llevó a cabo en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT a longitudes de excitación de 595 nm y de emisión de 528 nm.

### **5.3.6 Atrapamiento del ácido hipocloroso (HOCl).**

El ácido hipocloroso es soluble en lípidos y altamente reactivo, oxida constituyentes de proteínas, incluyendo grupos tiol, grupos amino y metionina (Martinez, 2005). Debido a esta característica se ha observado que el grupo hemo de la catalasa es especialmente susceptible al HOCl. En esta característica se fundamenta esta técnica. La señal emitida por la CAT a 404 nm (el pico de absorbancia de esta enzima), en presencia de esta especie reactiva va desapareciendo (Floriano- Sánchez *et al.*, 2006).

#### **Ensayo**

En un tubo eppendorf se agregaron 166  $\mu$ L de CAT a una concentración de 37.5  $\mu$ M, 166  $\mu$ L de HOCl 18 mM y 166  $\mu$ L de muestra. Se agitó y se hizo un barrido inicial en la región de 370 a 450 nm, y se obtuvo la densidad óptica a 404 nm en un espectrofotómetro DU 640 Beckman Coulter. Como compuesto de referencia se utilizó ácido nordihidroguaiarético (NDGA) (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2006; Floriano-Sánchez *et al.*, 2006).

### **5.3.7 Comparación de la actividad antioxidante de diferentes alimentos mediante el método ORAC.**

El ensayo ORAC (capacidad de absorbancia de los radicales libres de oxígeno, por sus siglas en inglés) se basa en la capacidad de atrapamiento del radical peroxilo ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ), el cual se genera mediante la reacción entre el dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) (AAPH). El  $\text{ROO}^{\bullet}$  oxida a la fluoresceína y esta emite fluorescencia, la cual es monitoreada a través de 90 min (Cao y Prior, 1999). Durante este tiempo se registran los cambios en la intensidad de la fluorescencia, lo que permite calcular al final del ensayo el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) de la caída de la fluorescencia.

## **Ensayo**

Para realizar este ensayo primero se hizo una extracción de diferentes alimentos. Se molieron 50 mg de café, ciruela, nopal y ajo, posteriormente se llevó a cabo la extracción con acetona (50%), se centrifugó a 4500 g x 30 min a 4° C. Se recolectó el sobrenadante (Gillespie *et al.*, 2007), todo ello para obtener los polifenoles y ácido ascórbico total de diferentes alimentos.

Una vez que se obtuvo la muestra se llevó a cabo el ensayo de ORAC. Para este método se colocaron en una placa negra de 96 pozos (marca Corning Costar) 150 µL de fluoresceína 40 nM, 25 µL de muestra y 25 µL de AAPH (Dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina)) (Huang *et al.*, 2002). Se leyó la cinética durante 90 min en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT a longitudes de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm.

### **5.4 Determinación *in vivo* de la actividad antioxidante del nopal.**

Una de las propiedades más importantes de una sustancia antioxidante es, además de presentar actividad antioxidante *in vitro*, que tenga acción *in vivo* sobre sustratos oxidados que se generan de manera fisiológica o en la enfermedad.

Los siguientes ensayos se realizaron en colaboración con el Departamento de Fisiología de la Nutrición del INNSZ (Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán).

#### **5.4.1 Determinación de la expresión y actividad de enzimas antioxidantes.**

El nopal analizado en los ensayos *in vitro* mencionados anteriormente, también se utilizó en un experimento realizado en el INNSZ por la M. en C. Sofía Morán Ramos en el cual se utilizó como modelo de obesidad a las ratas Zucker (*fa/fa*), este modelo se utilizó debido a que la obesidad se ha relacionado ampliamente al aumento de EO y la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes (Furukawa *et al.*, 2004). Para ello realizó un protocolo en el cual utilizaron ratas Zucker (*fa/fa*), las cuales fueron divididas en 3 grupos (n=18, 6 en cada grupo), un grupo control fue alimentado con una dieta control (AIN93), el grupo nopal 3% y el grupo nopal 4%, estos últimos grupos fueron alimentados con dietas ajustadas a la

control en la que se sustituye la fibra (celulosa) por 3% y 4% de fibra proveniente del nopal (tabla 9), todos los grupos fueron alimentados durante 7 semanas. Una vez que concluyó el experimento, las ratas fueron anestesiadas con el uso de CO<sub>2</sub> y después sacrificadas por decapitación, posteriormente se obtuvieron muestras de hígado de animales con ayuno de 8 h y animales con 2 h de post-prandio, esto con la intención de conocer el efecto del alimento en el metabolismo de las ratas. El hígado se extrajo rápidamente y se mantuvo almacenado a -70° C hasta que se utilizó en los diversos ensayos. Una vez que se obtuvo el tejido las determinaciones de la actividad de las enzimas antioxidantes, marcadores de estrés oxidante y marcadores de daño oxidante se realizaron en nuestro laboratorio (Laboratorio 209 del Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM).

**Tabla 9. Composición de las dietas que consumieron las ratas Zucker (*fa/fa*) durante 7 semanas.**

Componentes	Dieta control (AIN-93G)	Control + 3% Nopal	Control + 4% Nopal
	<b>g/kg de dieta</b>		
<b>Proteína (caseína)</b>	200	179.4	179.4
<b>Almidón</b>	397.4	397.4	397.4
<b>Malto dextrinas</b>	132	108.4	108.4
<b>Sacarosa</b>	100	100	100
<b>Aceite de soya</b>	70	70	70
<b>Fibra (celulosa)</b>	50	20	10
<b>Fibra (nopal)</b>	--	30	40
<b>Mezcla de minerales AIN-93</b>	35	35	35
<b>Mezcla de vitaminas AIN-93</b>	10	10	10
<b>Bitartrato de colina</b>	2.5	2.5	2.5
<b>L-cisteína</b>	3	3	3

#### **5.4.1.1 Extracción del ARN.**

A partir del hígado se llevó a cabo la extracción del ácido ribonucleico (ARN total) (Chomczynski, 1993). El ARN se utiliza para medir la expresión génica. Una vez que se tiene el ARN mediante el método de transcripción reversa, se genera ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), el cual se utiliza en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), mediante la cual se amplifican segmentos específicos correspondientes a las secuencias de ADN de interés.

#### **Ensayo**

Se colocó una muestra de 500 mg de tejido hepático en un tubo de 30 mL, se agregó 8 mL de tiocianato de guanidina, 56  $\mu$ L de  $\beta$  mercaptoetanol, se tapó y se homogenizó correctamente. Posteriormente se agregaron 400  $\mu$ l de sarcosil al 10%, se tapó y se mezcló suavemente por inversión una sola vez; se centrifugó a 21500 x g durante 15 min a 18°C. Una vez centrifugado se tomaron 8 mL del sobrenadante y se colocó en un tubo con 4 mL de cloruro de cesio. Estas muestras se centrifugaron nuevamente a 10530 x g durante 18 horas a 18°C.

Después de este tiempo se desechó todo el sobrenadante en un frasco y se mantuvieron invertidos. El precipitado se disolvió en 500  $\mu$ L de agua, pipeteando repetidamente para disolver la pastilla, se almacenó la muestra (-70°C) hasta su uso. Los siguientes pasos se realizaron siempre manteniendo las muestras en hielo. Las muestras se descongelaron, se centrifugaron a 21500 x g durante 30 min, se desechó el sobrenadante cuidando que la pastilla no se desprendiera del tubo, se dejó secar por inversión, se añadió 1 mL de etanol al 70% frío y se mezcló hasta que la pastilla se despegó, posteriormente se centrifugó a 21500 x g durante 15 min a 18°C, se desechó el sobrenadante con cuidado y el ADN se resuspendió en agua destilada (el volumen agregado depende del tamaño de la pastilla), el producto obtenido fue el ARN, el cual se calentó a 70°C por 5 min, se cuantificó y almacenó a -70°C.

#### **5.4.2 Reacción de transcripción reversa para la generación de ADNc a partir del ARN extraído.**

La transcripción reversa, se denomina así porque se utiliza un molde de ARN para sintetizar una cadena de ADNc utilizando la enzima transcriptasa reversa.

##### **Ensayo**

Se preparó una mezcla del ARN, con la enzima transcriptasa reversa y el Oligo dT llevando a cabo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen).

#### **5.4.3 PCR en tiempo real.**

La PCR es una técnica desarrollada a mediados de los años 80's. Con esta metodología se pueden producir múltiples copias de un fragmento específico de ADN. Esta técnica se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que produce una cadena de ADNc a otra ya existente. Los requerimientos de esta técnica es que existan nucleótidos en el medio, el ADN que va servir de molde, magnesio (como cofactor de la polimerasa), una enzima Taq polimerasa, puesto que las temperaturas que se utilizan en esta técnica son elevadas (95°C en las fases de desnaturalización del ADN) se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas.

##### **Ensayo**

Se realizó la siguiente mezcla, 10 µL de mezcla maestra, 2 µL de oligonucleótido sentido, 2 µL de oligonucleótido antisentido, 2 µL de ADNc, 2 µL de sonda Taqman y 2 µL de agua (Applied Biosystems). En la Tabla 10 se describen los oligonucleótido utilizados.

**Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para la determinación de la expresión de enzimas antioxidantes en el hígado de las ratas Zucker (*fa/fa*) alimentadas con extracto de nopal.**

<b>Enzima</b>	<b>Oligo</b>	<b>Sentido</b>	<b>Antisentido</b>
Glutación peroxidasa 1	gpx1	GCTGCTCATTGAGAATGTCTG	CTGATGTCCGAAGTATTGC
Glutación reductasa	Gsr	GTTATTGTGGGTGCCGGTTA	GGTGCAGTTGGAAGTATTGA
Catalasa	Cat	GGAGCAGGTGCTTTTGGATA	GGCATCCCTGATGAAGAAAA
Superóxido dismutasa 2, mitocondrial	sod2	CTGGACAAACCTGAGCCCTA	GAACCTGGACTCCCACAGA
Superoxido dismutasa 1, soluble	sod1	CCACTGCAGGACCTCATTTT	CAATCCCAATCACACCACAA

### **5.5 Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes.**

Una vez que se determinó la expresión relativa de ARN de las enzimas antioxidantes en el hígado, se determinó la regulación a nivel post-transcripcional, a través de la actividad enzimática (U). Esta se representa mediante la cantidad de producto formado por una enzima, bajo condiciones dadas por miligramo de proteína total (U/mg de proteína).

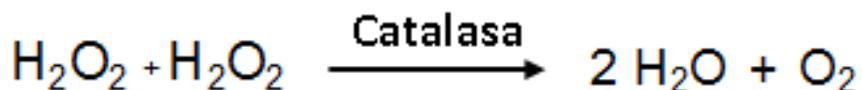
#### **5.5.1 Obtención de homogenizados de tejido hepático.**

Para la determinación de la actividad enzimática se requiere de tejidos homogenados. El tejido de interés se mantuvo en nitrógeno líquido después de su obtención y hasta su uso en cada ensayo. Se pesaron 10 mg del tejido y se disolvieron en la cantidad de amortiguador que se requiera en cada ensayo; esta mezcla se homogenizó en un politrón (marca Kinematica, modelo PT2000 Suiza)

durante 30 seg. Para evitar contaminaciones entre una muestra y otra se realizaron lavados de la cuchilla del rotor con agua destilada y etanol absoluto.

### 5.5.2 Determinación de la actividad de la enzima catalasa.

La catalasa es una enzima antioxidante y cataliza la reacción de dismutación del peróxido de hidrógeno (Fig. 8).



**Figura 8. Reacción de la catalasa, la cual dismuta el peróxido de hidrógeno para formar H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>.**

Esta enzima se encuentra en tejidos de mamíferos principalmente en hígado y riñón (Nakashima *et al.*, 1989). En las células está unida principalmente a los peroxisomas y mitocondrias, mientras que en los eritrocitos hay una gran proporción en forma soluble.

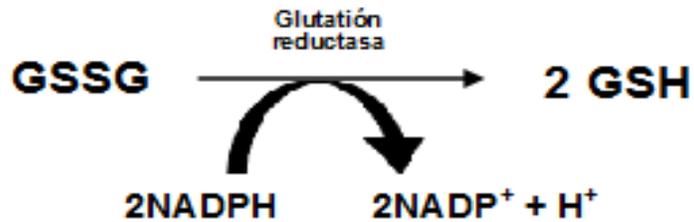
### Ensayo

El ensayo se basa en la disminución de la absorbancia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (240 nm) debido a su degradación por la CAT para formar oxígeno molecular y agua (Aebi, 1984).

En un tubo de ensayo se colocaron 25 µL de homogenizado + 725 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 mM), se agitó en vórtex 3 seg y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro DU 640 Beckman Coulter a 240 nm cada 15 seg durante 30 seg.

### 5.5.3 Determinación de la actividad de la enzima glutatión reductasa.

La glutatión reductasa es una enzima antioxidante necesaria para mantener los niveles de glutatión reducido en un organismo (Fig. 9).



