



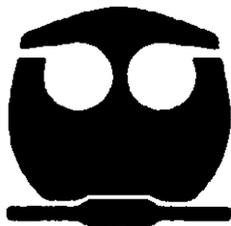
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EL NOPAL OPUNTIA FICUS INDICA Y SU EFECTO
REGULADOR DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN
UN MODELO VIVO**

**TESIS MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTAN
JACQUELINE CAPISTRÁN GARCÍA
MARÍA FERNANDA FLORES CASTRO**



MÉXICO, D.F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: **PROFESOR: LUCIA CORNEJO BARRERA**

VOCAL: **PROFESOR: HERMILO LEAL LARA**

SECRETARIO: **PROFESOR: GLADIS CORAL HINOSTROZA**

1ER SUPLENTE: **PROFESOR: JORGE ARTURO ABURTO ANELL**

2° SUPLENTE: **PROFESOR: MARIA DE LOS ANGELES VALDIVIA LOPEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN (INCMNSZ)**

ASESOR DEL TEMA: DRA. GLADIS CORAL HINOSTROZA

(NOMBRE Y FIRMA)

SUPERVISOR TÉCNICO: Q.F.B. MARGARITA DÍAZ MARTÍNEZ

(NOMBRE Y FIRMA)

SUSTENTANTES: JACQUELINE CAPISTRÁN GARCÍA

MARÍA FERNANDA FLORES CASTRO

(NOMBRES Y FIRMAS)

DEDICATORIAS

A mi papá, mi mamá, mi hermanito y mi hermanita. Grinchi y Borreguita, gracias por tanto esfuerzo y nunca darse por vencidos, por todos sus regaños, por sus consejos y por no dejarme caer. Cebi, gracias por tu comprensión, por siempre echarme porras y por todos tus consejos. Bebe, gracias por haber llegado en el momento adecuado. Gracias por su apoyo, por sus lágrimas y risas, por haberme escuchado cuando lo necesité, por su amor incondicional, pero sobre todo gracias por creer en mí desde el principio. Fueron la pieza más importante para que mi sueño se hiciera realidad. LOS AMO PEQUEÑOS.

A mis abuelos Eva y Salvador, gracias por su interés, por sus palabras de aliento y por sentirse orgullosos de mí. Los quiero mucho.

A mi familia GARCÍA. Ángel (gracias por todas tus llamadas), Beto, Lulú, Ana y Vero; gracias por siempre creer que lo podía lograr, por tantos consejos y tanto cariño. Karla, Kathya, Cucho, Irving, Gordito, Katys y Verito; gracias por ser mi relajación y por tantos momentos especiales.

A mi familia CAPISTRÁN. Mary, Vicente, Gabriel, Concha, Nacho, Jesús y Lucero; gracias por sus consejos. Huesos gracias por tus burradas, pero te gané!!!.

A Gladis y Rive gracias por su orientación y a pesar de que son primos muy muy pero muy lejanos siempre estuvieron ahí, gracias por su compañía.

A los QA's. Romy la sarcástica, Joss la indiscreta, Eri la más centrada, Javi mi preferido, Paochis, Mary, Lu, Lilichus, Cinderella, Eve; los quiero mucho amigos gracias por todos los momentos, buenos y malos, que pasamos juntos.

Ferchina gracias por todo tu apoyo, por tantos momentos de estrés y de diversión, por tus consejos y por ser mi psicoanalista!!!!. Te quiero mucho.

A los prepos 5. Gachuz, Josita, Gretel, Diana, Noe, Chelo, Emilio, Heri; por siempre estar en el momento que los necesite, por sus consejos y por muchos buenos momentos. Los adoro amigochos!!!!!!

Gracias a todos por formar parte de mi vida!!!! Los quiero mucho!!!!

Jacqueline

DEDICATORIAS

Especialmente a mis padres, Fernando y Nora, y a mi hermano David, GRACIAS, por todo el amor, comprensión, los consejos y el apoyo recibido durante mi vida, por ser mí guía en todos los aspectos y por formarme en la mujer y profesional que hasta el día de hoy soy. Siempre les estaré agradecida.

De ustedes es este logro, los amo.

A las familias Flores y Castro, por siempre estar presentes y apoyarme en toda mi vida especialmente en de cada uno de mis logros. De forma especial hago mención a mis Abuelos, Abuelitos y a la Familia Flores García, saben que siempre los llevo en mi corazón.

Gracias por todo, los quiero.

A mi mejor amigo Pablo Núriban Valero, GRACIAS por esta bellísima amistad, por el amor sincero, el apoyo que día a día me has dado, por compartir tu sabiduría, tus éxitos, en fin, gracias por ser la persona que vino a cambiar mi vida en muchos aspectos. Sigamos creciendo juntos, alcanzando nuestras metas y siendo felices.

Te quiero mucho Pablito.

A mis queridas amigas y QAs, Eva, Paola, Liliana, Dennys, Marysol, Lucero, Cindy, Jocelyn, Romina, Erika, Yaz, Myrna, y amigos David y Adrián, gracias por la genial y especial amistad y el apoyo que me brindaron a lo largo de la carrera y en especial a Jaky por ser mi cómplice, mi amiga a lo largo de esta gran aventura, y mi paciente favorita.

Los quiero mucho a todos.

A mis rositas Lupita, Lilia, Lidia, Laura Anahí, Pamela, Rosario; a mis adecos Sara, Gabriela, Luis Francisco, gracias por el apoyo brindado, el cariño y la amistad que nos ha unido por muchos años. No dejemos de soñar juntos y siendo grandes amigos.

Los quiero y gracias por estar conmigo.

Ferchis

AGRADECIMIENTOS

A la honorable Universidad Nacional Autónoma de México, y en especial a su Facultad de Química por darnos las herramientas y una inigualable formación académica. ORGULLOSAMENTE UNAM!!!!!!.

Al INCMNSZ por brindarnos las facilidades en el uso de sus instalaciones para la realización del proyecto.

A la Dra. Gladis Coral por su orientación, comprensión, cariño y apoyo durante todo este tiempo. GRACIAS DOCTORA.

A la QFB Margarita Díaz por su apoyo, por su cariño y por ser nuestra cómplice en todo momento. GRACIAS MAGGIE.

A Normita por disposición y cariño hacia nosotras. GRACIAS NORMIUX.

Al IQ José Landeros por su cariño, comprensión y tiempo; y por el apoyo en la parte estadística de la tesis. LO QUEREMOS PROFE.

Al MC Cristino Cruz por su tiempo, dedicación, paciencia, apoyo y cariño. GRACIAS TINO.

Al Dr. José Pedraza y al Dr. Antonio Díaz por compartir sus conocimientos con nosotras.

A nuestros amigos estudiantes con los que pasamos tanto tiempo en el INCMNSZ. LOS QUEREMOS MUCHO.

A todos los que hicieron posible que este sueño se cumpliera.

Muchas Gracias

Fer y Jaky

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
MARCO TEÓRICO	3
1. El nopal <i>Opuntia ficus-indica</i>	3
1.1 Generalidades	3
1.2 El nopal en México. Producción y distribución	5
1.3 Importancia económica del nopal	7
1.3.1 El nopal como alimento	8
1.3.2 Usos medicinales	8
1.3.3 Otras aplicaciones	9
1.4 Composición Química del Nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i>)	10
1.4.1 Aminoácidos, vitaminas y carotenos	10
1.4.2 Minerales, azúcares y ácidos orgánicos	12
1.4.3 Fibra dietética	13
1.4.4 Compuestos fenólicos	13
1.5 El nopal como fuente de antioxidantes y compuestos bioactivos	14
2. Flavonoides	15
2.1 Generalidades	15
2.2 Metabolismo y biodisponibilidad	16
3. Estrés Oxidativo	17
3.1 Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)	17
3.1.1 Fuentes generadoras de EROS	18
3.1.1.2 La mitocondria	18
3.1.1.3 Factores medioambientales	19
3.1.1.4 El estrés fisiológico	20
3.2 Antioxidantes	21

3.2.1 Antioxidantes enzimáticos	21
3.2.2 Antioxidantes no enzimáticos	22
3.2.3 Antioxidantes exógenos	22
3.2.3.1 Los flavonoides como antioxidantes	22
3.3 Medición del Estrés Oxidativo	23
3.3.1 Poder antioxidante en plasma	23
3.3.2 Daño en biomoléculas	24
3.3.3 Actividad antioxidante enzimática	25
3.3.4 Concentración de glucosa en plasma	25
3.3.5 Daño celular y de tejidos	26
4. El jerbo <i>Meriones unguiculatus</i> como modelo de estudio	26
4.1 Características generales	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
RESULTADOS	59
DISCUSIÓN	70
CONCLUSIONES	79
ABREVIATURAS	80
ANEXO I	82
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

RESUMEN

Opuntia ficus indica es la especie de nopal más ampliamente cultivada en México, y otras partes del mundo. Su uso corresponde a diferentes propósitos como alimento, forraje, y materia prima para la obtención de productos cosméticos. En México, es utilizado como alimento y remedio desde tiempos prehispánicos. Se tiene conocimiento de que, en particular, los tallos comestibles o “cladodios” de esta planta poseen compuestos bioactivos con capacidad antioxidante, antiinflamatoria y antiulcerogénica que le confieren propiedades benéficas en la prevención y/o protección contra trastornos en la salud. La información disponible respecto a los constituyentes activos del nopal *Opuntia ficus indica*, de la variedad Milpa Alta, y sus efectos bioquímicos *in vivo*, es aún escasa. El objetivo principal del presente estudio fue investigar el posible efecto regulador del tratamiento con un extracto acuoso de cladodios (*O. ficus indica* var. Milpa Alta), sobre el daño producido por estrés en el jerbo *Meriones unguiculatus*.

Previo al estudio *in vivo*, se determinó el contenido de polifenoles y flavonoides totales del extracto acuoso de nopal (EAN), y su capacidad antioxidante *in vitro*, frente a distintos radicales libres. El estudio *in vivo* se realizó aplicando en los animales estrés por inmersión en agua (24°C) por 4h, para inducir estrés oxidativo. 56 organismos fueron distribuidos equitativamente en 9 grupos: 4 asignados al tratamiento con EAN (T), con dosis orales de 2mg de flavonoides/día/100 g de peso corporal; 4 grupos control (C), con placebo; y 1 grupo basal (B). Un grupo de T y otro de C fueron dosificados 1h antes del estrés y sacrificados al término de éste (T0h y C0h); los otros 3 grupos de T y C, fueron dosificados durante 24, 48 y 96h, después del estrés (T24h, T48h, T96h y C24h, C48h, C96h, respectivamente). Los indicadores de estrés oxidativo determinados fueron: lipoperoxidación en plasma (por medición de malondialdehído, MDA), poder antioxidante del plasma (medición de la capacidad de reducción férrica, FRAP); contenido de glucosa en plasma (Glu), actividad de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD). Adicionalmente se examinó la

integridad de la mucosa gástrica, y en caso de daño, se determinó la frecuencia y área total de úlceras (mm^2). El contenido de polifenoles totales en el EAN fue de 14 ± 0.0007 mg equivalentes a ácido gálico (EAG) / g nopal peso seco, y la concentración de flavonoides de 3 ± 0.17 mg equivalentes a rutina (ER) / g nopal peso seco. En el ensayo *in vitro* se encontró que el EAN posee baja actividad secuestrante del radical sintético 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), que se incrementa con la concentración, para alcanzar un máximo de 8.07% a los $200\mu\text{g/mL}$; mientras que su capacidad de reducción férrica (FRAP) fue mayor, equivalente a 198.63 mmol de Trolox /mg EAN liofilizado. En el ensayo *in vivo* se demostró que el incremento de actividad de las enzimas GPx y SOD ocasionado por el estrés ($C_{0h}=0.172\text{U/mg prot.}$ y $C_{0h}=41\text{U/mg prot.}$, respectivamente), disminuye con el tratamiento de EAN ($T_{0h}= 0.152\text{U/mg prot.}$, y $T_{0h}=29\text{U/mg prot.}$, respectivamente), alcanzando los niveles normales (grupo basal) a las 96h. Los valores de MDA y FRAP no fueron modificados, ni por el estrés, ni por el tratamiento con EAN; mientras que los niveles de G en plasma disminuyeron un 50% en las primeras 24h, para incrementarse por encima del basal ($1.27\pm 0.31\text{g/L}$), a las 48 y 96h indistintamente en T y C. Al término del estrés, se observaron úlceras en la mucosa gástrica en 25 y 37.5% de animales de C 0h, y T 0h, respectivamente, manteniéndose evidentes hasta las 96h (25%) post-estrés. Se concluye que la administración de dosis orales de 2mg de flavonoides de EAN/día/100 g de peso corporal, modera los cambios de actividad enzimática en hígado producidos por el estrés, sin embargo, en las mediciones de G, MDA y FRAP en plasma, así como en el daño de la mucosa gástrica, no fue evidente un efecto similar.