**Figura 9. Reacci3n de la glutati3n reductasa, la cual mantiene los niveles de glutati3n.**

### Ensayo

El ensayo se basa en la desaparici3n del nicotinamida-adenina-dinucle3tido-fosfato (NADPH) el cual se monitorea a 340 nm en una mezcla de reacci3n que contiene glutati3n oxidado (GSSG), EDTA, NADPH y una fuente que contenga la enzima glutati3n reductasa (homogenizado) (Carlberg *et al.*,1975). Se prepar3 la siguiente mezcla de reacci3n (Tabla 11).

**Tabla 11. Mezcla de reacci3n para determinar la actividad de glutati3n reductasa en h3gado.**

	[inicial]	[final]
<b>Amortiguador de fosfatos</b> pH 7.6	<b>100 mM</b>	
<b>EDTA-Na</b>	-	0.5 mM
<b>GSSG</b>	1 mM	1.25 mM
<b>NADPH</b>		0.1 mM

Se colocaron 950  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacci3n en un tubo de vidrio, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de homogenizado (1:10) y se mezcl3. La absorbancia se ley3 en un espectrof3tmetro DU 640 Beckman Coulter a 340 nm cada min durante 3 min.

#### 5.5.4 Determinación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa.

La glutatión peroxidasa es el nombre general de una enzima de la familia de las peroxidasa, cuya actividad biológica principal es proteger al organismo del daño oxidante que puede causar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig.10).

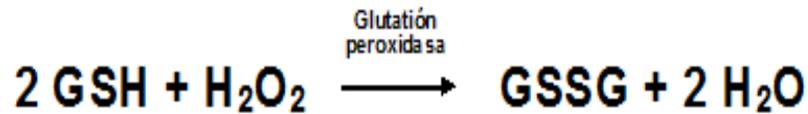


Figura 10. Reacción de la glutatión peroxidasa, la cual utiliza el glutatión (GSH) para proteger del daño oxidante debido al peróxido de hidrógeno.

#### Ensayo

La actividad de GPx se determina de manera indirecta por una reacción acoplada con la GR. Este método se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición del NADPH. La GPx al reducir los hidroperóxidos consume GSH y lo convierte en su forma oxidada, GSSG, este último es regenerado a GSH por la GR, en un proceso que consume NADPH (Fig. 11).

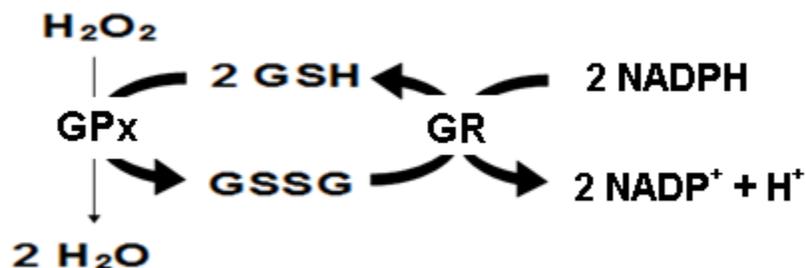


Figura 11. Reacciones para determinar la actividad de la glutatión peroxidasa, mediante una determinación indirecta por desaparición de NADPH.

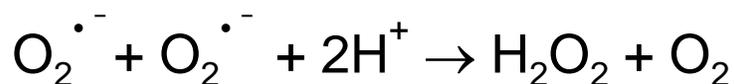
Para llevar a cabo el ensayo se preparó una mezcla de reacción (Tabla 12). Posteriormente se colocaron 400 µL de la mezcla en un tubo de ensayo más 50 µL de muestra. Se incubó 5 min a temperatura ambiente. Seguido de ello se adicionaron 25 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5 mM) (Lawrence *et al.*, 1976). Las lecturas se llevaron a cabo cada min durante 3 min en un espectrofotómetro DU 640 Beckman Coulter a 340 nm.

**Tabla 12. Mezcla de reacción para determinar la actividad de glutatión peroxidasa en hígado.**

	Conc. Final
EDTA-Na	0.5 mM
Azida de sodio	1 mM
GSH	1 mM
NADPH	0.1 mM
GR	168 U
Buffer fosfatos pH 7	50 mM

### 5.5.5 Determinación de la actividad de la enzimas superóxido dismutasa total.

Las superóxido dismutasas son metaloenzimas que catalizan la conversión del anión superóxido para obtener oxígeno molecular y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig.12).

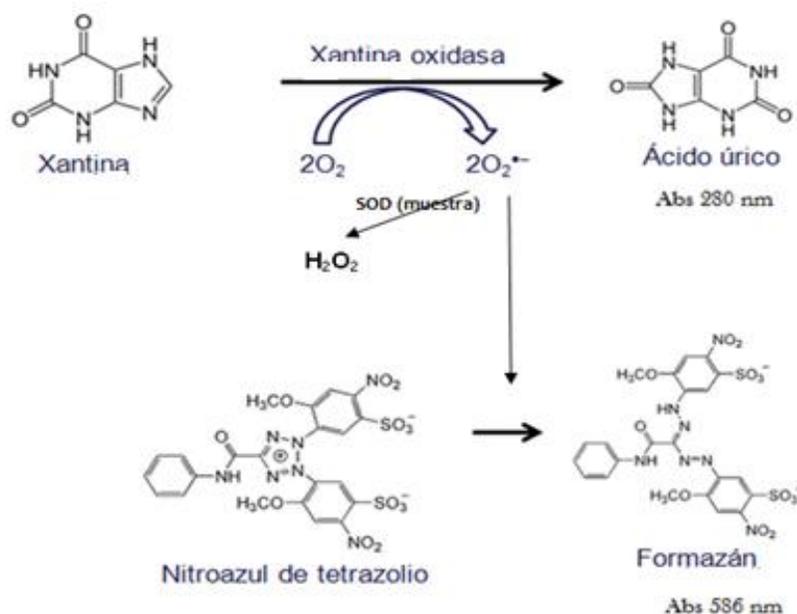


**Figura 12. Reacción de SOD. Dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno por la SOD.**

### Ensayo

Para determinar la actividad de la SOD, se aprovecha la capacidad de los aniones superóxido, generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa (Fig. 13), para

reducir el azul de nitrotetrazolio (NBT, por sus siglas en inglés). Esta reducción es inhibida o disminuida en caso de que la muestra contenga actividad enzimática para dismutar este radical (Oberley *et al.*, 1984).



**Figura 13.** Reacción de la xantina oxidasa con la xantina, cuyo producto es el  $O_2^{\cdot-}$ . La interacción del  $O_2^{\cdot-}$  con NBT produce el formazán, el cual puede ser medido espectrofotométricamente a 560 nm.

En el ensayo se preparó una mezcla de reacción (Tabla 13), sin XO que es la enzima que inicia la reacción.

**Tabla 13.** Mezcla de reacción para determinar actividad de SOD en tejido hepático.

	Conc. final
Xantina	0.122 mM
EDTA	0.122 mM
NBT	30.6 $\mu$ M
Albúmina	0.006%
$Na_2CO_3$	49 mM

Para el ensayo se colocaron en un tubo de ensayo 1.66 mL de mezcla de reacción, 330  $\mu$ L de amortiguador y 33  $\mu$ L de XO (168 U/L). La reacción se incubó 15 min a 27°C. Después se agregaron 660  $\mu$ L de CuCl<sub>2</sub> para detener la reacción. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm durante 3 min, cada min, en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT.

## **5.6 Determinación de marcadores de estrés oxidante en hígado de ratas Zucker (*fa/fa*).**

### **5.6.1 Determinación de especies reactivas de oxígeno en tejido.**

Una de las técnicas para la detección intracelular de ERO, es mediante el uso de 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA).

Esta molécula fluoresce hasta que se eliminan los grupos acetato por las esterasas intracelulares y se oxida por ER que estén dentro de la célula. Por lo tanto, el uso de esta sonda sirve como indicador del estado redox en general en las células o en un tejido.

### **Ensayo**

La formación de ERO se estimó por un método fluorométrico de acuerdo a lo reportado por Ali y colaboradores (1992). En una placa negra de 96 pozos (marca Corning Costar) se colocaron 300  $\mu$ L del homogenado de tejido hepático en presencia de 100  $\mu$ L de DCF-DA (5 mM), se incubaron a 37°C durante 60 min. La intensidad de fluorescencia se registró al final de la incubación en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT a las longitudes de excitación de 495 nm y de emisión de 525 nm.

### **5.6.2 Determinación de lipoperoxidación mediante malondialdehído.**

El proceso de oxidación de los ácidos grasos se denomina lipoperoxidación. Se trata de una reacción en cadena o autocatalítica, es decir que, una vez que se inicia, continúa desarrollándose por sí misma. Uno de los productos finales de



Se mezcló e incubó a 45°C durante 40 min, posteriormente se llevó a cabo una centrifugación a 3,000 x g durante 5 min (Gerard *et al.*, 1998). Y finalmente se determinó la absorbancia a 586 nm en un espectrofotómetro DU 640 Beckman Coulter.

### **5.7 Determinación de la actividad antioxidante del nopal en humanos sanos y pacientes diabéticos.**

Además de los diferentes estudios en los que se han descrito las diversas propiedades del nopal (Fernández *et al.*, 1990; Muñoz de Chávez *et al.*, 1995; Parck *et al.*, 1998, Park *et al.*, 2001); el departamento de Fisiología de la Nutrición del INNSZ ha llevado a cabo estudios en los cuales se ha demostrado que el consumo de 300 g de nopal en pacientes diabéticos previene el aumento de los niveles plasmáticos de glucosa en estos pacientes. En base a estos resultados y buscando nuevos beneficios del consumo de nopal se llevaron a cabo determinaciones de la actividad antioxidante en plasma y eritrocitos de humanos que consumieron 300g nopal. Para lo cual se realizaron 2 ensayos, uno con sujetos sanos y otro con diabéticos, en ambos casos el consumo de 300 g de nopal aportaría 24-27 mg de polifenoles, además de 33.9- 160.2 µg de β-carotenos, los cuales son otros de los compuestos a los que se les ha adjudicado actividad antioxidante (Rossoni-Júnior *et al.*, 2011).

En uno de los ensayos se seleccionaron a sujetos sanos para administrarles una dieta libre de antioxidantes (tabla 15, ajustando la dieta a los requerimientos energéticos de cada participante) durante 3 días. En la dieta se eliminaron los alimentos a los cuales se les haya caracterizado por tener actividad antioxidante como: frutas, verduras, café, chocolate y ajo, entre otros (Kumar y Devasagayam, 2010; Borek, 2001; Shivashankara *et al.*, 2011).

**Tabla 15. Dieta para determinación de la actividad antioxidante conferida por el consumo de 300 g de nopal durante 3 días. La dieta control sin antioxidantes fue la misma excepto que el nopal fue sustituido por tortillas.**

<b>Desayuno</b>	<p><b>Atole de maíz</b> [47 g de tortillas, 1 taza de agua y 1 cucharadita de azúcar, sin canela o vainilla]</p> <p>1 pieza de <b>nopal</b> al vapor* [se cocinó sin contacto con el agua por 8 min]</p> <p>3 rebanadas de jamón [sin verdura, aceite, ningún condimento y/o hierba fina] o 2 <b>salchichas</b> crudas o cocidas [sin condimento o aderezo a la salchicha]</p>
<b>Colación</b>	Paleta Tutsi pop
<b>Comida</b>	<p>1/2 taza de <b>arroz</b> cocido [sin consomé de pollo, condimentos, verduras, aceite o margarina, solo se agregó sal]</p> <p>150 g <b>suadero</b> asado [sin limón, salsas, cilantro, perejil, solamente sal]</p> <p>1 pieza de <b>nopal</b> al vapor* [se cocinó sin contacto con el agua por 8 min]</p> <p>3 <b>tortillas de maíz</b> [obtenidas de tortillería]</p>
<b>Colación</b>	2 <b>salchichas</b> crudas o cocidas [sin ningún condimento o aderezo a la salchicha]
<b>Cena</b>	<p>1 paleta <b>tutsi pop</b></p> <p>1 pieza de <b>nopal</b> al vapor* [se cocino sin contacto con el agua por 8 min]</p> <p>1 <b>tortilla de maíz</b> [obtenida de tortillería]</p>

**\*La forma de cocción del nopal fue seleccionada tomando en cuenta un tiempo que no afecte la composición del nopal y que fuera aceptado sensorialmente por los consumidores.**

Los criterios de inclusión para la selección de estos sujetos sanos fueron: parámetros bioquímicos estables realizados previamente en el INNSZ, índice de masa corporal con un valor menor a 25, previa autorización de cada uno de los participantes, sin importar el sexo de los participantes.

En el periodo de la ingesta de la dieta, a los sujetos experimentales se les tomaron muestras de sangre. La primera muestra de sangre se tomó el día inicial de la dieta, en ayuno de 8 h; al tercer día de la dieta, se realizó la segunda toma, 2 h después de haber consumido 300 g de nopal en el desayuno.