MARCO TEÓRICO

1 *El nopal Opuntia ficus-indica*

1.1 *Generalidades*

El nopal es una planta que pertenece a la familia *Cactaceae*, género *Opuntia* y *Nopalea*, las cuales incluyen a un número aproximado de 1600 especies, agrupadas en 3 subfamilias: *Pereskioideae*, *Opuntioideae* y *Cactoideae* (Magloire, 2006). El nombre científico le fue asignado por Tournefort en 1700, por su semejanza con una planta espinosa que crecía en el poblado de *Opus* en Grecia (Scheinvar, 1999; Velásquez, 1998).

Se conocen casi 300 especies del género *Opuntia*. Sin embargo, hay solo 10 o 12 especies utilizadas para producción de fruta y nopalitos para la alimentación humana y forraje, además de favorecer el crecimiento de la grana o cochinilla que es un insecto que parasita las hojas del nopal y del cuál se obtiene un pigmento natural y ácido carmínico. Entre las especies cultivadas para producción de fruta están *Opuntia ficus-indica*, *O. amyclaea*, *O. xocconostle*, *O. megacantha* y *O. streptacantha* y como especies silvestres a *Opuntia hyptiacantha*, *O. leucotricha* y *O. robusta* (FAO, 2006).

Esta planta se desarrolla principalmente en zonas áridas, en suelos volcánicos, calcáreos, de textura franca, franco-arenosos, franco arenoso-arcillosos; con un pH de 6.5 a 8.5 y temperaturas que van desde los 0°C hasta los 35°C, con un intervalo de precipitación media anual de 150 a 800 mm (Revista SAGARPA, 2001).

Como toda planta superior, ésta posee flores, frutos, raíz, y tallos, provistos de areolas o partes vegetativas de donde emergen las espinas. Los tallos son aplanados, con forma de raqueta y tienen color verde porque en ellos se concentra la actividad fotosintética. Los tallos jóvenes se denominan técnicamente cladodios y constituyen los nopalitos, que junto con los frutos o tunas, conforman la parte comestible de la planta (Fig. 1) (Nobel *et al.*, 1992).

Figura 1. Cladodios del Nopal



Tomado de Torres (2010).

El nopal es endémico del continente Americano, y se puede encontrar desde Canadá hasta Chile y Argentina. Su origen se atribuye al altiplano de México (Puebla), en donde se han encontrado registros paleontológicos de frutos, semillas y fibras de pencas de 7,000 años de antigüedad. Debido a los viajes intercontinentales del hombre y a la gran adaptabilidad ecológica de la planta (silvestre o cultivable), su distribución se amplió a Europa, Asia, África y Oceanía. Hoy se puede encontrar en regiones como el Mediterráneo (Francia, Italia, Grecia, España, Turquía), Este Medio (Israel, Jordania, India), en África (Argelia, Egipto, Etiopía, Libia, Marruecos, Túnez, Angola y Sudáfrica), Corea y China (Magloire, 2006; FAO, 2006) (Fig. 2). La especie más ampliamente cultivada en distintas partes del mundo es *Opuntia ficus-indica*, y su uso corresponde a diferentes propósitos. En países como Brasil, Chile, Marruecos, E.U.A. y Túnez, es utilizada como forraje (fresco o ensilado) para ganado bovino, ovino y caprino, durante las sequías ya que transforma el agua en materia seca o energía digerible con mucha más eficiencia que los pastos y leguminosas, sin embargo, no proporciona una nutrición completa por lo que debe suministrarse con otros alimentos fibrosos (como paja y heno) y complementarse con nitrógeno (De la Rosa, 2001).

En México y algunas regiones de Italia, es empleado para consumo humano (Magloire, 2006).

Figura 2. Regiones a nivel mundial donde se produce el nopal *O. ficus-indica*



Tomado de Consejo Mexicano de Nopal y Tuna, A.C., México (2008)

1.2 El nopal en México. Producción y distribución.

El nombre propio original del nopal es *nopalli* y de la tuna *nochtli* (términos náhuatl). Los españoles renombraron al nopal con el nombre de chumbera y a la fruta como higo de Indias (FAO, 2006).

En México se cultiva muchas variedades de nopal pero la de mayor importancia es el género *Opuntia*. Las nopaleras cultivadas ocupan poco más de 210 mil Ha, de las cuales 144,398 Ha son utilizadas para forraje, cuyas ganancias equivalen a \$44,153.51 pesos M.N., 50,000 Ha para tuna; 12,018.41 Ha para producir nopalitos con ganancias equivalentes a \$1, 540,483.70 pesos M.N. y aproximadamente 100 Ha para producir grana de cochinilla (Flores *et al.* 1995, y SIAP, 2009).

Se calcula que en nuestro país existen 2,568 productores de nopal verdura, de los cuales el 48% son comuneros, 29% ejidatarios y el 23% pequeños propietarios (Flores *et al.*, 1995). Las regiones con mayor riqueza son el centro y norte del Altiplano, el Bajío, el Eje Neovolcánico y el valle de Tehuacán-Cuicatlán (CONABIO, 2008). El Distrito Federal, y particularmente la Delegación Milpa Alta,

aporta el 51% de la producción total en el país de acuerdo a Flores (1995) y SIAP (2009) (Tabla 1).

Tabla 1. Superficies cultivadas y producción total de nopal verdura en cada entidad federativa

Estado	Superficie Cultivada (Ha)	Producción (Ton)	Municipios mas importantes para el cultivo de Nopal
Distrito Federal	4,337	145,586	Delegación Milpa Alta
Morelos	3,255	101,770	Tlalnepantla
Puebla	178	160	Atlixco, Cholula y Acatzingo
San Luis Potosí	423	538	El municipio de San Luis Potosí y la zona de la Huasteca Potosina
Michoacán	308	3,288	Uruapan (en Ziracuaretiro y Taretan)
Tamaulipas	625	1,280	Xicoténcatl, Gómez Farías y Llera
Guanajuato	240	4,667	Salamanca
Baja California	706	99	Mexicali, Tijuana, Ensenada y Tecate
Jalisco	452	3,541	Lago de Chapala y Guadalajara
Oaxaca	118	586	Valles centrales
Edo. de México	736	21,065	Texcoco, San Martín de la Pirámides, Polotitlán, Coatepec Harinas
Aguascalientes	198	2,400	Región del Calvillo
Zacatecas	404	623	Desde Villanueva hasta Juchipila
Hidalgo	50	27	El Arenal
Tlaxcala	11	8	_____
Querétaro	34	146	_____
Durango	102	300	_____
Sonora	106	800	_____

Tomado de Flores (1995) y SIAP (2009)

1.3 Importancia económica del nopal

Los nativos de México ya conocían la importancia económica que les proveía el nopal, de allí que, su presencia en los registros impresos está fuertemente vinculada a la cultura e historia de nuestro país. En la región del altiplano es utilizado como alimento desde tiempos prehispánicos. Siendo éste el principal uso, en la actualidad se cultiva y se comercializa principalmente en las Entidades Federativas del centro del país. La especie más cultivada es *Opuntia ficus indica*, particularmente en las del altiplano de México (Tablas 1 y 2).

Tabla 2. Principales variedades cultivadas de nopal verdura

Variedad	Entidad de Producción	Especie
Milpa Alta	Distrito Federal, Morelos	<i>O. ficus-indica</i>
Atlixco	Puebla, Edo. de México	
Copena VI	Edo. de México, Baja California, S.L.P, Sonora, Hidalgo	
Copena FI	Edo. de México, Sonora, Baja California	
Moradilla	Edo. de México	
Blanco	Michoacán	
Negro	Michoacán, Guanajuato	
Blanco con espinas	Guanajuato	
Polotitlán	Edo. de México	
Tamazunchale	San Luis Potosí, Hidalgo	
Tapón (nopal silvestre)	San Luis Potosí, Zacatecas, Guanajuato, Durango, Aguascalientes, Jalisco, Querétaro	<i>O. robusta</i>

Tomado de Flores et al. (1995)

Otras especies que se producen en México son *O. Amyclaea*, *O. Streptacantha*, *O. Joconostle*, *O. Megacantha*, *O. Rastrera* y *O. Robusta*; muy apreciadas por su fruto o como forraje (Revista SAGARPA, 2001), y *O. ficus-indica* y *O. cochenillifera*, para la cría de cochinilla. De un total aproximado de 104 especies de *Opuntia*, y 10 de *Nopalea* clasificadas en México, 24 especies son utilizadas para usos diversos como fuente de cosméticos, artículos de limpieza, decoración, etc.

1.3.1 El nopal como alimento

Los nopales (cladodios y tunas) han sido una fuente alimenticia por cientos de años. Las culturas prehispánicas elaboraban miel, melcochas, queso de tuna, tunas pasas y vino con pulpa de tunas y pitahayas (FAO, 2006).

En la actualidad las tunas se consumen en fresco aunque también existen diversos productos procesados como mermeladas, helados, jugos, etc. Los cladodios tienen una gran aceptación por su bajo costo y sabor agradable, son usados en la cocina mexicana para diferentes platos cocidos y combinados con otros alimentos como huevos, chile, camarones, en salsas e, incluso se llega a utilizar como ingrediente en la bebida mexicana “Pulque”. Como vegetal se usa en ensaladas, sopas, guisos, asados, en fin, en una amplia gama de aplicaciones (Torres *et al.*, 2010). Otras presentaciones en las que se consume comúnmente son: en salmuera, escabeche, como dulces cristalizados, mermeladas, jaleas, edulcorantes, harinas y jugos concentrados.

1.3.2 Usos medicinales

Existen registros de que los aztecas bebían el jugo del nopal para bajar las fiebres, el mucílago (o baba) lo utilizaron para sanar erosiones en las manos y labios, las espinas para la limpieza de infecciones, las pencas completas las empleaban como compresa caliente para aliviar inflamaciones. La pulpa de la tuna la usaban en el tratamiento de diarrea y las semillas para aminorar el flujo menstrual, y la raíz, para el tratamiento de hernias, padecimientos del hígado y úlceras estomacales (Torres, 2010).

En los años 80's en México se realizaron investigaciones para demostrar las propiedades hipoglucémicas e hipocolesterolémicas en humanos con padecimientos de diabetes mellitus tipo II (Fрати Munari 1991,1992), resultados que estimularon el consumo más frecuente del nopal. Se afirma que refuerza al hígado y al páncreas mediante el incremento de la sensibilidad a la insulina, y la estimulación de la conversión de la glucosa en energía, regulando así el nivel de azúcar en la sangre (Torres *et al.*, 2010). Se cree también que dado a su alto contenido de fibras, su consumo disminuye el apetito produciendo en consecuencia un incremento en la excreción, reducción de peso, de grasa corporal, y de retención de líquidos (Torres, 2010).

Se sabe también que la fibra, en conjunto con el mucílago, protegen también a la mucosa gastrointestinal previniendo así las úlceras gástricas. Torres (2010), postula que el consumo de nopal promueve además la reducción del colesterol total, de triglicéridos y los niveles de LDL en sangre por medio del metabolismo de la grasa y de los ácidos grasos, así como de la eliminación de los ácidos biliares que convencionalmente se convierten en colesterol.

1.3.3 Otras aplicaciones

Durante la colonia se le encontraron diversas aplicaciones; se extraía un material mucilaginoso que servía de ligamento a los adobes en la construcción de las misiones, además el jugo de las pencas era extraído y untado en las ruedas de los carruajes para impedir que se quemaran por el uso excesivo (Torres, 2010).

Actualmente los cladodios son utilizados como materia prima para la industria de cosméticos, artículos de tocador, shampoo, jabón, protectores solares y cremas; como elemento decorativo (planta de ornato); por otro lado, el nopal alberga al insecto “cochinilla” (*Dactylopius coccus*), el cual al ser secado provee el ácido carmínico, también conocido como carmín rojo grana o colorante E-120 (Revista SAGARPA, 2001). Las pectinas extraídas son utilizadas ampliamente en la industria de alimentos como agentes hidrocoloides gelificantes. También es utilizado como cerco vivo en huertos y predios para el control de la desertificación (Habibi, 2009). De la cáscara y pulpa de la tuna se extraen las betalaínas que son

empleadas como colorantes naturales; además de obtener edulcorantes de los azúcares obtenidos de la pulpa (Magloire *et al.*, 2006).

1.4 Composición química del nopal (*Opuntia ficus-indica*)

En diferentes estudios realizados sobre la composición química del nopal se observa que los resultados varían mucho, en función del lugar del cultivo, la estación del año, el sitio de colecta, la edad y la parte de la planta (Magloire *et al.*, 2006). En la Tabla 3 se enlistan los principales componentes químicos de cladodios y de la tuna de esta especie.

Tabla 3. Composición química de los cladodios y la tuna del Nopal *Opuntia spp*

Componentes	Peso en nopal base seca	Peso en base húmeda	
		Nopal (g/100 g)	Pulpa de fruta (%)
Agua	-----	80-95	84-90
Carbohidratos	64-71	3-7	12-17
Cenizas	19-23	1-2	0.3-1
Fibra	18	1-2	0.02-3.15
Proteína	4-10	0.5-1	0.21-1.6
Lípidos	1-4	0.2	0.09-0.7

Tomado de Magloire et al. (2006)

El componente principal es el agua, siendo mayor su porcentaje en cladodios jóvenes que en maduros. Por su alto contenido de agua es suculento, característica que le confiere vulnerabilidad a la descomposición por microorganismos.

1.4.1 Aminoácidos, vitaminas y carotenos

Los cladodios frescos son buena fuente de estos compuestos como se puede observar en la Tabla 4:

Tabla 4. Aminoácidos libres, vitaminas y carotenos presentes en los cladodios de nopal *O. ficus-indica*

Aminoácidos	Concentración en base húmeda (mg/100g)
<i>Alanina</i>	0.6
<i>Arginina</i>	2.4
<i>Asparagina</i>	1.5
<i>Ácido Aspártico</i>	2.1
<i>Ácido Glutámico</i>	2.6
<i>Glutamina</i>	17.3
<i>Glicina</i>	0.5
<i>Histidina</i>	2.0
<i>Isoleucina</i>	1.9
<i>Leucina</i>	1.3
<i>Lisina</i>	2.5
<i>Metionina</i>	1.4
<i>Fenilalanina</i>	1.7
<i>Serina</i>	3.2
<i>Treonina</i>	2.0
<i>Tirosina</i>	0.7
<i>Triptófano</i>	0.5
<i>Valina</i>	3.7
Vitaminas y Carotenoides	Concentración en base húmeda (100g)
<i>Ácido ascórbico</i>	7-22 mg
<i>Niacina</i>	0.46 mg
<i>Riboflavina</i>	0.60 mg
<i>Tiamina</i>	0.14 mg
Carotenoides totales	11.3-53.5 µg

Tomado de Magloire et al. (2006).

En las tunas las vitaminas son componentes importantes. La vitamina E (tocoferol), el beta-caroteno, la pre-vitamina A y otros carotenoides, están presentes en las fracciones lipídicas de la pulpa y de las semillas. La vitamina C (ácido ascórbico) ocupa el tercer lugar en concentración en el fruto. Jaramillo *et al.* (2003), en una investigación sobre el contenido de carotenoides totales en cladodios frescos de *Opuntia ficus indica* de Milpa Alta, determinó la presencia de α -criptoxantina (18%), β -caroteno (36%) y luteína (46%), de un total de 231.8 mg/g peso seco.

1.4.2 Minerales, azúcares y ácidos orgánicos

El calcio es el mineral más importante en los cladodios, elemento que tiene un papel importante en la retención de agua de los tejidos ya que ayuda a formar geles estables al entrar en contacto con las pectinas. Este mineral se presenta en forma de precipitados insolubles de oxalato de calcio en la planta, compuesto que posee baja asimilación en el humano (Sáenz, 2000). Por otro lado, tanto la pulpa como las semillas del fruto presentan una gran cantidad de minerales en su composición, especialmente calcio, potasio y magnesio.

Tabla 5. Minerales presentes en el Nopal *Opuntia spp.*

Minerales	Concentración en peso fresco (g/100g)
Calcio	5.64
Magnesio	0.19
Potasio	2.35
Fósforo	0.15
Sodio	0.4
Hierro	0.14 μ g

Tomado de Magloire et al. (2006)

Un polisacárido que se encuentra contenido dentro de grandes células vesiculares de los parénquimas de la planta es el mucílago. Este compuesto es un biopolímero importante utilizado en la industria farmacéutica y alimentaria el cual se presenta a una concentración de 1-4 g/Kg (Medina-Torres, 2000). Nobel *et al.* (1992), sostienen que los azúcares componentes del mucílago de nopales O.

ficus-indica son 42% arabinosa, 22% de xilosa, galactosa, 8% de ácido galacturónico y 7% ramnosa, respecto a su peso molecular.

Los cladodios del nopal se caracterizan también por tener una alta concentración de ácido málico además de otros ácidos orgánicos como el ácido cítrico y minerales.

1.4.3 Fibra dietética

Un componente del nopal con efectos fisiológicos importantes en la alimentación humana es la fibra dietética. Sáenz (2000) determinó el contenido de fibra dietética total (43g/100g) en harina de cladodios con 7.14% de humedad, el cual está formado por 14.5g/100g de fibra dietética soluble y 28.5 g/100g como fibra dietética insoluble. Los componentes principales de la fibra dietética son la celulosa, hemicelulosa y lignina, así como las gomas y mucílagos, estos últimos con capacidad de absorber grandes cantidades de agua.

1.4.4 Compuestos fenólicos

Los polifenoles abarcan una gran variedad de compuestos que se dividen tomando como base sus diferencias estructurales, obteniendo así, distintas clases como son ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinámicos, antocianinas, proantocianidinas, flavonoides, flavonoles, flavones, flavonones, isoflavonas, estilbencenos y ligninas.

Son compuestos que poseen una estructura química adecuada para ejercer una acción antioxidante, pues pueden donar un átomo de hidrógeno o un electrón a un radical libre (Kumaran *et al.*, 2005), neutralizando así especies reactivas de oxígeno y/o capturando iones metálicos.

Stintzing (2005), sostiene que el contenido de compuestos fenólicos en los cladodios del nopal es de 8-9mg/100g peso húmedo. Por su parte Jaramillo (2003), en un estudio del nopal *O. ficus-indica* del estado de Hidalgo, determinó el contenido de polifenoles totales en cladodios es igual a 1.60 mg/g peso húmedo. De acuerdo a Arzate (2007) el contenido de polifenoles totales en un liofilizado de la var. Milpa Alta es de 31.32 mg/ g peso seco; mientras que el de flavonoides de 22.26mg/g peso seco. Según Ginestra *et al.* (2009), dentro del numeroso grupo de

compuestos fenólicos, los flavonoides: quercitina, kaempferol e isoramnitina, son los compuestos más abundantes en los cladodios de *O. ficus-indica*.

1.5 El nopal como fuente de antioxidantes y otros compuestos bioactivos

Dado a que el nopal es una planta consumida en pocos países, la investigación sobre el contenido de compuestos bioactivos, entre ellos los antioxidantes, es relativamente poca y reciente. Las sustancias antioxidantes más importantes en este recurso son probablemente los polifenoles y carotenoides. Entre los primeros, los componentes más frecuentes y abundantes son los flavonoides quercitina, kaemferol e isoramnetina (Ginestra *et al.*, 2009), mientras que entre los carotenoides se encuentran el β -caroteno y la luteína (Jaramillo, 2003).

La especie *Opuntia ficus indica* var. *Saboten* (variedad abundante en medio Oriente y países orientales), es hasta hoy la más estudiada con respecto a sus efectos farmacológicos. Se ha demostrado por ejemplo, que sus flavonoides poseen actividad secuestrante sobre los aniones superóxido e hidroxilo (Lee *et al.*, 2002). En esta misma especie Lee *et al.* (2006), probaron también la acción antioxidante en células microgliales activadas con lipolisacaridos bacterianos (LPS). El estudio demostró que el tratamiento con extracto de flavonoides inhibe la generación del radical peroxinitrito ($\bullet\text{ONOO}^-$), la síntesis de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), y la degradación de la proteína I-kB. En la opinión de Cho *et al.* (2006), los flavonoides quercetina 3-metil-éter, quercetina y dihidroquercetina, son los compuestos con mayor poder antioxidante.

Se tiene información que esta planta también posee compuestos bioactivos que participan en otros aspectos de la defensa antioxidante, como la actividad antiinflamatoria y antiulcerogénica. Park *et al.* (2001), demostraron que el principio activo antiinflamatorio es el β -sitosterol. Por su parte y en forma complementaria, Galati J., y Lee *et al.* (2001; 2002), afirman que los componentes polisacáridos del mucílago son los que le otorgan un carácter antiulcerogénico. Un estudio local en el que se investigó la acción específica del mucílago del nopal de Milpa Alta, en la cicatrización de úlceras gástricas inducidas por alcohol en ratas, es la investigación de Hernández-Muñoz *et al.* (2006). Los investigadores atribuyeron a

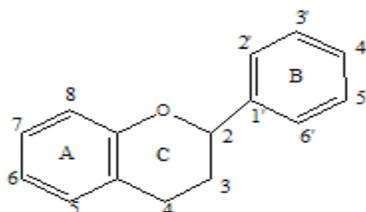
la interacción de los compuestos monosacáridos del mucílago con los fosfolípidos de la membrana celular de la mucosa gástrica, su capacidad para facilitar la reparación del tejido.

2. Flavonoides

2.1 Generalidades

Los flavonoides constituyen un extenso grupo de compuestos derivados del benzo- γ -pirano. Poseen varios grupos hidroxilos enlazados a estructuras anulares, $C_6-C_3-C_6$, designadas como A, B y C (Figura 3).