El segundo ensayo fue en colaboración con el Departamento de Fisiología de la Nutrición del INNSZ, participaron pacientes diabéticos a los cuales se administró un desayuno que incluía 35% de proteína de soya (dieta alta en proteína de soya, DAP) y 300 g de nopal, esto sólo por un día. El desayuno DAP incluía hamburguesa de soya y una bebida hecha a base de leche de soya. Los pacientes consumieron 300 g de nopal 15 min antes de un desayuno DAP. El uso de desayuno DAP en pacientes diabéticos es debido las propiedades benéficas del consumo de esta proteína demostrados en diversos estudios en modelos animales (Noriega-López *et al.*, 2007; Torre-Villalvazo *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2006).

Los criterios de inclusión para los pacientes diabéticos fueron: hemoglobina glucosilada menor a 8 mg/dl, tratamiento médico con metformina y consentimiento de cada uno y rango de edad entre 30-60 años y los criterios de exclusión fueron: presentar alguna otra enfermedad, pérdida de peso rápida y fumar, en ambos criterios no importa el sexo de los pacientes diabéticos.

La toma de muestra de sangre para los pacientes se llevó a cabo antes de consumir el nopal y a diferentes tiempos (60, 120 y 150 min) después del consumo del desayuno alto en proteína. La mayoría de estudios que se han llevado a cabo para la determinación de la actividad antioxidante *in vivo* antes y después del consumo de ciertos alimentos, se han realizado en plasma y no se han encontrado diferencias significativas. Koren y colaboradores (2010), reportan que los cambios en la actividad antioxidante *in vivo* se evalúan mejor en eritrocitos que en plasma.

Una vez que se obtuvieron las muestras sanguíneas se procesaron para obtener los diferentes componentes sanguíneos: plasma y eritrocitos, como se describe a continuación. Se colocó 1 mL de sangre en tubo eppendorf de 1.5 mL, se realizaron 3 centrifugaciones (500 g x 5 min), la primera de ellas para la obtención del plasma y las posteriores son lavados con solución salina del paquete celular restante (eritrocitos). Los eritrocitos se resuspendieron en 500 µL de HBSS (Hank's Balance Salt Solution).

### **5.7.1 Método de DPPH para determinación de actividad antioxidante en sangre.**

Se realizó el siguiente ensayo para determinar la actividad antioxidante basado en el método de DPPH (cuyo fundamento se explicó anteriormente), utilizando los distintos componentes obtenidos de la sangre (plasma y eritrocitos).

#### **Ensayo**

Se colocaron en un tubo eppendorf, 50  $\mu$ L de solución salina, 25  $\mu$ L de plasma o eritrocitos más 50  $\mu$ L DPPH (1 mM). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 min. Posteriormente se agregaron 800  $\mu$ L de etanol absoluto, se mezcló e incubó durante 2 min a temperatura ambiente (Koren *et al.*, 2010). Por último se centrifugó a 1500 x g durante 2 min. Se leyó la absorbancia del sobrenadante en un espectrofómeto DU 640 Beckman Coulter a 517 nm.

### **5.8 Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron en promedio  $\pm$  EEM. Los datos se analizaron con ANOVA de una vía, seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Banferroni, así como prueba t student pareada. Para esto se empleó el software Prims 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Un valor de  $p < 0.05$  se considera estadísticamente significativo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Estudios *in vitro*. Actividad antioxidante del extracto de nopal.

La obtención del extracto de nopal empleado en este estudio se realizó con diversos disolventes como el agua, acetona/agua y etanol/agua. La fracción acuosa extrae los polifenoles que se hallan como glucósidos, las mezclas acetona agua extraen todo tipo de polifenoles y el etanol extrae tanto los glucósidos como los taninos condensados (Leighton y Urquiaga, 2000). Con este procedimiento se obtuvo un extracto polifenólico. Posteriormente se realizó una hidrólisis ácida ya que en el nopal los polifenoles se encuentran mayoritariamente enlazados a la fibra insoluble, asociados como glucósidos (Ginestra *et al.*, 2009), lo cual podría intervenir en el metabolismo de estos compuestos.

La determinación de la actividad antioxidante en la que se utilizó un extracto de nopal hidrolizado, se realizó mediante el método DPPH, el cual es un método muy eficaz utilizado para determinar la actividad antioxidante de diversos compuestos y el cual no es específico para alguna especie reactiva, sólo se determinó si la muestra analizada tiene algún efecto sobre los radicales libres. En este ensayo se usó el antioxidante ácido ascórbico como estándar (Maldonado *et al.*, 2005). En los resultados se encontró que el extracto de nopal presenta actividad antioxidante (Fig. 15A) la cual es dependiente de la concentración. El  $IC_{50}$  que presenta el extracto de nopal es de  $330 \pm 51 \mu\text{g/mL}$ , el cual es cien veces mayor al  $IC_{50}$   $3.37 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$  del ácido ascórbico, por lo cual es menos eficiente que el ácido ascórbico para atrapar DPPH.

Con el objetivo de explorar si el proceso de hidrólisis tiene algún efecto en la actividad antioxidante del extracto de nopal, se compararon los extractos de nopal hidrolizado y no hidrolizado. La evaluación de la actividad antioxidante se realizó con el método de DPPH. En los resultados obtenidos se encontró que la hidrólisis mejora el efecto antioxidante del extracto de nopal (Fig. 15B), ya que el  $IC_{50}$  del extracto de nopal hidrolizado es menor al del extracto de nopal no hidrolizado ( $0.33 \pm 0.05$  vs  $IC_{50}$  de  $0.83 \pm 0.08 \text{ mg/mL}$  ).

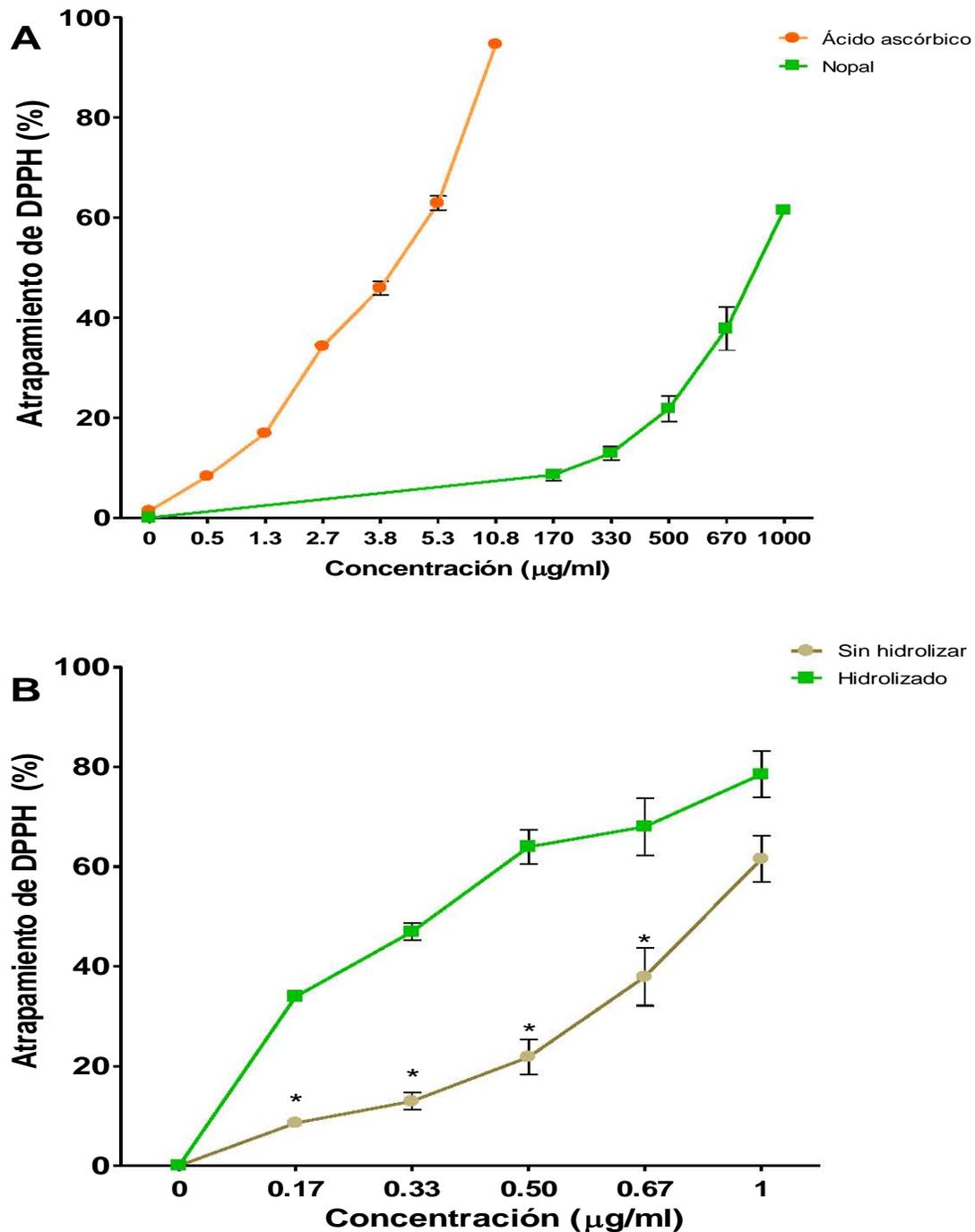


Figura 15. Actividad antioxidante del extracto de nopal determinada mediante el método DPPH. A. Extracto de nopal hidrolizado y la curva estándar de ácido ascórbico. B. Comparación entre la actividad antioxidante del extracto hidrolizado y no hidrolizado de nopal, \*P<0.001 vs extracto de nopal hidrolizado. Los datos se reportan como promedio ± EEM, n=6-10.

Se llevó a cabo la cuantificación de los polifenoles totales de los extractos de nopal hidrolizado y no hidrolizado. Los resultados obtenidos en esta determinación se muestran en la tabla 16.

**Tabla 16. Polifenoles totales determinados en los extractos del nopal hidrolizado y no hidrolizado expresados en equivalentes de ácido gálico, \*P<0.05 vs extracto de nopal hidrolizado. Los datos se reportan como promedio  $\pm$  EEM, n=4.**

Extracto de nopal rico en polifenoles	Equivalentes de ácido gálico (mg/L)
Hidrolizado	0.930 $\pm$ 0.21*
No hidrolizado	0.328 $\pm$ 0.06

La concentración de polifenoles en el extracto de nopal hidrolizado fue mayor a la del extracto no hidrolizado. Esta determinación permitió conocer la cantidad de polifenoles libres, a los cuales se les puede adjudicar actividad antioxidante.

Con base en los resultados obtenidos en el método DPPH y en la determinación de los polifenoles, se decidió utilizar el extracto de nopal hidrolizado para los siguientes ensayos.

Posteriormente se realizaron diferentes ensayos para evaluar la capacidad atrapadora específica contra  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{HOCl}$ .

### 6.1.1 Atrapamiento de especies reactivas: $\cdot\text{OH}$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\text{ONOO}^-$ , $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\text{HOCl}$ .

En las determinaciones realizadas el extracto de nopal ejerció una actividad de atrapamiento dependiente de la concentración. El extracto de nopal presentó actividad atrapadora hacia el  $\cdot\text{OH}$ , sin embargo la actividad hacia esta especie fue menor que la que se determinó para la DMTU (atrapador estándar), ya que el extracto de nopal presentó un  $\text{IC}_{50}$  de  $4.62 \pm 0.89$  mg/mL, el cual es cien veces mayor al del atrapador estándar DMTU,  $\text{IC}_{50}$  de  $0.046 \pm 0.002$  mg/mL (Fig. 17A). Para el caso del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el extracto de nopal presentó un  $\text{IC}_{50}$  de  $7.01 \pm 1.1$  mg/mL,

este valor es similar al atrapador estándar piruvato, el cual tuvo un  $IC_{50}$  de  $4 \pm 0.016$  mg/mL (Fig. 17B), por lo que se sugiere que el extracto de nopal es un atrapador eficiente contra esta especie reactiva. El extracto de nopal presentó actividad atrapadora hacia el  $ONOO^-$ , el  $IC_{50}$  del extracto de nopal fue de  $817.6 \pm 60.13$   $\mu$ g/mL, el cual es mayor en comparación con el atrapador específico penicilamina, la cual presentó un  $IC_{50}$  de  $4 \pm 0.82$   $\mu$ g/mL (Fig. 17C). El extracto de nopal fue un atrapador eficiente contra el  $O_2^{\bullet-}$ , ya que presentó un  $IC_{50}$  de  $37.45 \pm 0.75$   $\mu$ g/mL, el cual es menor al  $IC_{50}$  ( $65.85 \pm 4.16$   $\mu$ g/mL) obtenido con el atrapador específico ácido ascórbico (Fig. 17D). Para el ácido hipocloroso el extracto de nopal presentó un atrapamiento similar al del atrapador específico NDGA ( $IC_{50}$  de  $0.183 \pm 0.09$  mg/mL vs  $IC_{50}$  de  $0.168 \pm 0.014$  mg/mL) (Fig. 17E).