Figura 3. Estructura básica de los flavonoides



Flavonas = $R_4 = O$

Flavonoles = $R_3 = OH$; $R_4 = O$

Flavanonas = $R_3 = H$; $R_4 = O$

Flavanol = $R_3 = OH$; $R_4 = H$

Antocianidinas = $R_3 = OH$

Dependiendo del grado de oxidación y de sustitución del anillo pirano central pueden subdividirse en flavonas, flavonoles, flavononas, flavanoles, y antocianidinas. Estas moléculas pueden presentarse en forma libre o conjugada con azúcares formando glicósidos (Hollman y Katan, 1999). Su distribución es amplia en todas las plantas vasculares concentrándose principalmente en hojas, frutos, flores y semillas, a excepción de algunas raíces como el ajo y la cebolla. Por su acción protectora y por la imposibilidad de sintetizarlas en el organismo humano, éstos deben ser incorporados con los alimentos. A pesar de que la información sobre la cantidad diaria de ingestión de estos compuestos es imprecisa debido a los diferentes hábitos alimenticios de las poblaciones y a la información incompleta de su contenido en las plantas comestibles; se ha

estimado que la ingestión diaria de flavonoides en el hemisferio occidental ha sido estimada s de entre 0.5 y 1.0 g/día/adulto.

2.2 Metabolismo y biodisponibilidad

Por la acción protectora que se les atribuye a los flavonoides y por la imposibilidad de ser sintetizada en animales, estos compuestos deben ser incorporados con los alimentos en calidad de nutrimentos, sin embargo, el aprovechamiento eficiente de los mismos es variable debido a diversos factores como su composición molecular o una adecuada absorción para lo que es necesario que éstos compuestos se separen en su parte no polar o aglicona y su parte polar o glicósido.

Al respecto, Hollman y Katan (1999) afirman que los compuestos glicosidados de la quercitina de cebolla son mucho mejor absorbidos en humanos (52%) que las agliconas puras (24%) (flavonoide en forma libre). En un estudio realizado con polifenoles totales del té verde en ratas (Kohri *et al.*, 2001), determinaron que éstos son absorbidos en una proporción de 60-80%, de lo cual cerca del 3% son depositados en células de diferentes órganos (principalmente el tracto gastro intestinal) y de 20 al 40% pasa a colon sin ser absorbidos. Los compuestos no absorbidos parecen tener un papel protector en el colon, ya que se sabe que en dicho órgano los flavonoides pueden secuestrar las especies reactivas de oxígeno y radicales libres allí formados, o inhibir la actividad de las enzimas ciclooxigenasa y lipoxigenasa, implicadas en el desarrollo de cáncer de colon (Ikawa *et al.*, 1999). Por su parte Jovanovic *et al.* (2000), observaron que la mayor parte de flavonoides y catequinas ingeridas son excretadas por orina y heces sin haber sido absorbidas. Estos autores afirman que la concentración máxima en plasma y en órganos como el hígado se observó a las 0.5 h y a las 24 h, respectivamente, después de su administración, sufriendo transformaciones metabólicas en el hígado al ser convertidas en ácido benzoico por conjugarse con otros compuestos.

La excreción es por dos vías, los hidrosolubles, se excretan por las vías urinarias con la orina (como la catequina), y los no hidrosolubles, se excretan junto con la bilis al duodeno (como la quercitina).

3. Estrés Oxidativo

Todos los organismos vivos mantienen un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes. La pérdida en este balance de óxido-reducción lleva a un estado bioquímico denominado estrés oxidativo, que se caracteriza por un aumento en la concentración de radicales libres y especies reactivas, incapaces de ser controlados por los sistemas de defensa antioxidantes.

La alteración del balance entre pro-oxidantes y antioxidantes, puede tener diversos grados de magnitud. En el estrés oxidativo leve, las defensas antioxidantes bastan para restablecer dicho balance, pero en el estrés oxidativo grave se llega a alteraciones en el metabolismo celular, daño al ADN, aumento de la concentración de calcio intracelular, daño a los transportadores de iones y proteínas específicas en la membrana así como peroxidación lipídica. El daño por estrés oxidativo, puede ser reversible o irreversible (Dorado, 2003). Las evidencias científicas de los últimos años sugieren que este desequilibrio bioquímico puede causar daño y muerte celular; así como desórdenes patológicos como neurodegeneración, cáncer, inflamación crónica, aterosclerosis, diabetes, obesidad, entre otros (Balz, 1999).

3.1 Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)

Las especies reactivas de oxígeno (EROs), son compuestos derivados del oxígeno molecular (O_2) después de haber sufrido una reducción química parcial, presentando así electrones desapareados, los que llevan a la producción de las especies reactivas más peligrosas como el radical superóxido ($\bullet O_2^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet OH^-$), que son generadas en presencia de metales de transición y oxígeno (Dorado *et al.*, 2003).

El radical superóxido ($\bullet O_2^-$) generado cuando el O_2 es reducido al perder un electrón; es la primera especie producida en muchas cascadas biológicas oxidantes. Este compuesto es sólo moderadamente reactivo con la mayoría de los compuestos biológicos, pero en solución acuosa reacciona rápidamente para

formar la siguiente especie reactiva. El radical superóxido es generado en las mitocondrias (como producto de la respiración) y en los fagocitos (para protección).

Por su parte, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado cuando el O_2 es reducido con dos electrones; reacciona con iones metálicos reducidos (como hierro o cobre) para formar otra especie más reactiva.

Finalmente el radical hidroxilo ($\bullet OH$) es claramente la especie más peligrosa y dañina generada durante el estrés oxidativo debido a que tiene una gran facilidad para reaccionar con los compuestos orgánicos (Alessio, 2006).

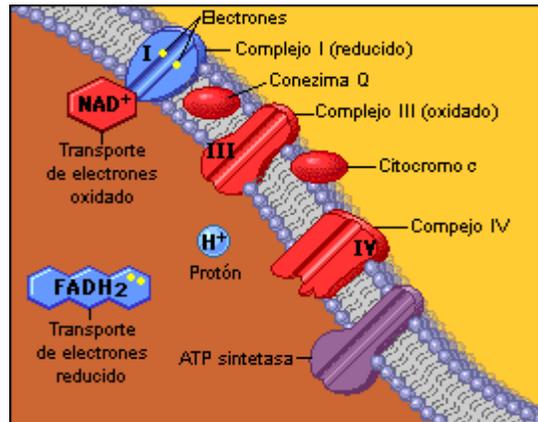
Por otro lado, las EROs desempeñan también funciones benéficas en los organismos participando por ejemplo en los sistemas de señalización celular, los cuales se refieren a la liberación de sustancias por parte de la célula para transmitir información a otras células involucradas en la detección, síntesis y/o regulación de moléculas (Alessio, 2006). Se ha encontrado que niveles bajos de EROs estimulan la proliferación celular y activan genes específicos. Igualmente se sabe que dichas especies pueden activar al factor de transcripción nuclear NF κ B, el cual juega un papel fundamental en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria. En la comunicación célula-célula, actúan como mensajeros celulares, activan la expresión de la adenilato ciclasa, y también activan a las proteínas reguladoras de Fe^{+2} (transferrina y ferritina) (Dorado *et al.*, 2003).

3.1.1 Fuentes generadoras de EROs

3.1.1.2 La mitocondria

Se ha propuesto a la mitocondria como la fuente de EROs más importante en células; pues paralelamente a la reducción enzimática del O_2 hasta H_2O por la citocromo oxidasa en la cadena de transporte de electrones (Fig. 4), tiene lugar la reducción eventual no enzimática, de un electrón del O_2 , generando el anión superóxido ($\bullet O_2^-$).

Figura 4. Transporte de electrones



Fuente: Tornero et al., (2002)

Esta reacción resulta inevitable debido a que los transportadores de electrones que intervienen en la cadena son muy reactivos y con un potencial redox negativo, como es el caso de la flavina (complejo I) y la ubiquinona (complejo III).

En algunos casos, hasta un 4% del O_2 total consumido por la cadena de transporte de electrones puede ser transformado hasta $\cdot\text{O}_2^-$ por la coenzima Q (Halliwell, 1996). Es más, en condiciones donde los niveles de adenosín difosfato (ADP) se encuentran disminuidos (como sucede con el tratamiento con inhibidores de los diferentes complejos de la cadena de transporte de electrones como la antimicina A) la producción del ión superóxido se ve aumentada (Tornero *et al.*, 2002).

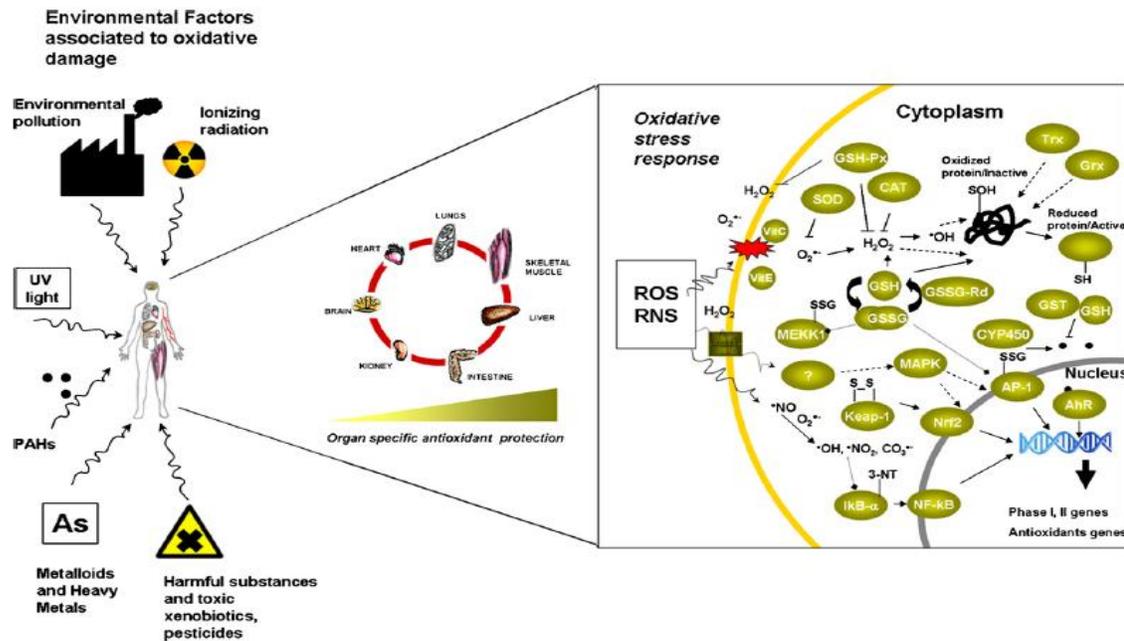
Así mismo el escape de EROs desde la mitocondria hacia el citoplasma aumenta conforme la célula envejece pues progresivamente la función y la integridad de esta se ve dañada. Por lo tanto, el aumento de la actividad mitocondrial en sí puede generar un estrés oxidativo a las células (García, 2006).

3.1.1.3 Factores medioambientales

Otra fuente de EROs que se suma a los endógenos corresponde a los factores del medio ambiente, algunos controlables como la dieta, el estilo de vida, y otros sobre las que no tenemos control directo como la radiación ionizante, metales pesados, pesticidas, hidrocarburos halogenados aromáticos y policíclicos,

contaminantes atmosféricos, etc. En la figura 5 se expone las principales fuentes externas promotoras de formación de EROs que afectan a los diferentes organismos vivos y la activación de rutas de señalización como respuesta al estrés oxidativo (Limón-Pacheco *et al.*, 2009).