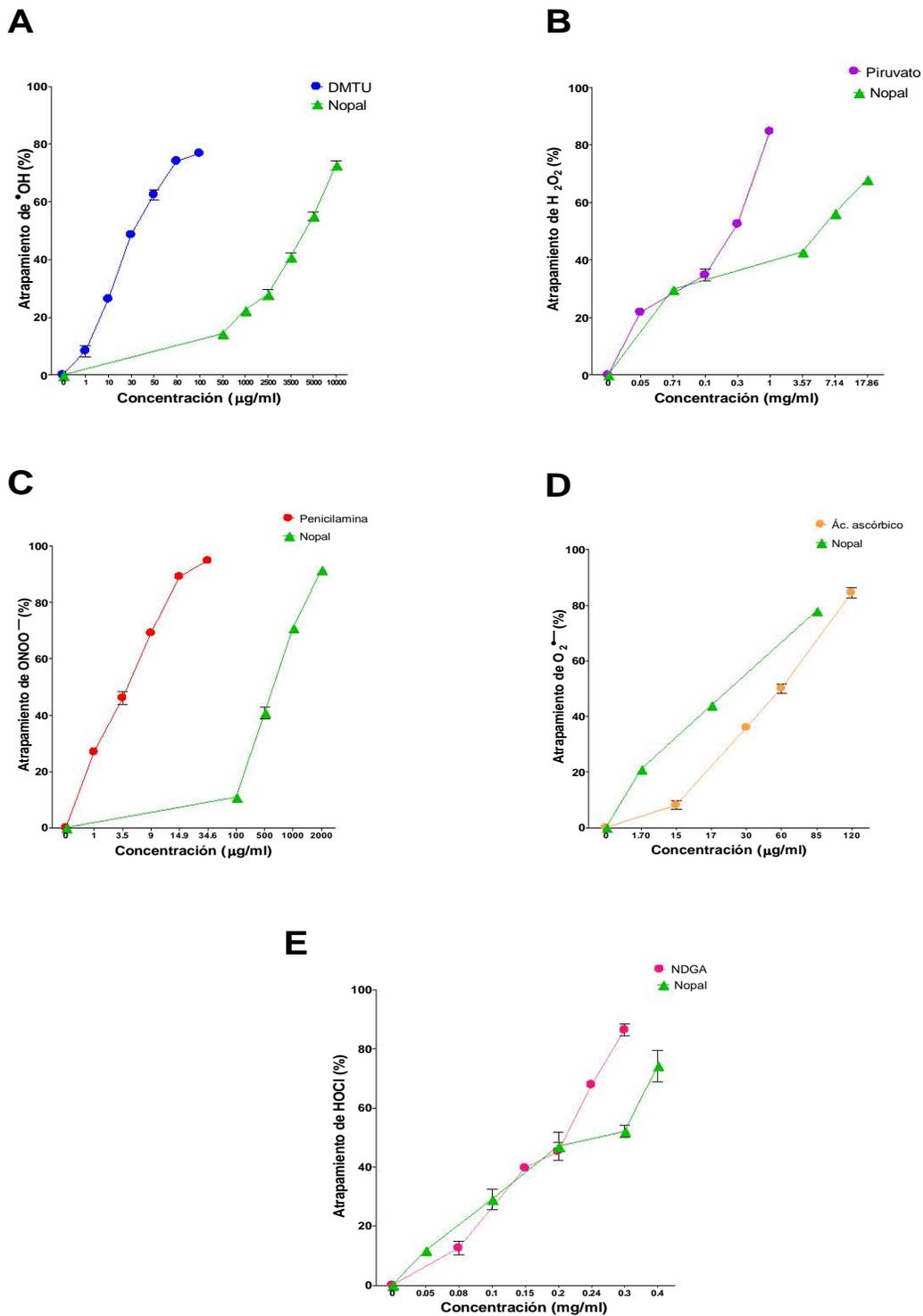


Figura 17. Actividad atrapadora del extracto de nopal hacia diferentes especies reactivas. Atrapamiento (%) de A.  $\cdot\text{OH}$ ; B.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; C.  $\text{ONOO}^-$ ; D.  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y E.  $\text{HOCl}$ . Los datos se reportan como promedio  $\pm$  EEM, n=4-10.

Los resultados obtenidos del extracto de nopal en los ensayos de la actividad atrapadora contra diferentes ER se resumen en la tabla 17.

**Tabla 17. Capacidad atrapadora del extracto de nopal hacia diversas especies reactivas. Se presentan los datos de IC<sub>50</sub> obtenidos en cada ensayo.**

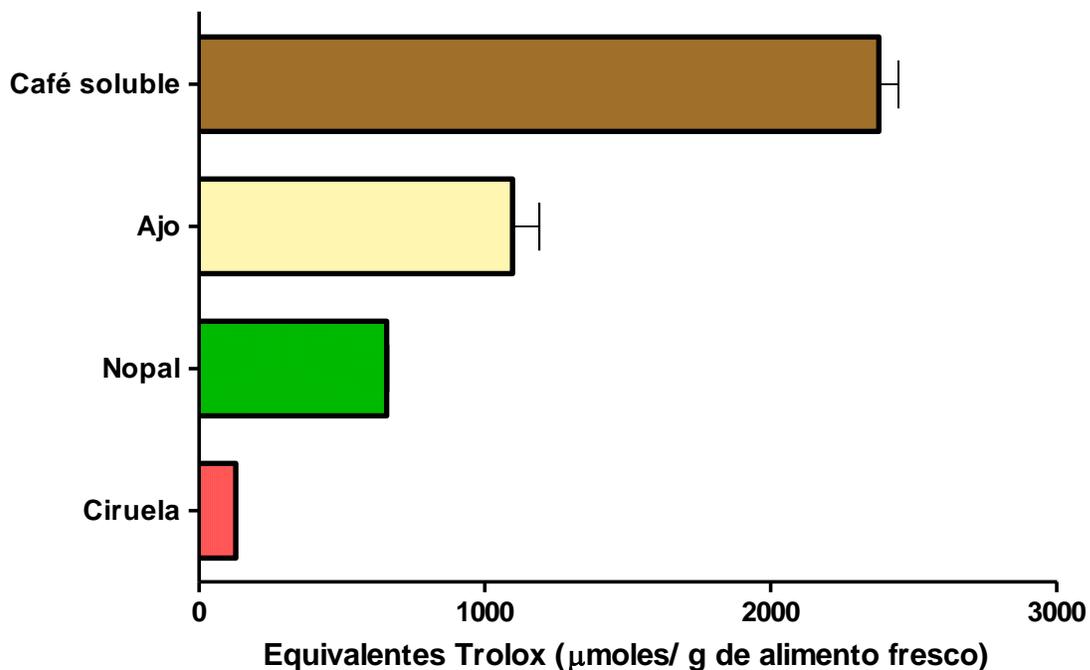
Actividad atrapadora de especies reactivas e IC <sub>50</sub>			
Especie reactiva	Atrapador específico	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL) del extracto de nopal
DPPH	Vitamina C	3.8±0.03 (10)	Hidrolizado 330±8.16 (6)
			No hidrolizado 830±32.65 (6)
·OH	DMTU	46±1.1 (4)	4620±445 (4)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Piruvato	4000±4.46 (5)	7010±491 (5)
ONOO <sup>-</sup>	Penicilamina	4±0.4 (4)	820±3 (4)
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Vitamina C	65±2.3 (4)	37±3.75(4)
HOCl	NDGA	164±5.2 (4)	184±45 (4)

Los datos se reportan como promedio ± EEM, y el valor de n se indica entre paréntesis en cada ensayo.

### 6.1.2 Comparación de la actividad antioxidante del nopal y diferentes alimentos.

Con el objetivo de comparar la actividad antioxidante del extracto de nopal con extractos de otros alimentos se emplearon café soluble, ajo y ciruela. Se evaluó la actividad antioxidante de estos extractos mediante el método ORAC. Los resultados se reportan como equivalentes trolox (µmoles de trolox/g muestra fresca). El trolox es un análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol (vitamina E) y debido a la actividad antioxidante que presenta se ha utilizado como estándar para diferentes ensayos, uno de ellos es ORAC. En los resultados se encontró que el café soluble presenta mayor actividad antioxidante ya que tuvo mayor cantidad de equivalentes trolox, 2377.8 ± 68.6 µmoles de trolox/g muestra fresca, seguido del

ajo el cual presentó  $1096.7 \pm 94.3$   $\mu\text{moles}$  de trolox/g muestra fresca, en tercer lugar el nopal con  $656.97 \pm 5.20$   $\mu\text{moles}$  de trolox/g muestra fresca y en último lugar la ciruela con  $128.31 \pm 1.66$   $\mu\text{moles}$  de trolox/g muestra fresca, siendo muy similares las actividades antioxidantes del nopal y el ajo (Fig. 18).



**Figura 18.** Actividad antioxidante de diferentes extractos de alimentos, evaluada mediante el método ORAC. Los resultados se expresan como equivalentes trolox ( $\mu\text{moles}$ )/g de alimento fresco. Los datos se reportan como promedio  $\pm$  EEM, n=3.

## 6.2 Estudios *in vivo*.

### 6.2.1 Determinación de la expresión génica, actividad de enzimas antioxidantes y marcadores de estrés oxidante en hígado de ratas Zucker (*fa/fa*).

El EO se ha relacionado ampliamente con diversas patologías. Por lo que es importante conocer la expresión de enzimas antioxidantes que forman parte del sistema antioxidante endógeno, el cual se activa como forma de defensa del organismo para disminuir las especies reactivas que generan EO.

Se encontró un aumento significativo en la expresión de CAT en los grupos de nopal al 3 y 4% comparados con el grupo control en la condición de ayuno (Fig. 19A); sin embargo este aumento no se vio reflejado en la actividad de la enzima en esta misma condición pues se encontró que el efecto es contrario, ya que la actividad de la enzima disminuyó en estos grupos. En postprandio, la expresión de CAT en los grupos de nopal al 3 y 4% presentó una disminución significativa en comparación con su grupo control (Fig. 19A), esto si concuerda con la actividad de la enzima en esta misma condición (Fig. 19B).

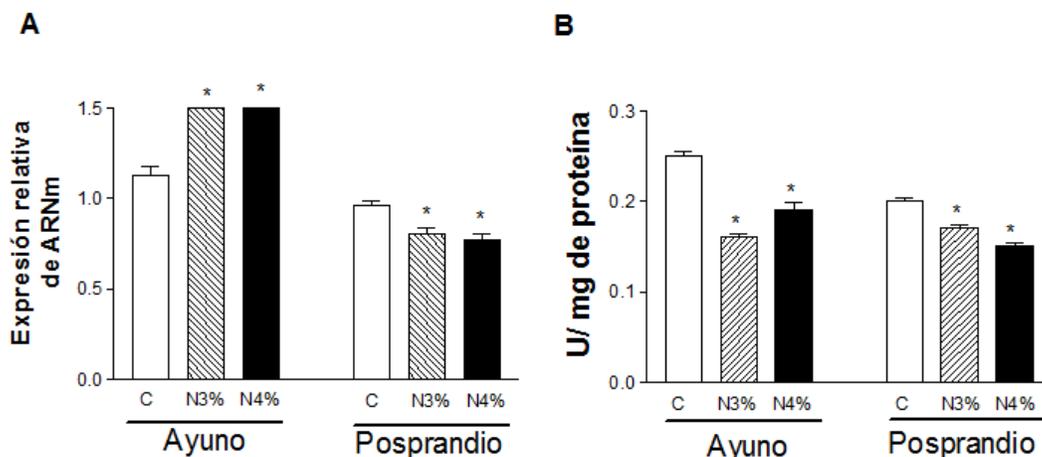
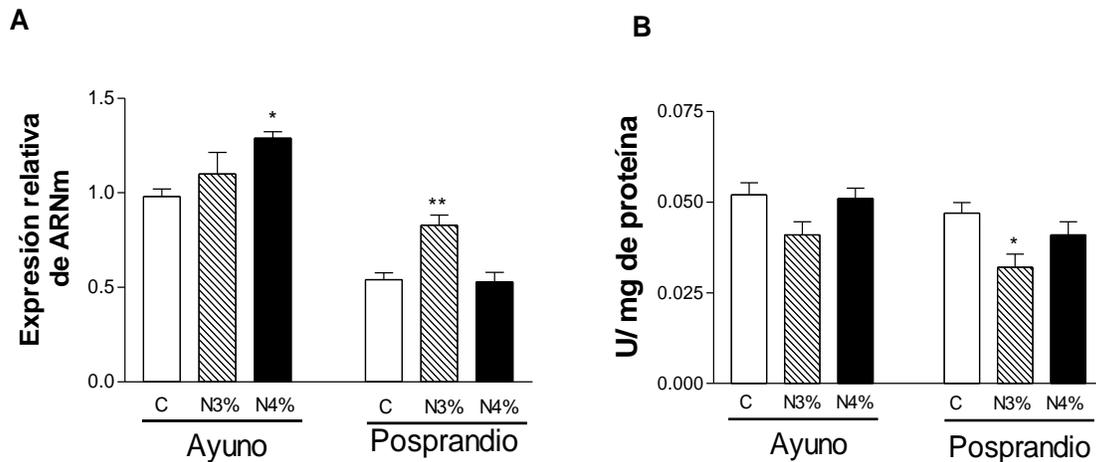


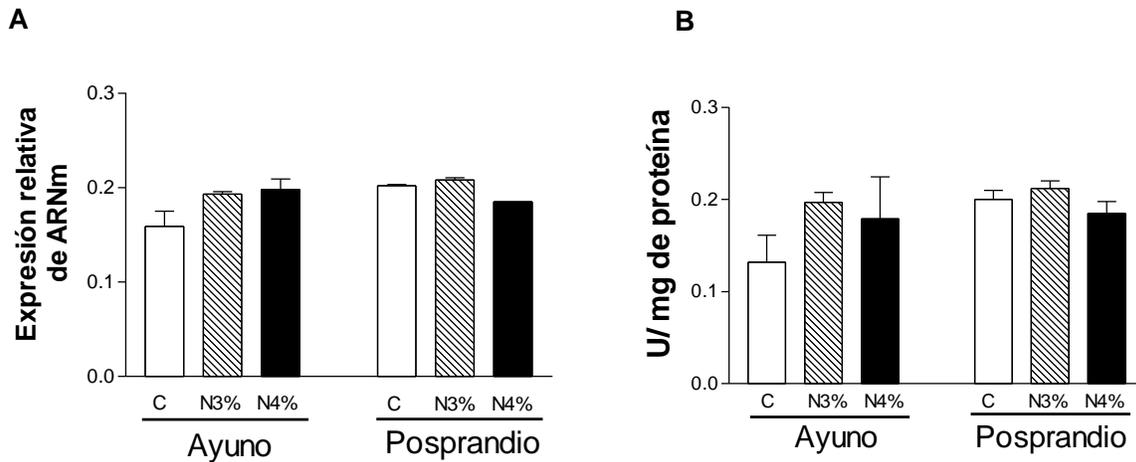
Figura 19. Expresión y actividad de catalasa en hígado de ratas Zucker (*fa/fa*), C (control), N3% (nopal 3%) y N4% (nopal 4%). A. ARNm relativo, \*P < 0.001 vs control respectivo; B. Actividad de la enzima catalasa, \*P < 0.01 vs control respectivo. Los datos se reportan como promedio  $\pm$  EEM, n=5.

La expresión de GR, en condición de ayuno presenta un aumento significativo en el grupo de nopal 4% respecto a su control (Fig. 21A), sin embargo este aumento no se ve reflejado en la actividad de la misma (Fig. 21B). Para la condición de posprandio se observó un aumento en el grupo de nopal 3% respecto a su control (Fig. 21A), sin embargo para este mismo grupo la actividad presentó una disminución significativa respecto al control (Fig. 21B).



**Figura 20. Expresión y actividad de la glutatión reductasa en hígado de ratas Zucker (*fa/fa*), C(control), N3% (nopal 3%) y N4% (nopal 4%). A. ARNm relativo, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$  vs control respectivo. B. Actividad enzimática de la glutatión reductasa, \*  $P < 0.05$  vs control respectivo. Los datos se reportan como promedio  $\pm$  EEM,  $n=5$ .**

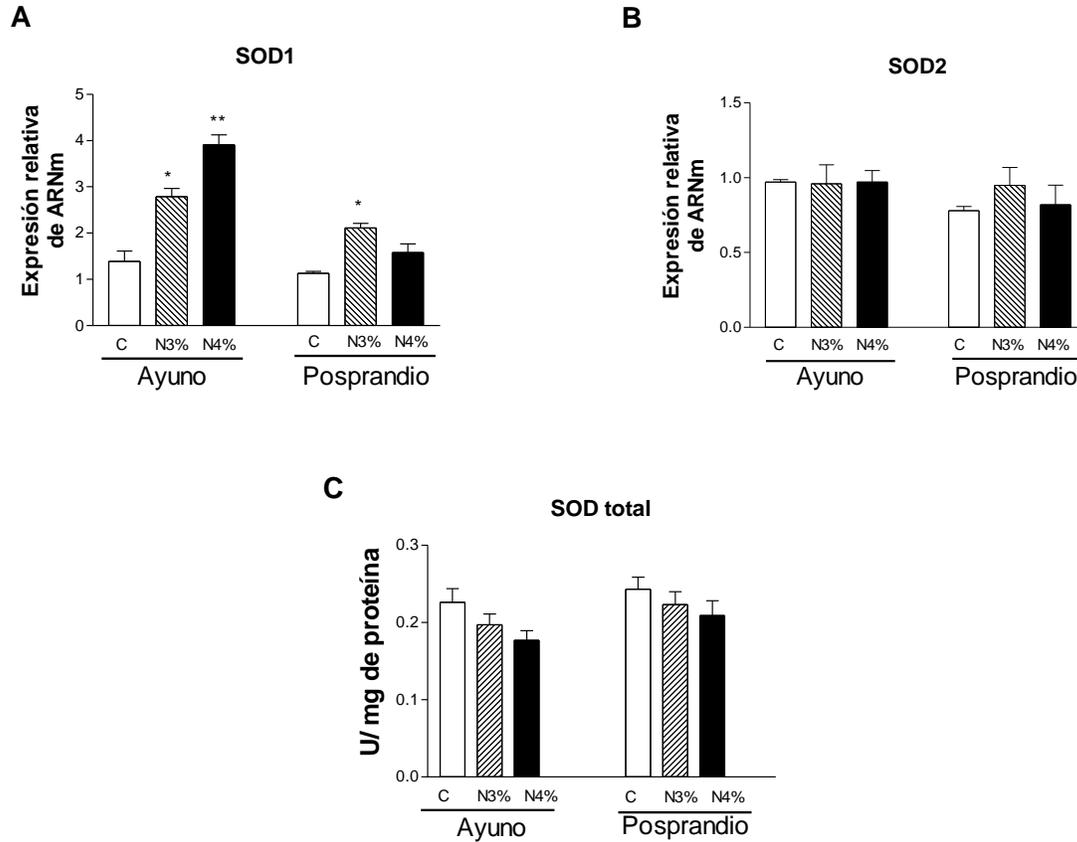
No hubo cambio de la enzima GPx en ambas condiciones (ayuno y posprandio) para ninguno de los grupos de nopal (Fig. 21A-B).



**Figura 21. Expresión y actividad de la glutatión peroxidasa en hígado de ratas Zucker (*fa/fa*), C(control), N3% (nopal 3%) y N4% (nopal 4%). A. ARNm relativo B. Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa. Los datos se reportan como promedio  $\pm$  EEM, n=5**

La expresión de SOD1 (citoplasmática) presenta un aumento significativo en los grupos de nopal 3 y 4% en ayuno (Fig. 22A). En la condición de posprandio se observó un aumento significativo en el grupo de nopal 3% y permaneció sin cambios el grupo nopal 4% con respecto al grupo control (Fig. 22 A). Para SOD2 (mitocondrial) no se observa ninguna diferencia significativa ninguno de los grupos (Fig. 22 B).

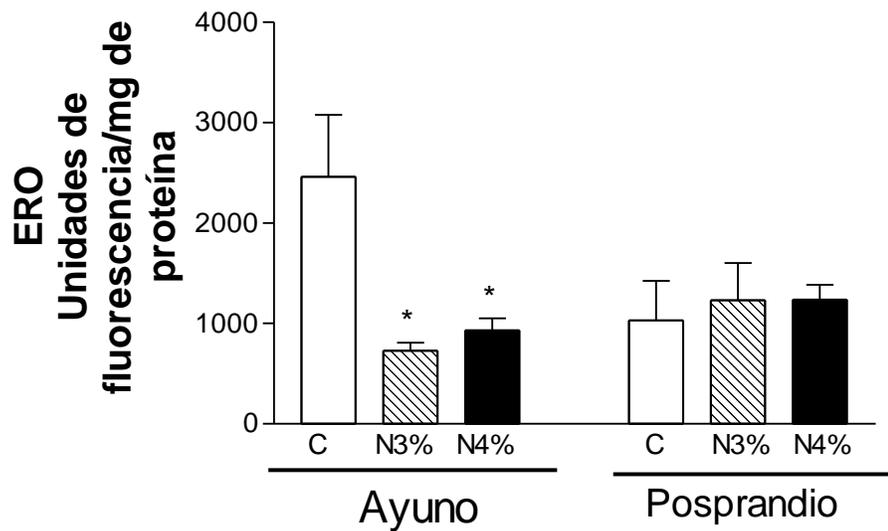
La actividad total, de las diferentes isoformas de la SOD no presentan diferencias, sin embargo se debe determinar la actividad específica de la SOD2 para saber si el comportamiento de la expresión se correlaciona con su actividad (Fig. 22C).



**Figura 22.** Expresión de la superóxido dismutasa citoplasmática y mitocondrial en tejido hepático de ratas Zucker (*fa/fa*), C (Control), N3% (nopal 3%) y N4% (nopal 4%). A. ARNm relativo de SOD1, \*P<0.001, \*\*P<0.0001, vs control respectivo. B. ARNm relativo de SOD2; C. Actividad enzimática total de la superóxido dismutasa. Los datos se reportan como promedio  $\pm$  EEM, n=5.

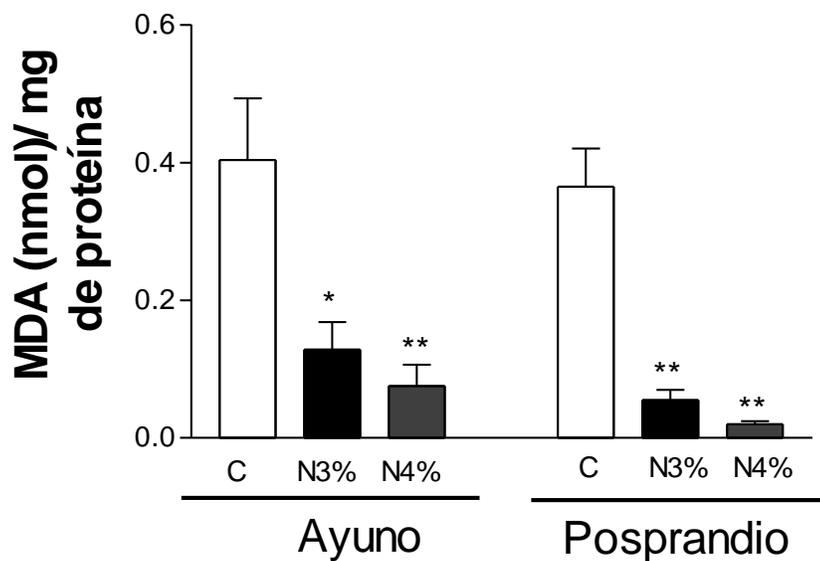
### 6.2.2 Determinación de marcadores de estrés oxidante en hígado de ratas Zucker (*fa/fa*).

En la determinación ERO en el hígado de ratas Zucker (*fa/fa*) se encontró que existe una disminución significativa de las mismas en los grupos de nopal en ayuno (Fig.23), por otro lado en el posprandio no se observan diferencias de los grupos del nopal respecto a su control (Fig. 23). Comparando los grupos controles en ambas condiciones se observa que en el posprandio hay una menor cantidad de ERO comparado con la condición ayuno.