Figura 5. Fuentes externas promotoras de formación de EROs



Tomado de Limón-Pacheco *et al.*, (2009)

3.1.1.4 El estrés fisiológico

Cuando un organismo percibe un estímulo “estresante” (estímulo nocivo que provoca temor, ansiedad o inquietud), ocurren cambios fisiológicos en su organismo para enfrentar el problema (Wingfield *et al.*, 1997).

La respuesta al estrés consiste en cambios biológicos y fisiológicos y se caracteriza por la activación del sistema nervioso simpático (SNS) y el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). Diversos estudios han comprobado que el estrés crónico se relaciona con una mala salud física y en gran medida está asociado al incremento de la oxidación y la alteración en los niveles hormonales y sus efectos subsecuentes en el sistema inmunológico.

La activación del SNS resulta en cambios fisiológicos inespecíficos incluyendo la liberación de norepinefrina (NE) vía nervio simpático y epinefrina (E) por la

glándula adrenal la cual afecta muchos órganos del cuerpo .La NE tiene gran afinidad por los receptores α -adrenogénicos; mientras que, la E se une a los receptores β -adrenérgicos. La activación de los sistemas α -adrenérgicos en los sistemas arteriales generalmente causan constricción y aumento de la resistencia periférica y de la presión sanguínea diastólica; mientras que la unión del receptor β -adrenérgico incrementan el volumen cardíaco y la presión sanguínea diastólica.

El eje HPA, cuando es activado por efecto del estrés, causa la liberación de la hormona de liberación corticotrópica (HLC) del hipotálamo. La HLC actúa sobre la glándula pituitaria estimulándola a liberar la hormona adenocorticotrópica (HACT) que viaja a la glándula adrenal promoviendo la liberación de los glucocorticoides, cortisol primario en humanos y en mamíferos (Eggenberg, 2006).

Recientemente se ha considerado que el estrés juega un rol muy importante en la activación de la respuesta inflamatoria. Investigaciones en citocinas sugieren que el estrés crónico podría incrementar la circulación de cinasas pro-inflamatorias tales como IL-6, IL-1 β , TNF- α y otros marcadores de inflamación tales como la proteína C reactiva (Eggenberg, 2006).

3.2 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que cuando están presentes en cantidades fisiológicas retardan o inhiben la oxidación de sustratos susceptibles al ataque de las EROs (Lima, 2001). Pueden actuar directamente secuestrando radicales libres, manteniendo la actividad de las enzimas antioxidantes, o inhibiendo la actividad de enzimas oxidantes (Abd Ellah *et al.*, 2007).

Se agrupan en antioxidantes endógenos los cuales pueden ser enzimáticos y no enzimáticos, y antioxidantes exógenos.

3.2.1 Antioxidantes enzimáticos

Estos se encuentran dentro del organismo e impiden la formación de radicales libres a partir de otras moléculas; si los radicales libres ya existen, estos antioxidantes se encargan de convertirlos en moléculas menos dañinas para el organismo. Ejemplos de estos antioxidantes comprenden la superóxido dismutasa

(SOD), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR) y catalasa (CAT) (Dorado *et al.*, 2003).

3.2.2 Antioxidantes no enzimáticos

Son aquellos compuestos que donan sus electrones a los radicales libres, neutralizándolos y evitando reacciones en cadena. Dada a la gran movilidad de sus otros electrones, los antioxidantes no enzimáticos generalmente no se convierten en radicales libres, o simplemente son radicales libres no reactivos.

Los antioxidantes no enzimáticos comprenden moléculas como el glutatión (GSH), el ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno o provitamina A, vitamina E (α -tocoferol), y proteínas transportadoras de metales como la ferritina (Dorado *et al.*, 2003).

3.2.3 Antioxidantes exógenos

Los antioxidantes exógenos ingresan a los sistemas vivos a través de la cadena alimenticia, de allí que desde el punto de vista práctico, éstos son los más importantes, ya que son los únicos que pueden ser incorporados en el alimento. Estos compuestos proceden principalmente de las plantas en forma de compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes, los tocoferoles, tocotrienoles), ácido ascórbico, y carotenoides, siendo los polifenoles los más abundantes en la dieta actual (Schwedhelm, 2003).

3.2.3.1 Los flavonoides como antioxidantes

Los flavonoides poseen excelentes propiedades de quelación de iones metálicos de transición como el hierro, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Morel *et al.*, 1993). Poseen además habilidad para secuestrar radicales libres, principalmente los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica (Jovanovic *et al.*, 2000). Otros autores refieren su capacidad de inhibir oxidases como la lipoxigenasa, la ciclooxigenasa, la mieloperoxidasa, la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa, evitando la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) *in vivo* (Ferrandiz *et al.*, 1991) y de hidroperóxidos. También se sabe que inhiben las enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos como

la fosfolipasa A₂ (Lindahl y Tagesson, 1997), y estimulan otras con propiedades antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa (Sudheesh *et al.*, 1999). Por lo que refieren Ratty y Das (1988), los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' del anillo B, son más activos como antioxidantes, actividad que puede ser mayor cuando existe un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3, y un grupo carbonilo en la posición 4. Dicha estructura caracteriza a la quercitina, un flavonoide abundante en la mayoría de los vegetales comestibles. Los investigadores antes mencionados así como Noroozi *et al.* (1998), señalan que los flavonoides en su forma libre (agliconas) son antioxidantes más potentes que sus correspondientes conjugados (glicósidos), aunque a tal respecto no existe un criterio unificado.

3.3 Medición del Estrés Oxidativo

Se han propuesto muchos marcadores biológicos para evaluar el estrés oxidativo, los cuales permiten determinar parcialmente el daño mediado por las EROs o la generación de estas ocurrido *in vivo*. Entre estos marcadores se incluyen la medición del poder antioxidante, medidos en el plasma o fluidos corporales, mediciones de biomoléculas oxidadas (lípidos, proteínas y ADN), y la medición de los mecanismos antioxidantes enzimáticos como la actividad de las enzimas SOD, GPx y CAT (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2004).

3.3.1 Poder antioxidante en plasma

Las técnicas desarrolladas para medir la capacidad antioxidante total de las muestras biológicas valoran la habilidad de los compuestos donantes de un H⁺ o un electrón para oxidar las especies introducidas en el sistema de ensayo, por lo que son clasificados como métodos de inhibición o indirectos del poder antioxidante total. Otra forma de medir al sistema antioxidante es a través de la medición de la concentración de las vitaminas antioxidantes (A,C,E), los minerales selenio (Se) y zinc (Zn), el glutatión (GSH) y la razón glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) (García, 2006).

3.3.2 Daño en biomoléculas

La peroxidación lipídica (LPO), entendida como la oxidación de lípidos poliinsaturados de las membranas celulares, produciendo hidroperóxidos, es probablemente el proceso generado por las EROs más ampliamente investigado, y por lo tanto, medido. Los hidroperóxidos se descomponen transformándose rápidamente en una variedad de sub-productos que incluyen: dienos conjugados, alcanos (etano y pentano), productos aldehídicos (malondialdehído, n-aldehídos y aldehídos α,β -insaturados) e isoprostanos; todos ellos utilizados como indicadores en la medición de estrés oxidativo y medibles por procedimientos que van desde los espectrofotométricos hasta la cromatografía de alta resolución (HPLC), o de gases (CG) (Esterbauer, 1989).

El procedimiento más comúnmente utilizado en tejidos y fluidos de organismos es la medición del malondialdehído (MDA) acoplado al ácido tiobarbitúrico (TBA), el cual puede medirse espectrofotométricamente a 532 nm, por fluorescencia a 553 nm o por HPLC (Alessio, 2006). Esta técnica, aunque con algunas limitaciones, es fácil y rápida, por lo que se utiliza como el método de elección en estudios epidemiológicos.

Las proteínas también sufren modificaciones por efecto de las EROs, debido a la susceptibilidad de sus residuos de aminoácidos, los cuales sufren ataques por radicales $\cdot\text{OH}$ produciéndose una oxidación y formándose en consecuencia proteínas carboniladas. Los cationes del ciclo redox como el Fe^{2+} o Cu^{2+} pueden unirse a cationes en los sitios de unión de las proteínas, y con ayuda de nuevos ataques por H_2O_2 u $\cdot\text{O}_2^-$, pueden transformar grupos amina de cadena lateral en varios aminoácidos (por ejemplo lisina, arginina, prolina o histidina) en carbonilos (Reznick, 1992). Esta medición se puede hacer de forma directa, o con inmunoensayos, sin embargo por ser una técnica no selectiva, en muchos estudios se prefiere la determinación de aminoácidos modificados como la nitrotirosina (Alessio, 2006).

El ADN es otra molécula que no está exenta del proceso oxidativo. El principal agente lesivo es el radical hidroxilo que dañan directamente las cadenas de ADN

originando su fragmentación en un primer momento, posteriormente modifican las bases nitrogenadas que van a ser incorporadas al ADN, dando lugar a la deoxiguanosina, capaz de provocar importantes mutaciones (García, 2006).

3.3.3. Actividad antioxidante enzimática

Los resultados de diferentes estudios muestran que los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes pueden ser modificadas frente al estrés oxidativo por lo que su medición puede ser utilizada como marcador indirecto (Pihan *et al.*, 1987). En el presente documento se hace mención de la SOD y la GPx por ser las únicas enzimas que fueron valoradas. En la determinación de la actividad de la SOD se emplea con mayor frecuencia un medio en el cual se genera $\bullet\text{O}_2^-$ con la enzima xantina oxidasa (XO) a partir del sustrato xantina y la SOD compite con un colorante indicador (INT) por el $\bullet\text{O}_2^-$. Una unidad de SOD se define como la cantidad necesaria para presentar el 50% de dismutación del radical superóxido (Limón- Pacheco, 2009).

La acción de la GPx puede ser valorada de diferentes maneras, ya sea midiendo la liberación de glutatión oxidado (GSSG) o por acción de la enzima sobre un hidroperóxido orgánico en presencia de H_2O_2 (Abd Ellah *et al.*, 2007).

3.3.4 Concentración de glucosa en sangre

El transporte de glucosa es una cascada de eventos que comienza con la interacción de la insulina con su receptor y finaliza con el metabolismo de la glucosa intracelular. En este proceso es posible que el estrés oxidativo influya ya que existe evidencia de que la presencia de una elevada concentración de radicales libres en plasma disminuye la acción de la insulina, lo que contribuye a la generación de hiperglicemia.

Existen evidencias de que el incremento de EROs podría generar modificaciones en los receptores (Ceriello, 2000), además de causar daños en la expresión del gen de la insulina como respuesta a la pérdida de al menos dos de sus factores de transcripción (PDX-1 y RIPE 3b1 ó Mafa), lo que acelera el proceso de apoptosis. Robertson (2004), sometió isletas pancreáticas de células beta de ratas ZDF (por sus siglas en inglés Zucker Diabetic Fatty) a distintas

concentraciones de glucosa (16.7 mM, 5.5 mM y 5mM), obteniendo como resultados que las isletas sometidas a la concentración más alta sobreexpresaron diversos genes apoptóticos.

3.3.5 Daño celular y de tejidos

La alteración de la integridad tisular y celular es un excelente marcador de que hubo un daño generado por el estrés, el cual da inicio de una serie compleja de eventos, es decir, incluyen la inflamación aguda, la formación de tejido de granulación, la recuperación del tejido conectivo, colagenización etc. (Schaffer y Nanney, 1996) los cuales se dan en la profundidad de la lesión.

En el caso particular del estrés agudo por inmersión en agua (WIRS), se ha demostrado que los niveles de la citocina IL-18 aumentan rápidamente en suero y estómago; en éste último tejido, aumenta la histamina gástrica, quien modula la respuesta inmune y activa a los receptores H2 desarrollando secreción excesiva de ácido gástrico y formando lesiones agudas en la mucosa gástrica como resultado del estrés generado (Seino *et al.*, 2007).