**Figura 23. Especies reactivas de oxígeno (ERO) en hígado de ratas Zucker (*fa/fa*), C (control), N3% (nopal 3%) y N4% (nopal 4%), \*P< 0.001 vs control respectivo. Los datos se reportan como promedio  $\pm$  EEM, n=5.**

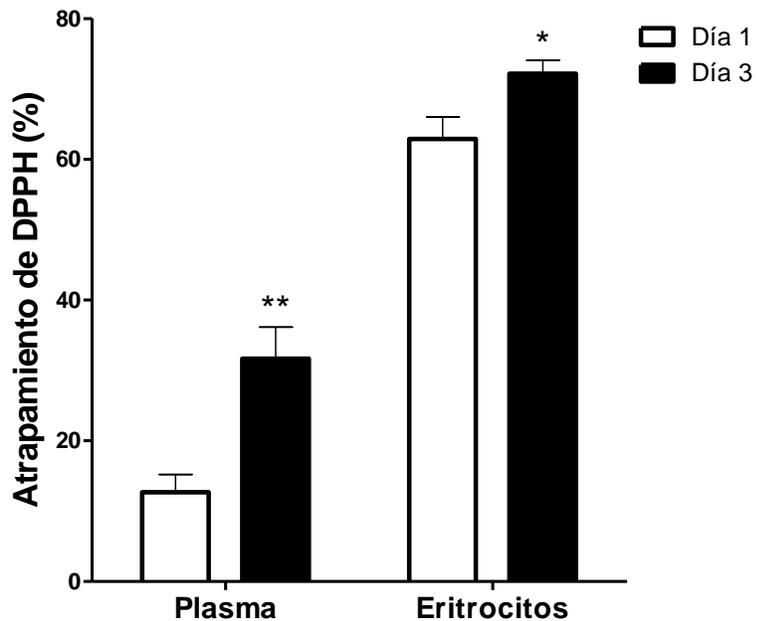
El MDA es un producto final de lipoperoxidación y su determinación se usa frecuentemente como un marcador de daño de las ER sobre los lípidos (Yesilbursa *et al.*, 2005). Los resultados para esta determinación se observan en la figura 24. Se observa que existe mayor lipoperoxidación en el grupo control en ambas condiciones (ayuno y posprandio), sin embargo en los grupos alimentados con nopal el nivel de MDA disminuye significativamente. Debido a los resultados anteriores podría sugerirse que el nopal presenta un efecto como antioxidante directo al actuar sobre las ERO y esto podría relacionarse directamente con la disminución significativa de la cantidad de MDA presente en los grupos alimentados con nopal.



**Figura 24. Concentración de malondialdehído (MDA) en hígado de ratas Zucker (*fa/fa*), C (control), N3% (nopal 3%) y N4% (nopal 4%), \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control respectivo. Los datos se reportan como promedio  $\pm$  EEM,  $n=5$ .**

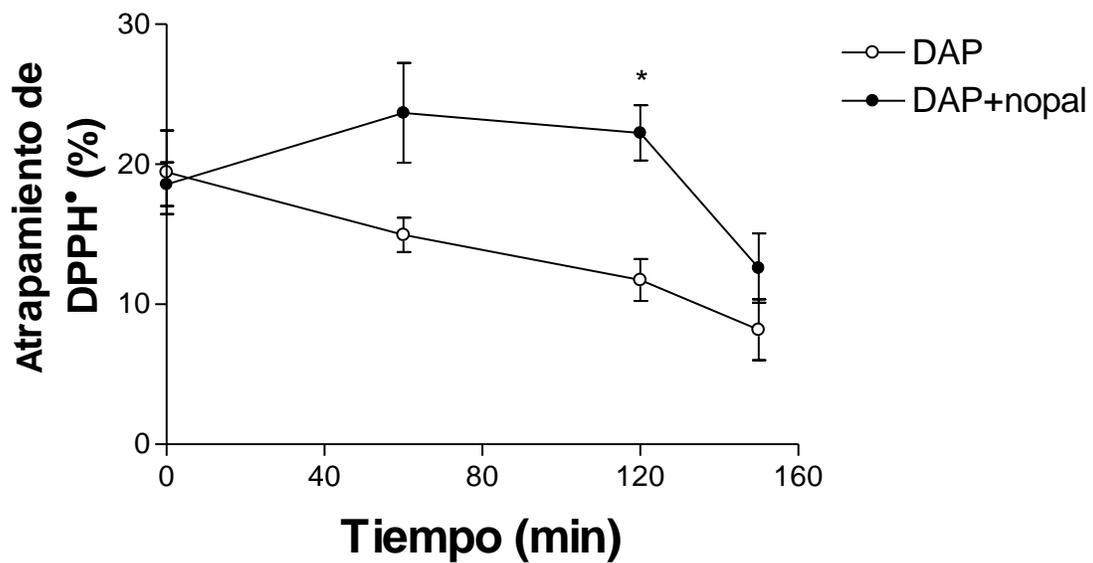
### **6.2.3 Determinación de actividad antioxidante del nopal en plasma, eritrocitos y sangre de sujetos sanos y pacientes con DT2.**

En la determinación de la actividad antioxidante *in vivo* en los sujetos sanos, se encontró que el consumo de 300 g de nopal durante 3 días aumenta significativamente la actividad antioxidante. Se encontró un incremento del 20% en el plasma y 10% en los eritrocitos (Fig. 25).



**Figura 25. Actividad antioxidante del nopal en plasma y eritrocitos de sujetos sanos, determinada mediante el método DPPH, \*\*P<0.01 y \*P<0.05 vs control sin nopal. Los datos se reportan como promedio  $\pm$  EEM, n=10.**

Debido a que el aumento de la actividad antioxidante fue más evidente en el plasma, la determinación en los pacientes con DT2 se hizo sólo en el plasma; además se realizó un curso temporal para ver el efecto del consumo de nopal sobre la actividad antioxidante. Se encontró un aumento del 10% en plasma 2 horas después del consumo del nopal en el desayuno (Fig. 26).



**Figura 26. Actividad antioxidante del nopal en plasma de pacientes con DT2, determinada mediante el método DPPH; a diferentes tiempos después del consumo del nopal. DAP (desayuno con alto en proteína), DAP+nopal (desayuno con proteína+ 300 g de nopal), \*P<0.01 vs Plasma DAP. Los datos se reportan como promedio ± EEM, n=10.**

## 7. DISCUSIÓN

En los últimos años ha habido un gran interés por el efecto que tienen diversos compuestos bioactivos sobre la salud. Sin embargo, no existe mucha información sobre alimentos mexicanos. El nopal es un alimento que solo se consume en México, tiene un gran contenido de agua por lo que aporta pocas calorías, contiene compuestos polifenólicos, vitamina C y  $\beta$ -carotenos que le confieren actividad antioxidante. En la actualidad no existe información sobre que especies reactivas de oxígeno que es capaz de atrapar el nopal y si esta actividad antioxidante pudiera ayudar al control de cierto tipo de enfermedades. Además tampoco está ubicada su capacidad antioxidante con respecto a otros alimentos. Por lo que el desarrollo de esta tesis contribuye al conocimiento de las propiedades antioxidantes del nopal en estudios *in vitro* e *in vivo* incluyendo animales y humanos, por lo que actualmente podemos decir que el nopal es un alimento funcional.

Para la obtención de esta conclusión se utilizaron diversas tecnologías y procedimientos tanto *in vitro* como en animales y en pacientes con DT2.

Los resultados con respecto a la actividad antioxidante *in vitro* del extracto de nopal, demuestran que presenta capacidad antioxidante general, determinada mediante el método DPPH, en la cual se obtuvo un  $IC_{50}$  de 0.33 mg/mL, considerando que la concentración de estos polifenoles en el nopal es de 8-9 mg/100 g de nopal fresco (Stintzing y Carle, 2005), sugiere que la concentración de estos compuestos en 300 g de este alimento sería suficiente para tener un efecto benéfico en condiciones en las cuales el EO juega un papel importante en la progresión de diversas patologías como la obesidad y la DT2 (Colombani *et al.*, 2009).

Además que se demostró que la hidrólisis tienen un efecto en la actividad antioxidante de los polifenoles presentes en el nopal. Esto concuerda con el metabolismo de los mismos, ya que el aumento de la actividad antioxidante debido a los polifenoles ingeridos a partir de la dieta es mediada por la absorción de los

mismos a través de la barrera intestinal. Este proceso metabólico sucede sólo si los polifenoles son desglucosilados (Scalbert y Williamson, 2000), además que los polifenoles glucosilados presentan una disminución en la capacidad de donar hidrógeno y son menos eficaces para atrapar ER en comparación con sus formas libres (Williams *et al.*, 2004).

La cantidad de polifenoles (reportado en equivalentes de ácido gálico mg/L) del extracto de nopal hidrolizado fue mayor  $0.930 \pm 0.21$ , comparado con el extracto de nopal no hidrolizado  $0.328 \pm 0.06$ . A estos polifenoles libres se debe la actividad antioxidante del extracto ya que mediante método DPPH el  $IC_{50}$  del extracto hidrolizado fue de 0.33 mg/mL el cual es menor al valor obtenido para el extracto no hidrolizado que presentó un  $IC_{50}$  de 0.83 mg/mL. Debido a estos resultados se sugiere que la hidrólisis es un proceso que da una mayor eficiencia sobre la capacidad antioxidante.

El extracto de nopal hidrolizado presentó actividad de atrapamiento sobre diversas ER como  $OH^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$ ,  $O_2^{\bullet-}$  y HOCl. Sugiriendo que es buen atrapador de las especies  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$  y HOCl por la similitud de los  $IC_{50}$  con los atrapadores específicos de cada una de estas especies.

Estos resultados demuestran que el nopal posee actividad antioxidante directa debido a los compuestos polifenólicos que posee. Esta actividad antioxidante es conferida por la estructura química que presentan, como la presencia de un grupo dihidroxilado en el anillo B (formando un grupo catecol), el cual es capaz de donar fácilmente su hidrógeno (electrones) para estabilizar una ER, así como también la presencia de insaturaciones en las posiciones 2,3 conjugados con un el grupo 4-oxo- del anillo C permite la estabilización de su estructura a través de deslocalización de electrones, y la presencia de grupos funcionales que son capaces quelar metales de transición como el hierro y el cobre (Williams *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en diversos de estudios, por ejemplo los compuestos polifenólicos presentes en el vino tinto, han recibido considerable atención debido a su potencial actividad antioxidante (López-Vélez *et al.*, 2003), otras de las bebidas más populares del mundo a las que se han asociado al incremento de la actividad antioxidante debido a la presencia de polifenoles en su composición son el té y el café, estos alimentos contienen en particular flavonoides y ácidos fenólicos los cuales han presentado capacidad de atrapar diversas ER, a lo cual se asocia este efecto benéfico (Wang y Ho, 2009). Estos estudios incluyen la diversidad de alimentos que presentan actividad antioxidante. Con base en esto se realizó una comparación de la actividad antioxidante de un extracto de nopal con otros extractos de diferentes como café soluble, ajo y ciruela; siendo el café el que presenta mayor actividad y la ciruela con menor actividad, con ello se ubicó al nopal con una actividad antioxidante similar a la del ajo (determinado con el método ORAC). Esta comparación con los diferentes alimentos a los cuales se les han adjudicado propiedades antioxidantes (Pedraza- Chaverri *et al.*, 2006; Jacobo y Cisneros, 2009; Wang y Millner, 2009) permite tener un panorama acerca de la actividad antioxidante del nopal. Esta actividad antioxidante del nopal determinada *in vitro* se correlaciona con el efecto protector que ha demostrado el nopal en diferentes condiciones en las cuales está involucrado el EO, como efecto protector ante algunas patologías a nivel neuronal (Dok-Go *et al.*, 2003), ante el daño inducido por níquel (Hfaiedh *et al.*, 2008) y el daño hepático inducido por micotoxinas (Zourgui *et al.*, 2008), por ello este estudio tiene gran relevancia debido a que se demuestra la actividad antioxidante en estudios *in vitro* e *in vivo*. Una de las propiedades más importantes de una sustancia antioxidante es, que además de ser un buen atrapador de ER *in vitro*, también pueda llegar al sitio de acción en su forma activa y actuar *in vivo* y como consecuencia atenuar o prevenir la oxidación de biomoléculas.

También se estudió el efecto que produce el nopal en tejido hepático de ratas Zucker (*fa/fa*). Esta rata se ha utilizado para medir las especies reactivas que se producen al aumentar las concentraciones de insulina. El hígado es un órgano que desempeña un papel metabólico muy importante durante la obesidad. Este

tejido presenta una acumulación de lípidos, lo cual produce alteraciones en el metabolismo mitocondrial. Esta desregulación en la cadena respiratoria produce como consecuencia ER lo que contribuyen a la generación de EO en esta condición (Lockman *et al.*, 2012). En este modelo de obesidad, el EO además de un aumento en la producción de ERO, también se asocia con una disminución en la actividad de enzimas antioxidantes como CAT, GR, GPx, SOD1 y SOD2 comparado con animales sanos (Soltys *et al.*, 2001; Blakely *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004; Sabuhi *et al.*, 2011) estas enzimas desempeñan un papel importante en la defensa antioxidante celular.

Esta disminución en la actividad del sistema antioxidante endógeno podría ser contrarestanda por el consumo de antioxidantes, ya que se aminoran los daños causados por el exceso de ER. Por lo cual se sugiere que la actividad antioxidante del nopal ejercerá un efecto benéfico en este modelo patológico. La cantidad de ERO en grupos de ayuno control es mayor a la encontrada en grupos alimentados con nopal (3 y 4%) en la misma condición, resultados que se asocian a la disminución de lípidos oxidados (MDA) encontrado en los grupos alimentados con nopal. Podría sugerirse que el nopal presentó un efecto directo sobre las especies reactivas, lo cual se asocia a la disminución de lípidos oxidados en el tejido, y por lo tanto está disminuyendo el EO. En los grupos sometidos al consumo del nopal en la dieta se encontró una disminución en los marcadores de estrés oxidante, por lo que el nopal podría tener un papel terapéutico en esta condición. Además de los efectos benéficos que ha presentado el nopal como la actividad hipoglicémica (Muñoz de Chavéz *et al.*, 1995; Meckes y Roman, 1986), la actividad hipolipidémica (Fernández *et al.*, 1990; Fernández *et al.*, 1992; Fernández *et al.*, 1994; Budinsky *et al.*, 2001; Wolfran *et al.*, 2002), la actividad analgésica (Parck *et al.*, 1998) y la actividad anti-inflamatoria (Park *et al.*, 2001).