4. El jerbo Meriones unguiculatus como modelo de estudio

Los animales más utilizados en experimentación y en particular para el estudio del estrés oxidativo son el ratón y la rata. El primero, tiene características preferidas por los investigadores como buena adaptación en bioterios, mantenimiento sencillo y económico, de fácil manejo, etc., seguido por la rata con características semejantes (Pérez, 2007). Otro roedor incorporado posteriormente sobre todo a la investigación clínica es el jerbo de Mongolia *Meriones unguiculatus* (Fig. 6).

Figura 6. Jerbo (*Meriones unguiculatus*)



4.1 Características generales

El jerbo de Mongolia, *Meriones unguiculatus*, es del orden Rodentia, suborden Myomorpha y la familia Cricetidae, de la misma familia que el hámster. Es también conocido como rata del desierto, es nativo de China y Mongolia. El color más común es la guatusa: beige claro, con una mezcla de blanco, amarillo y negro, dando un color general de pelaje marrón. También pueden ser de color negro, gris, blanco o harinoso. Se caracterizan por una larga cola, completamente cubiertas de pelo, fuertes patas delanteras para cavar, y las posteriores usadas para saltar y para el mantenimiento de la postura erecta. El cuerpo y la cola son cada uno de unos 11-15 centímetros de longitud, con el cuerpo ligeramente más largo que la cola y los adultos llegan a pesar entre 70-150 gramos.

Uno de los primeros usos del jerbo en la investigación fue en los estudios de la radiación, debido a que pueden tolerar más la exposición del cuerpo entero a la radiación que otras especies animales. También ha sido utilizado en los estudios del metabolismo de la glándula endócrina. Estos animales muestran alta incidencia de convulsiones epileptiformes espontáneas, por asustarse o por encontrarse en un ambiente nuevo, lo cual los convierte en un modelo animal idóneo para investigación neurológica, particularmente, el estudio de la epilepsia, y estudios de estrés por isquemia/reperfusión cerebral. Son importantes en la investigación de patologías gástricas asociadas a infección por *Helicobacter pylori*, así como estudios del metabolismo de lípidos y enfermedades del corazón. También son útiles en la investigación de enfermedades infecciosas y en la investigación de parasitología (Wagner, 1999). Adicionalmente estos animales también son utilizados en investigaciones toxicológicas de aditivos alimentarios, plaguicidas, solventes industriales y metales pesados.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el transcurso de los últimos años, el nopal ha atraído la atención de un importante número de científicos y especialistas en medicina que se han interesado en las múltiples propiedades nutritivas y curativas que presenta, lo que ha dado lugar a diferentes investigaciones principalmente en el extranjero.

En México, el nopal *Opuntia ficus indica*, es un recurso natural utilizado como alimento y medicamento desde épocas prehispánicas, sin embargo, existe poca información científica sobre las bases bioquímicas de su modo de acción por ello el propósito de esta investigación es estudiar el posible efecto preventivo y curativo de la suplementación del alimento con un extracto de nopal *Opuntia ficus indica* vari. Milpa Alta (EAN), sobre el daño oxidativo inducido por estrés, en el jerbo *Meriones unguiculatus*.

JUSTIFICACIÓN

El nopal *Opuntia ficus indica*, es un recurso muy utilizado en la alimentación mexicana. El consumo per cápita a nivel nacional es de 6.4 5.75 kg/año, pero llega a 8 kg en el centro del país, 5kg en el norte y 4.5 kg en el sur, según el Consejo Mexicano de Nopal y Tuna (CoMeNTuna).

Más allá de su potencial alimenticio, al nopal se le han atribuido diversas propiedades curativas que aún son objeto de estudio; las cuales se relacionan con su alto contenido de compuestos bioactivos como polifenoles (principalmente flavonoides), vitamina C, tocoferoles, etc., presentes en los residuos frescos de nopal. Por ello, es importante recalcar, que estudios como éste permitirán incrementar en gran medida el conocimiento de la planta, su uso con los consecuentes beneficios del cultivo y utilización de dicho recurso, tanto para el rubro nutricional, así como para el comercial de la investigación en nuestro país.

HIPÓTESIS

Teniendo en consideración los antecedentes científicos sobre el efecto antioxidante *in vitro* de los extractos de nopal de *O. ficus-indica* de otras localidades fuera de México, se postula como hipótesis de la presente investigación, que el extracto de cladodios del nopal *O. ficus indica*, de Milpa Alta, posee compuestos bioactivos que puedan actuar como antioxidantes no enzimáticos, y asistir en la defensa antioxidante del jerbo en condición de estrés oxidativo.

OBJETIVO GENERAL

- Investigar si la administración de un extracto de nopal (*O. ficus-indica*), variedad Milpa Alta, posee efecto regulador de las alteraciones provocadas por estrés oxidativo agudo en el jerbo, *Meriones unguiculatus*.

Objetivos Particulares

- Determinar el contenido de polifenoles y flavonoides totales en el extracto acuoso liofilizado de cladodios de nopal.
- Hacer una valoración *in vitro* e *in vivo*, de la capacidad antioxidante del extracto liofilizado de cladodios de nopal.
- Determinar los efectos del estrés oxidativo en el jerbo *M. unguiculatus*, post-estrés agudo, y su posible modificación por la administración de extracto de nopal.
- Determinar los cambios histopatológicos post-estrés de la mucosa gástrica de los jerbos y su relación con la administración de extracto liofilizado de nopal en un período máximo de 96h.

MATERIALES Y MÉTODOS

El Nopal

Para la finalidad de este estudio, se utilizaron cladodios frescos y sin espinas del nopal *Opuntia ficus-indica*, variedad Milpa Alta, los cuales fueron comprados en el Mercado Central de Tlalpan. El material se lavó y secó manualmente. Posteriormente se cortó en láminas muy delgadas que se colocaron en charolas para ser secadas en estufa convencional de laboratorio, a una temperatura de 48 a 50 °C, durante 24 a 36 horas. Una vez seco, el material fue molido en molino de cuchillas, a un tamaño de partícula menor a 2 mm, obteniéndose así una harina de tamaño homogéneo.

Obtención del extracto acuoso de nopal (EAN)

Reactivos y Equipos. Alcohol etílico (EtOH) [JT Baker,reactivo], y acetona [JT Baker,reactivo], Cámara de Agitación Maz Q 400 Barnstead Lab-Line, Balanza Analítica ae Adam ®, Centrífuga Refrigeradora Sorvall RT600013, Rotavapor Büchi R-134, Liofilizadora Labconco Free Zone 4.5.

Para la extracción se utilizaron 25g de harina de nopal a la cual se añadieron 200mL de una mezcla etanol-agua destilada (50:50), y se dejaron reposar toda la noche, protegida de la luz y en refrigeración (4°C). Posteriormente se agitó la mezcla a 150 rpm por dos horas a temperatura ambiente, tiempo después del cual se centrifugó a 3,000 rpm por 15 min a 20°C. El sobrenadante se filtró y conservó a 4°C mientras que la pastilla se resuspendió en 200mL de una mezcla de acetona-agua destilada (70:30), repitiéndose el proceso de extracción a partir del reposo por toda la noche seguido de una centrifugación. Los sobrenadantes de la mezcla etanólica y acetónica se reunieron y se pusieron en rotavapor para eliminar los disolventes orgánicos y mantener sólo la fase acuosa. Los posibles disolventes remanentes, fueron eliminados con gas de N₂ inyectado directamente a los matraces por 30 minutos. El extracto acuoso de nopal así obtenido (EAN), se liofilizó para obtenerse de ese modo una reserva de extracto acuoso en forma liofilizada, para todo el experimento.

Determinaciones Químicas en el extracto liofilizado de nopal (ELN)

Determinación de Compuestos Polifenólicos

Reactivos. Ácido Clorhídrico (HCl) [JT Baker,reactivo], Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) [JT Baker,reactivo], Reactivo de Follin-Ciocalteu [Sigma Aldrich,reactivo].

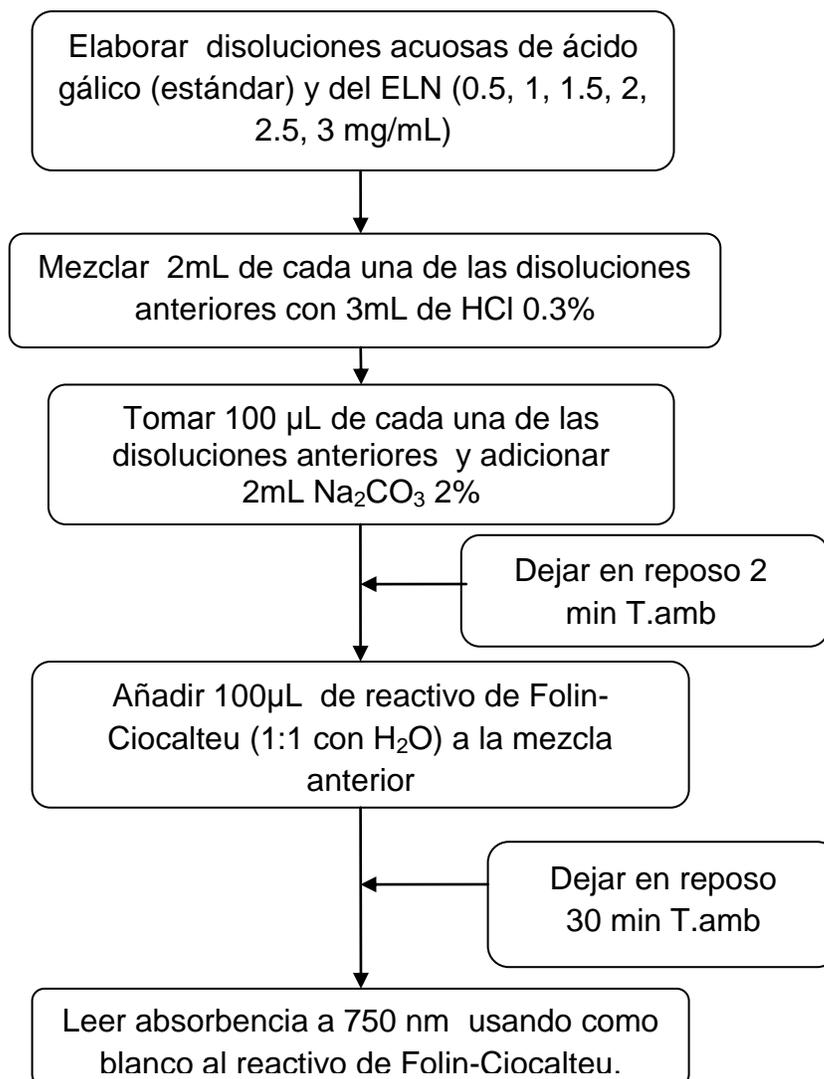
Equipo. Espectrofotómetro UV/Vis Beckman Du 70.

Fundamento.

Los compuestos fenólicos en el extracto fueron determinados por el método colorimétrico de Follin-Ciocalteu (molibdato y tungstato sódico). Este compuesto oxida los compuestos fenólicos de la muestra a fenolatos en medio alcalino, formando un complejo de molibdeno– tungsteno de color azul, cuya intensidad es proporcional al número de grupos hidroxilo presentes en la molécula (Chuquimia *et al.* 2008, Gutierrez-Avella *et al.* 2008).

La cantidad de polifenoles totales se determinó con el método descrito por Matthäus (2002).

Diagrama del ensayo de determinación de compuestos polifenólicos



Método basado en Matthäus (2002).