En el hígado de estos mismos animales se encontró que el nopal incrementa el ARNm de CAT, GR y SOD1 y sin embargo, la actividad de las enzimas no está asociada directamente con el comportamiento del ARNm. Estudios en diferentes modelos experimentales, han descrito que el incremento en la expresión de

enzimas antioxidantes no refleja incremento en la actividad de las mismas enzimas, lo cual podría sugerir que estas enzimas se regulan a nivel post-transcripcional (Shih *et al.*, 2004). En este contexto, las modificaciones post-transduccionales se generan mediante interacciones no-covalentes y/o la transformación de las uniones covalentes mediante fosforilación y acetilación (Aran *et al.*, 2009). Debido a los resultados en la actividad de las enzimas CAT, GR y SOD1 se puede sugerir que su actividad está determinada principalmente por la concentración de estas proteínas, las cuales a su vez están limitadas a la regulación en la síntesis de las mismas (Königsberg, 2007).

Los resultados anteriores permiten sugerir que el nopal presenta un efecto antioxidante directo al atrapar las ER y de esta manera disminuir la lipoperoxidación sin embargo no se puede atribuir un efecto indirecto ya que no se observó un aumento en la actividad de las enzimas CAT, GR, GPx, SOD total, aunque no hay que descartar la posibilidad de inducción de otras enzimas que pudieran tener efecto antioxidante.

El efecto directo también se observó en los sujetos sanos y pacientes ya que el consumo de 300 g de nopal aumentó significativamente la actividad antioxidante en diferentes fluidos como es el plasma, eritrocitos y sangre. El aumento más significativo fue en el plasma (20%) respecto a la dieta control. El resultado del incremento de la actividad antioxidante en el plasma puede deberse a que el tipo de polifenoles presentes en el nopal se asocian a la albúmina, la cual es una proteína presente en el plasma (Conquer *et al.*, 1998), sin embargo la actividad antioxidante puede provenir de los eritrocitos, ya que se muestran que los eritrocitos humanos no sólo tiene la capacidad de transportar oxígeno, sino también para enlazar a su superficie una gran variedad de polifenoles antioxidantes. Esta unión se debe a los grupos hidroxilo presente en la estructura química de los polifenoles, grupos que se unen electrostáticamente con los componentes de la superficie de la membrana de los eritrocitos (Bonarska-Kujawa *et al.*, 2012), formando complejos eritrocito-polifenol que los hace agentes antioxidantes más eficientes al poder atrapar diversas ER (Koren *et al.*, 2010).

El metabolismo de los polifenoles se ha estudiado anteriormente (Mizuma *et al.*, 1994) lo cual nos permite tener un panorama acerca de la ruta que seguirán estos para poder aportar los beneficios al ser consumidos. Se ha demostrado que el glúcido unido a los polifenoles puede jugar un papel en la absorción de los mismos, esto se comprueba en los estudios realizados por Mizuma y col. en los cuales se demuestra que la absorción de polifenoles glucosilados es mayor en intestino delgado de ratas. Los polifenoles son absorbidos como sus agliconas después de la hidrólisis previa de los glucósidos a lo largo del tracto digestivo, como el intestino delgado, las células epiteliales intestinales, el colon debido a la actividad bacteriana (Walle, 2004). Después de la digestión de estos compuestos pueden ser irrigados a la circulación, siendo así como presentan aumento de la actividad antioxidante en plasma.

El aumento de la actividad antioxidante del plasma de sujetos sanos debido al consumo de nopal, sugiere que podría producir un efecto benéfico en condiciones de enfermedad, como el desequilibrio producido por condiciones como disminución del sistema antioxidante endógeno o activación de vías pro-inflamatorias (Olinescu y Smith, 2002). Este mismo efecto se pudo observar en el plasma de pacientes con DT2 que consumieron nopal, esto tiene aún mayor beneficio debido a que la mayoría de las complicaciones en DT2 están asociadas al aumento del EO (Evans *et al.*, 2002, 2003), ya sea por la activación de vías que producen ER, por una disminución en el sistema antioxidante endógeno o por ambos (Wolff *et al.*, 1991; Young *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2004).

Los pacientes con DT2 que se sometieron a un desayuno alto en proteína suplementada con nopal. El desayuno alto en proteína de soya se administró a los pacientes con DT2 debido a los efectos benéficos sobre el metabolismo que esta proteína posee. En diversos estudios se ha demostrado que ratas con obesidad inducida por dieta, alimentadas con proteína de soya, se reduce la hiperinsulinemia (Noriega-López *et al.*, 2007). Se demostró que el consumo de proteína de soya en presencia de una dieta alta en grasa modula el metabolismo de lípidos en el tejido adiposo y el hígado de ratas (Torre-Villalvazo *et al.*, 2008),

además que se ha reportado que la proteína de soya implementada en diferentes estudios nutricionales en humanos y animales reduce tanto las lipoproteínas de suero como los triglicéridos, así como también el colesterol y los triglicéridos hepáticos (Torres *et al.*, 2006).

Otro efecto benéfico sumado al de la proteína de soya es el aumento observado en la actividad antioxidante debido al consumo de nopal. De esta manera, el efecto antioxidante del nopal tendría un efecto protector en las complicaciones de la DT2 asociadas al EO. Además, el nopal presente en la dieta de estos pacientes podría tener un efecto compensatorio en los fenómenos que se presentan en la diabetes como son: la disminución del sistema antioxidante endógeno, y con ello una probable disminución en la activación de vías sensibles a estrés oxidante tales como la formación de los AGE, el sorbitol, y la producción de moléculas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6) que causan daño celular y son los responsables de las complicaciones a largo plazo de la diabetes como: la nefropatía, la retinopatía, la neuropatía y el daño macro y microvascular (Evans *et al.*, 2002). Además, la activación de las mismas vías o similares parece mediar la resistencia a la insulina y la alteración en la secreción de insulina (Evans *et al.*, 2002).

## 8. PERSPECTIVAS

Coloquialmente se sabía que el nopal era una fuente de antioxidantes debido a los compuestos polifenólicos que presenta. Sin embargo hasta donde sabemos ningún estudio había demostrado esta característica, de ahí la importancia del presente estudio, donde se demuestra la actividad antioxidante del nopal en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*. El estudio *in vitro* del nopal proporciona información acerca la actividad atrapadora de este alimento hacia diversas ER, además se describe para cual de estar ER es más eficiente como atrapador. Un logro importante de esta investigación son los resultados obtenidos en el estudio *in vivo*, ya que se observó un incremento significativo en la actividad antioxidante del plasma de los seres humanos que consumieron nopal. Este alimento es tradicional en la cocina del pueblo mexicano, sin embargo estos resultados podrían hacer que el nopal tomara gran importancia en otros países, ya que el consumo de este alimento podría utilizarse de forma terapéutica en diversas patologías en las que se involucre el EO, como obesidad, arterioesclerosis y diversas enfermedades neurodegenerativas, en las cuales se podría determinar el efecto del nopal sobre marcadores de EO, activación de vías que intervengan en el mejoramiento de las mismas, así como también la disminución de complicaciones presentes en cada una de estas patologías. Dejando un campo de estudio muy amplio acerca de los mecanismos por los cuales el nopal puede presentar efectos benéficos.

## 9. CONCLUSIONES

*In vitro* el extracto de nopal presenta actividad antioxidante directa ya que atrapa diferentes especies reactivas como siguientes especies  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ,  $O_2^{\cdot -}$ ,  $HOCl$  y  $ONOO^-$ , lo cual es un gran hallazgo, ya que no se ha reportado esta actividad antioxidante en el nopal. Este extracto de nopal podría posteriormente utilizarse como posible compuesto de defensa antioxidante en cultivos celulares, a los cuales se les someta un daño que involucre la generación de especies reactivas. Sin embargo esta actividad antioxidante determinada en el extracto, no involucra al nopal como alimento, sólo a una parte de éste, por ello también se demostró *in vivo* en un modelo animal de obesidad que el consumo de nopal durante 7 semanas presenta actividad antioxidante directa en el hígado de ratas Zucker (*fa/fa*) al disminuir la cantidad de ERO lo cual se refleja en la disminución de marcadores de daño oxidante como el MDA, así como también se demostró que no presenta actividad antioxidante indirecta, ya que no induce la actividad de las enzimas antioxidantes.

Este efecto antioxidante debido al consumo del nopal, no sólo se presentó en el modelo animal, este efecto también se pudo evaluar en seres humanos, ya que se determinó un aumento (en plasma y eritrocitos) de la actividad antioxidante en los sujetos que consumieron nopal. Con base en los resultados del presente estudio se puede adjudicar al nopal como un alimento con actividad antioxidante, la cual es una propiedad que beneficia directamente al ser humano, ya que esta característica antioxidante podría tener relevancia a nivel farmacológico y nutrimental, debido a que el consumo de nopal puede utilizarse como estrategia ante las diversas complicaciones asociadas al EO presentes en la obesidad y en la DT2, las cuales forman parte de los principales problemas de salud pública de la población mexicana.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi H (1984). Catalase, *in vitro*. *Methods Enzymol* 105:121-126.
- Ali SF, LeBel CP, Bondy SC (1992). Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 13(3):637-648.
- Aran M, Mora S, Rimmaudo L, Wolosiuk R (2009). Reevaluación de los residuos cisteína en el señalamiento redox. *Revista Química Viva* Nú.3, año 8.
- Ayadi MA, Abdelmaksoud W, Ennouri M, Attia H (2009). Cladodes from *Opuntia ficus-indica* as a source of dietary fiber: effect on dough characteristics and cake making. *Ind Crops Prod* 30(1):40–47.
- Blakely S, Herbert A, Collins M, Jenkins M, Mitchell G, Grundel E, O'Neill KR, Khachik F (2003). Lutein interacts with ascorbic acid more frequently than with alpha-tocopherol to alter biomarkers of oxidative stress in female Zucker obese rats. *J Nutr* 133(9):2838-2844.
- Bravo L (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56 (11): 317-333.
- Bonarska-Kujawa D, Pruchnik H, Kleszczyńska H (2012). Interaction of selected anthocyanins with erythrocytes and liposome membranes. *Cell Mol Biol Lett*. En prensa.
- Borek C (2001). Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr* 131(3s):1010S-1015S.
- Budinsky A, Wolfram R, Oguogho A, Efthimiou Y, Stamatopoulos Y, Sinziger H (2001). Regular ingestion of *Opuntia robusta* lowers oxidation injury. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65(1):45-50.
- Cao G, Sofic E, Prior RL (1997). Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22(5):749-760.
- Cao G, Prior R. (1999). Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol* 299:50–62.
- Carlberg I, Mannervik B (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250(14):5475-5480.
- Chang W, Chung C, Wu Y, Su M (2004). The vascular and cardioprotective effects of liriodenine in ischemia-reperfusion injury via NO-dependent pathway. *Nitric Oxide* 11(4):307-315.

- Chomczynski P (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Bio techniques* 15(3): 532-537.
- Clapés S, Torres O, Companioni M, Villariño U, Broche F, Céspedes E (2001). Peroxidación lipídica y otros indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos. *Rev Cubana Invest Biomed* 20(2):93-98.
- Colombani AL, Carneiro L, Benani A, Galinier A, Jaillard T, Duparc T, Offer G, Lorsignol A, Magnan C, Casteilla L, Pénicaud L, Leloup C (2009). Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* 58(10):2189-2197.
- Conquer J, Maiani G, Azzini E, Raguzzini A, Holub B (1998). Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *J Nutr* 128(3):593-597.
- Crow JP (1997). Dichlorodihydrofluorescein and rhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* 1(2):145-157.
- Dinkova A, Talalay P (2008). Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 1:S128-138.
- Dok-Go H, Lee K, Kim H, Lee E, Lee J, Song Y, Lee Y, Jin C, Lee Y, Cho J (2003). Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res* 965(1-2):130-136.
- Evans J, Goldfine I, Maddux B, Grodsky G (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23(5):599-622.
- Evans J, Goldfine I, Maddux B, Grodsky G (2003). Perspectives in diabetes are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and  $\beta$ -Cell dysfunction?. *Diabetes* 52(1):1-8.
- Fernández M, Trejo A, McNamara D (1990). Pectin isolated from prickly pear (*Opuntia* sp.) modifies low density lipoprotein metabolism in cholesterol-fed guinea pigs. *J Nutr* 120(11):1283-1290.
- Fernández M, Trejo A, McNamara D (1992). Prickly pear (*Opuntia* sp.) pectin reverses low density lipoprotein receptor suppression induced by a hypercholesterolemic diet in guinea pigs. *J Nutr* 122(12):2330-2340.