Los resultados fueron expresados en equivalentes de ácido gálico (EAG) en mg/ g de nopal peso seco; de allí que dichas unidades no representan cantidades absolutas de polifenoles, sino la reducción química relativa a un equivalente de ácido gálico. El resultado final corresponde a la media de 3 mediciones.

Determinación de Flavonoides

Reactivos. Tricloruro de Aluminio (AlCl_3) [Sigma Aldrich,reactivo], Ácido Acético (HAc) [JT Baker,reactivo], Alcohol Etílico (EtOH) [JT Baker,reactivo], Rutina [Sigma Aldrich,reactivo].

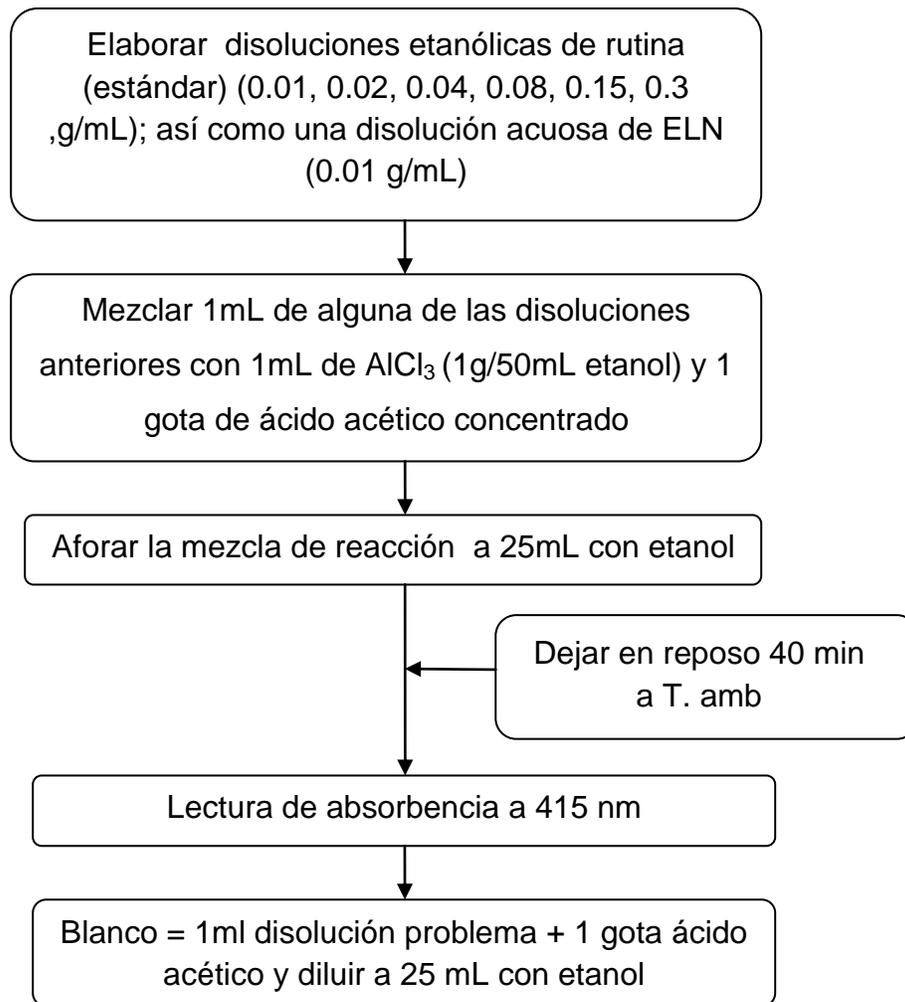
Equipo. Espectrofotómetro UV/Vis Beckman Du 70.

Fundamento.

El tricloruro de aluminio (AlCl_3) es un reactivo que interacciona con algunos grupos hidroxilo del núcleo de la flavona, formando un complejo colorido que puede ser detectado a 415 nm. Los grupos hidroxilo involucrados en la reacción son dependientes del disolvente en el cual se lleve a cabo la misma; por lo que, si la reacción se realiza en etanol los grupos hidroxilo libres que participarán en la formación del complejo serán los ubicados en las posiciones 3 o 5, mientras que si el medio es metanólico adicionalmente a las posiciones anteriormente descritas participarán los hidroxilos libres de la posición 4 (Jurd L., 1969).

La cantidad de flavonoides se determinó con el método descrito por Kumaran *et al.* (2005), en el que se utilizó rutina como estándar.

Diagrama del ensayo de determinación de flavonoides



Método basado en Kumaran et al. (2005).

Los resultados fueron expresados en equivalentes de rutina (ER) en mg/ g de nopal peso seco; de allí que, no representan cantidades absolutas de flavonoides, sino la reducción química relativa a un equivalente de rutina. El resultado final corresponde a la media de 3 mediciones.

Medición del Poder Antioxidante del extracto liofilizado de nopal (ELN), in vitro.

Capacidad secuestrante sobre el radical 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

Reactivos. Ácido Ascórbico [Sigma Aldrich,reactivo], 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) [Sigma Aldrich,reactivo], Alcohol Etílico (EtOH) [JT Baker,reactivo].

Equipo. Espectrofotómetro UV/Vis Beckman Du 70.

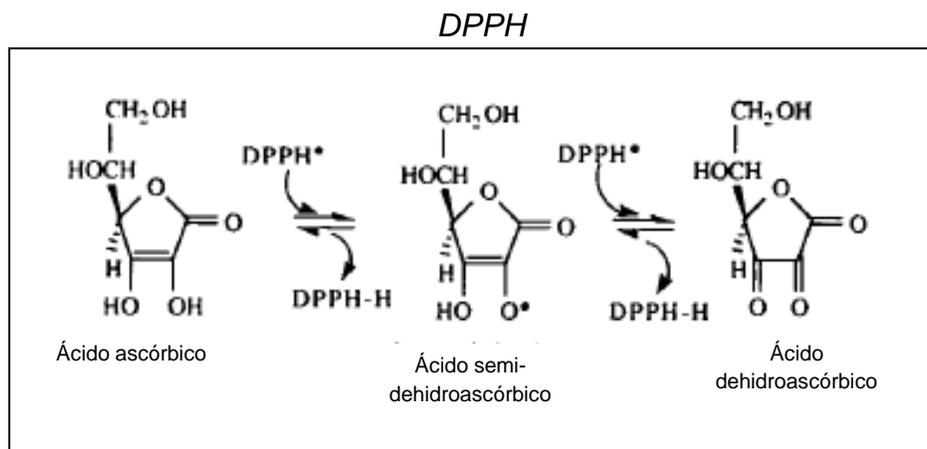
Fundamento.

Los antioxidantes reaccionan con el radical DPPH (color púrpura) para convertirlo a su forma reducida DPPH-H (color amarillo); el grado de decoloración que experimenta la reacción a 515 nm, depende del potencial secuestrante del compuesto antioxidante (Siddhuraju, 2002).



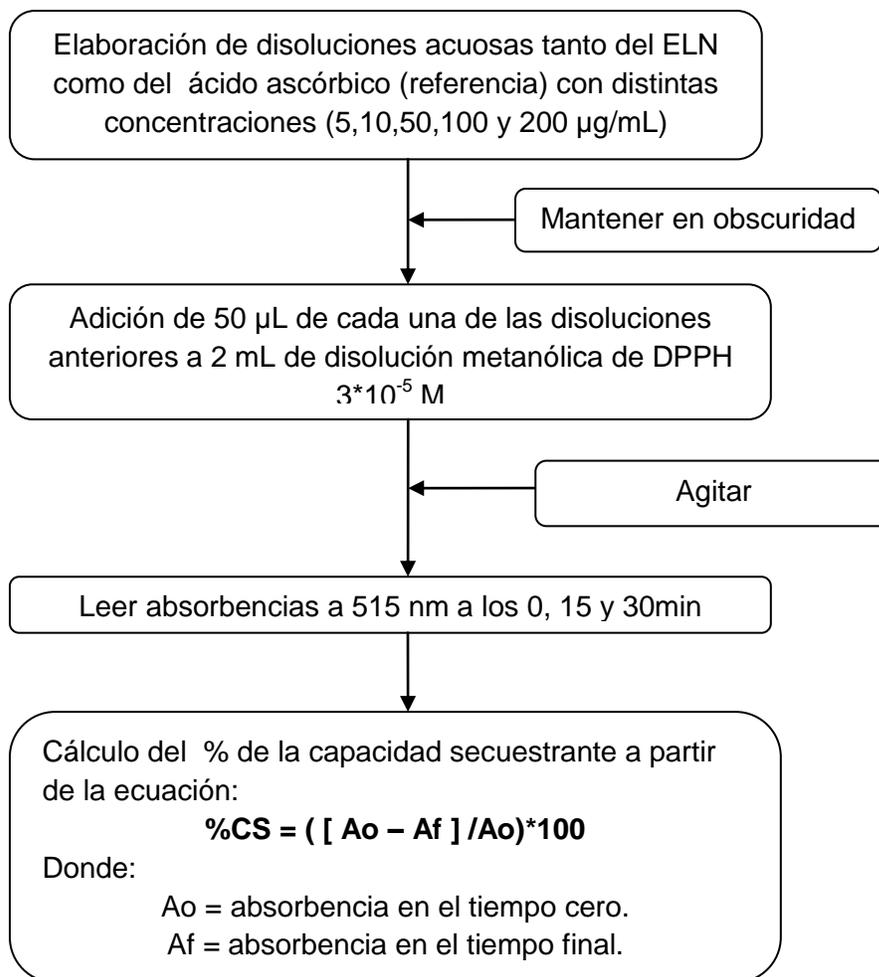
Un ejemplo del mecanismo de reacción se presenta en la Fig. 8:

Figura 8. Mecanismo de reacción del Ácido Ascórbico en presencia del radical



Tomado de B.Williams et al. (1995).

Diagrama del ensayo para la determinación de la capacidad secuestrante del ELN sobre el radical 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)



Método descrito por Siddhuraju (2002).

Capacidad de reducción férrica (FRAP) en el extracto liofilizado de nopal (ELN)

Reactivos. Acetato de Sodio [J.T.Baker,reactivo], Ácido Acético [J.T.Baker], Tripiridiltriazina (TPTZ) [Sigma Aldich,reactivo], Cloruro Férrico (FeCl_3) [Sigma Aldrich,reactivo], Ácido Clorhídrico (HCl) [J.T.Baker,reactivo] y TROLOX [Sigma Aldrich,reactivo].

Equipo. Espectrofotómetro Génesis 10 VIS Scientific EQUIPAR.

Fundamento.

La capacidad de reducción férrica (FRAP, por sus siglas en inglés, Ferric Reducing / Antioxidant Power) se puede determinar partiendo del conocimiento de que en medio ácido, el ión férrico (Fe^{3+}) y la tripiridiltriazina (TPTZ) forman un complejo incoloro “ Fe^{3+} -TPTZ” que en presencia de un agente reductor permite el paso del ión férrico a ión ferroso (Fe^{2+}), dando como producto al complejo “ Fe^{2+} - TPTZ” de un color azul intenso cuantificable espectrofotométricamente y cuya mayor absorbencia se presenta en los 593 nm (Benzie & Strain 1996).