- Fernández M, Trejo A, McNamara D (1994). Prickly pear (*Opuntia sp.*) pectin alters hepatic cholesterol metabolism without affecting cholesterol absorption in guinea pigs fed a hypercholesterolemic diet. *J Nutr* 124(6):817-824.
- Floriano- Sánchez E, Villanueva C, Medina-Campos O, Rocha, Sánchez D, Cárdenas N, Pedraza-Chaverri J (2006). Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxy nitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion, and hypochlorous acid and prevents in vivo tyrosine nitration in lung. *Free Radic Res* 40(5):523-533.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114(12):1752-1761.
- Galatro A, Rousseau I, Puntarulo S (2006). Análisis de la concentración en estado estacionario del radical ascorbilo en plántulas de soja determinado por espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica. *Phyton* (B. Aires) 75:7-20.
- Gentile C, Tesoriere L, Allegra M, Livrea M, D'Alessio P (2004). Antioxidant betalains que se transforma en glurfrom catus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Ann NY Acad Sci* 1028:481-486.
- Gerard D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze N, Yadan J, Acudiere J (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 11(10):1176-83.
- Gil M, Tomaä F, S-Barberaä N, Hess B, Kader A (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *J Agric Food Chem* 50(17):4976-4982.
- Gillespie K, Chae J, Ainsworth E (2007). Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. *Nat Protoc* 2(4):867-867.
- Ginestra G, Parker M Bennett R Robertson J, Mandalari G Narbad A, Locurto R, Bisignano G, Faulds, Waldron K (2009). Anatomical, Chemical, and Biochemical Characterization of Cladodes from Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *J Agric Food Chem* 57(21):10323-10330.
- Govindarajan R, Rastogi S, Vijayakumar M, Shirwaikar A, Rawat AK, Mehrotra S, Pushpangadan P (2003). Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biol Pharm Bull* 26(10):1424-1427.
- Halliwell B, Gutteridge J. (2007). *Free Radicals in biology and medicine*. 4<sup>o</sup> edition; Ed. Oxford University Press.

- Hansberg W (2002); *Biología de las especies de oxígeno reactivas; Mensaje Bioquímico Vol XXVI*. Depto Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, DF, México.
- Hfaiedh N, Allagui M, Hfaiedh M, Feki A, Zourgui L, Croute F (2008). Protective effect of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladode extract upon nickel-induced toxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 46(12):3759-3763.
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Prior R (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem* 50(16):4437-44.
- Jacobo D, Cisneros I (2009). Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: A new approach in data analysis for food and medicinal plants. *J Food Sci* 74(9):R107-113.
- Julkunen R (1985). Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *J Agric Food Chem* 33(2):213-217.
- Kaur H, Lyras L, Jenner P, Halliwell B (1998). Artefacts in HPLC detection of 3-nitrotyrosine in human brain tissue. *J Neurochem* 70(5):2220-2223.
- Königsberg M (2007). Nrf2: la historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica* (Universidad Autónoma de México) 26 (001):18-25.
- Koren E, Kohen R, Ginsburg I (2010). Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 235(6):689-699.
- Kumar D, Devasagayam T (2010). Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food Chem Toxicol* 48(12):3369-73.
- Kuti J (2009). Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chemistry* 85(4):527-533.
- Lawrence R, Burk R (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71(4):952-958.
- Leighton F, Urquiaga I. (2000). Polifenóles del vino y salud humana. *Antioxid calid vida* 7(27):5-13.

- Lockman KA, Baren JP, Pemberton CJ, Baghdadi H, Burgess KE, Plevris-Papaioannou N, Lee P, Howie F, Beckett G, Pryde A, Jaap AJ, Hayes PC, Filippi C, Plevris JN (2012). Oxidative stress rather than triglyceride accumulation is a determinant of mitochondrial dysfunction in in vitro models of hepatic cellular steatosis. *Liver Int* en prensa.
- López-Vélez M, Martínez-Martínez F, Del Valle-Ribes C (2003). The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43(3):233-244.
- Maldonado PD, Rivero-Cruz I, Mata R, Pedraza-Chaverrí J (2005). Antioxidant activity of A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum* (Geraniaceae). *J Agric Food Chem* 53(6):1996-2001.
- Mayer B, Mc Laughlin L (1981). Economic uses of *Opuntia*. *Cact Succ J* 53:107-112.
- Meckes M, Roman R (1986). *Opuntia streptacantha*, a coadjutor in the treatment of Diabetes mellitus. *Am J Chin Med* 14(3-4):116-118.
- Medina-Campos O, Barrera S, Segoviano D, Rocha M, Mendoza D, Pedraza-Chaverrí J (2007). S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK(1) cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food Chem Toxicol* 45(10):2030-2039.
- Miyamoto N, Izumi H, Miyamoto R, Kondo H, Tawara A, Sasaguri Y, Kohno K (2011). Quercetin induces the expression of peroxiredoxins 3 and 5 via the Nrf2/NRF1 transcription pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(2):1055-63.
- Mizuma T, Ohta K, Awazu S (1994). The beta-anomeric and glucose preferences of glucose transport carrier for intestinal active absorption of monosaccharide conjugates. *Biochim Biophys Acta* 1200(2):117-22.
- Muñoz M, Mazure R, Culebras J (2004). Revisión Obesidad y sistema inmune. *Nutr Hosp* 19(6): 319-324.
- Muñoz de Chávez M, Chávez A, Valles V, Roldán J (1995). The nopal: a plant of manifold qualities. *World Rev Nutr Dietetics* 77:109-134.
- Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimo T, Endo H. (1989). Isolation and characterization of the rat catalasa encoding gene. *Gene* 79(2):279-288.
- Noriega-López L, Tovar AR, Gonzalez-Granillo M, Hernández-Pando R, Escalante B, Santillán-Doherty P, Torres N (2007). Pancreatic insulin secretion in rats fed a soy protein high fat diet depends on the interaction between the amino acid pattern and isoflavones. *J Biol Chem* 282(28):20657-20666.

- Oberley L, Spitz D (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol* 105:457-464.
- Obrosova X, Greene C, Stevens M (1998). Diabetes-induced changes in lens antioxidant status, glucose utilization and energy metabolism: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Diabetologia* 41(12):1442-1450.
- O'Keefe J, Gheewala N, O'Keefe J (2008). Dietary Strategies for Improving Post-Prandial Glucose, Lipids, Inflammation, and Cardiovascular Health. *J Am Coll Cardiol* 51(3):249-255.
- Olinescu R, Smith T. (2002). Free Radicals in Medicine. Ed. Nova, New York.
- Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Avila R, Zúñiga-Bustos AB, Orozco-Ibarra M. (2006). Reactive oxygen species scavenging capacity of different cooked garlic preparations. *Life Sci* 78(7):761-770.
- Park E, Kahng J, Paek A (1998). Studies on the pharmacological actions of cactus: Identification of its anti-inflammatory effect. *Arch Pharm Res* 21(1):30-34.
- Park EH, Kahng JH, Lee SH, Shin KH (2001). An anti-inflammatory principle from cactus. *Fitoterapia* 72(3):288-290.
- Packer L, Cadenas E (2002). Handbook of Antioxidants (Oxidative Stress and Disease) 2o edition Ed. Marcel Dekker Inc.
- Packer L, Cadenas E (2007). Handbook of Antioxidants (Oxidative Stress and Disease) 3o edition Ed. Marcel Dekker Inc.
- Pannala A, Chan T, O'Brien P, Rice C (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 282(5):1161-1168.
- Peterson G (1979). Review of the Folin protein quantitation method of Lowry, Rosebrough. *Anal Biochem* 100(2):201-220.
- Qu X, Kirschenbaum L, Borish E (2000). Hydroxyterephthalate as a fluorescent probe for hydroxyl radicals: application to hair melanin. *Photochem Photobiol* 71(3):307-313.
- Rains J, Jain S (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 50(5):567-575.
- Rice C, Miller N, Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20(7):933-956.

- Rosen E, Spiegelman B (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444(7121):847-853.
- Rossoni-Júnior JV, Araújo GR, Pádua Bda C, Chaves MM, Pedrosa ML, Silva ME, Costa DC (2011). Annatto extract and  $\beta$ -carotene modulate the production of reactive oxygen species/nitric oxide in neutrophils from diabetic rats. *J Clin Biochem Nutr* 50(3):177-83.
- Sabuhi R, Ali Q, Asghar M, Al-Zamily NR, Hussain T (2011). Role of the angiotensin II AT2 receptor in inflammation and oxidative stress: opposing effects in lean and obese Zucker rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 300(3):F700-706.
- Sáenz C, Sepúlveda E, Matsuhira B (2004). *Opuntia* spp. mucilage's: a functional component with perspectives. *J Arid Environ* 57(3):275-290.
- Saito K, Jin D, Ogawa T, Muramoto K, Hatakeyama E, Yasuhara T, Nokihara K (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by combinatorial chemistry. *J Agric Food Chem* 51(12):3668-3674.
- Scalbert A, Williamson G (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130(8S Suppl):2073S-2085S.
- Shih A, Zhang S, Cao H, Boswell S, Wu Y, Tang H, Lennartz M, Davis F, Davis P, Lin H (2004). Inhibitory effect of epidermal growth factor on resveratrol-induced apoptosis in prostate cancer cells is mediated by protein kinase C- $\alpha$ . *Mol Cancer Ther* 3(11):1355-1364.
- Shivashankara A, Azmidah A, Haniadka R, Rai M, Arora R, Baliga M (2011). Dietary agents in the prevention of alcohol-induced hepatotoxicity: preclinical observations. *Food Funct* 3(2):101-109.
- Siriwardhana N, Shahidi F, Jeon Y (2006). Potential antioxidative effects of cactus pear fruit (*Opuntia ficus indica*) extract on radical scavenging and DNA damage reduction in human peripheral lymphocytes. *J Food Lipids* 13(4):445-458.
- Soltys K, Dikdan G, Koneru B (2001). Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology* 34(1):13-18.
- Stańczyk M, Gromadzińska J, Wasowicz W (2005). Roles of reactive oxygen species and selected antioxidants in regulation of cellular metabolism. *Int J Occup Med Environ Health* 18(1):15-26.
- Stintzing F, Carle R (2005). Cactus stems (*Opuntia spp*): A review on their chemistry, technology, and uses. *Mol Nutr Food Res* 49(2):175-194.

- Tesoriere L, Butera D, D'Arpa D, Gaudio F, Allegra M, Gentile C, Livrea M (2003). Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins. *Free Radic Res* 37(6):689-696.
- Tesoriere L, Butera D, Pintaudi A, Allegra M, Livrea M (2004). Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *Am J Clin Nutr* 80(2):391-395.
- Tesoriere L, Butera D, Allegra M, Fazzari M, Livrea M (2005). Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. *J Agric Food Chem* 53(4):1266-1270.
- Torre-Villalvazo I, Tovar AR, Ramos-Barragán VE, Cerbón-Cervantes MA, Torres N (2008). Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet. *J Nutr* 138(3):462-468.
- Torres N, Torre-Villalvazo I, Tovar AR (2006). Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *J Nutr Biochem* 17(6):365-373.
- Vassort G, Turan B (2010). Protective Role of Antioxidants in Diabetes-Induced Cardiac Dysfunction. *Cardiovasc Toxicol* 10(2):73-86.
- Venereo J (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* 31(2):126-133.
- Walle T (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 36(7):829-37.
- Wang S, Millner P. (2009). Effect of different cultural systems on antioxidant capacity, phenolic content, and fruit quality of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch). *J Agric Food Chem* 57(20):9651-9657.
- Wang Y, Ho CT (2009). Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. *J Agric Food Chem* 57(18):8109-8114.
- Waterman P, Mole S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. Oxford: Blackwell Scientific Press.
- Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 36(7):838-849.
- Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV (1991). Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 10(5):339-352.

- Wolfram R, Kritz H, Efthimiou Y, Stomatopoulos J, Sinzinger H (2002). Effect of prickly pear (*Opuntia robusta*) on glucose- and lipid- metabolism in nondiabetics with hyperlipidemia- A pilot study. *Wien Klin Wochenschr* 114(19-20):840-846.
- Yao P, Nussler A, Liu L, Hao L, Song F, Schirmeier A, Nussler N (2007). Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *J Hepatol* 47(2):253-2561.
- Young IS, Tate S, Lightbody JH, McMaster D, Trimble ER (1995). The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Radic Biol Med* 18(5):833-840.
- Zhang W, Go M (2011). Methoxylation of resveratrol: effects on induction of NAD(P)H quinone-oxidoreductase 1 (NQO1) activity and growth inhibitory properties. *Bioorg Med Chem Lett* 21(3):1032-1035.
- Zourgui L, El Golli E, Bouaziz C, Bacha H, Hassen W (2008). Cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes prevent oxidative damage induced by the mycotoxin zearalenone in Balb/C mice. *Food Chem Toxicol* 46(5):1817-1824.