Figura 11. Esquema de la reacción del ensayo de FRAP

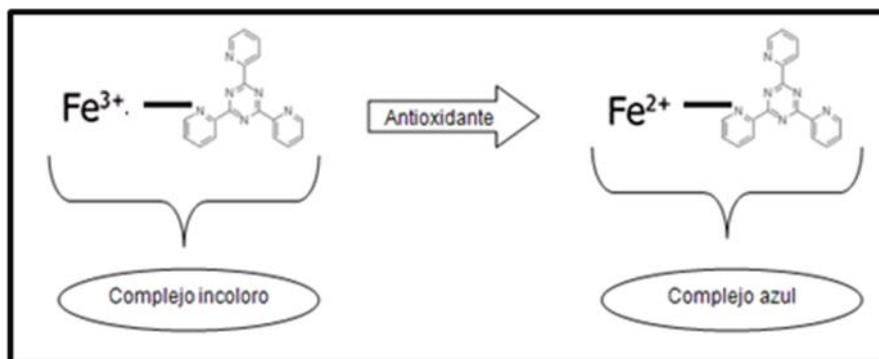
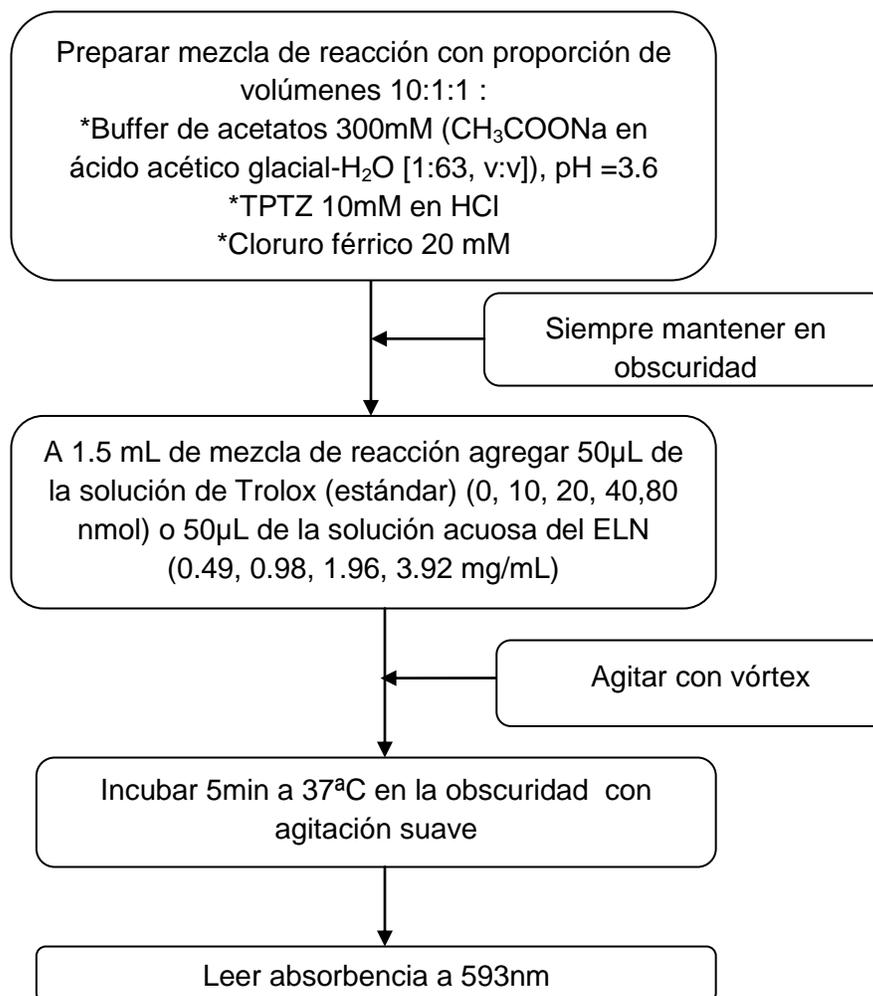


Diagrama del ensayo de capacidad de reducción férrica (FRAP)



Método de Benzie & Strain (1996) modificado en la curva de calibración, pues se utilizó TROLOX en lugar de sulfato ferroso (FeSO₄).

Los resultados finales fueron expresados como actividad antioxidante equivalente a nmol de TROLOX/ mL de solución acuosa del ELN. La actividad relativa del TROLOX en éste ensayo es de 2, lo que quiere decir que la reacción directa de éste compuesto produce un cambio en la absorbencia de doble magnitud que el del Fe²⁺ en concentraciones molares equivalentes (Benzie & Strain 1996).

Capacidad inhibitoria sobre el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$)

Reactivos. Ácido Ascórbico [Sigma Aldrich,reactivo], Desoxirribosa [Sigma Aldrich,reactivo], Ácido Tiobarbitúrico (TBA) [Sigma Aldrich,reactivo], Cloruro Férrico (FeCl_3) [Sigma Aldrich,reactivo], Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) S/Marca, Ác. Etilendiaminotetraacético (EDTA) [JT Baker,reactivo], Ácido Clorhídrico (HCl) [JT Baker,reactivo], Ácido Tricloroacético (TCA) [JT Baker,reactivo], Fosfato de Potasio monobásico (KH_2PO_4) [JT Baker,reactivo] y Fosfato de Sodio dibásico (Na_2HPO_4) [JT Baker,reactivo].

Equipo. Espectrofotómetro UV/Vis Beckman Coulter Du 640; USA

Fundamento.

La actividad secuestrante del radical ($\bullet\text{OH}$) por el ELN fue determinado utilizando la 2-desoxirribosa partiendo del método descrito originalmente por Halliwell *et al.* (1987; 1995), donde se asume que el radical hidroxilo se genera en los sistemas biológicos a partir del H_2O_2 por la reacción de Fenton (Fig. 9). El método utilizado consistió en un modelo químico basado en la generación del radical OH^\bullet por el sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{EDTA}/\text{Fe}^{3+}/\text{Ácido ascórbico}$ y la degradación del azúcar 2-desoxirribosa por dicho radical. Los productos de degradación del azúcar reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando como resultado un compuesto final colorido y detectable a 535 nm.

Figura 9. Reacción química de la generación del radical $\bullet\text{OH}$ y degradación oxidativa de la 2-desoxirribosa y su detección con el ácido tiobarbitúrico

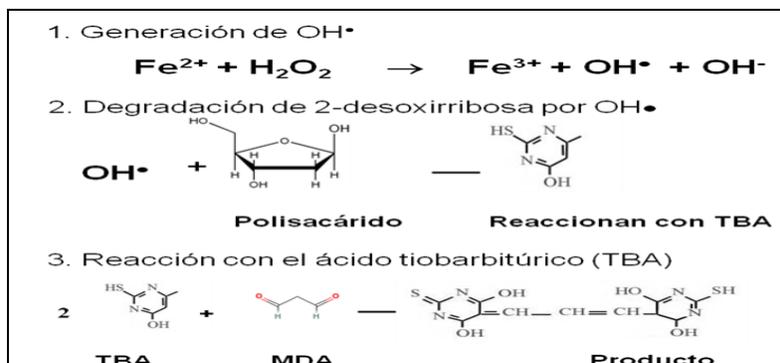
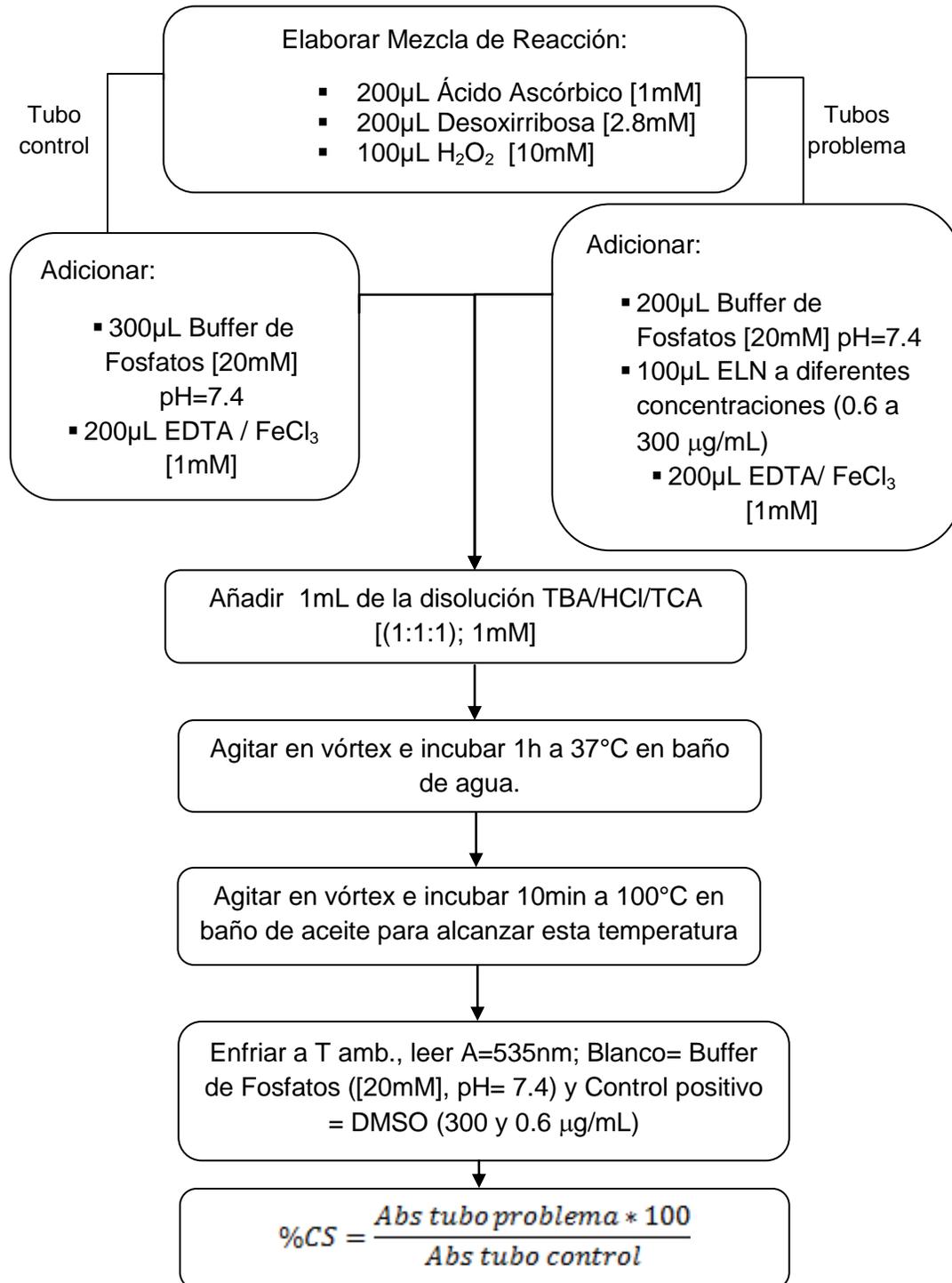


Diagrama del ensayo de capacidad inhibitoria sobre el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}^-$)



Método basado en Halliwell, (1987).

Capacidad inhibitoria sobre el radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$)

Reactivos. Xantina [Sigma Aldrich,reactivo], Nitroazul de tetrazolio (NBT) [Sigma Aldrich,reactivo], Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) [JT Baker,reactivo], Xantina Oxidasa Sigma Aldrich,reactivo], Fosfato de Potasio monobásico (KH_2PO_4) [JT Baker,reactivo] y Fosfato de Sodio dibásico (Na_2HPO_4) [JT Baker,reactivo].

Equipo. Espectrofotómetro UV/Vis Beckman Coulter Du 640; USA

Fundamento.

La actividad secuestrante de los radicales superóxido del ELN fue medida espectrofotométricamente utilizando el método de la xantina/xantina oxidasa descrito por Murrant C. (2001) y Bielski (1980) que se basa en la reacción de la xantina oxidasa que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y la de ésta, a ácido úrico, generándose en el proceso aniones $\bullet\text{O}_2^-$. Dichos aniones reducen al nitroazul de tetrazolio (NBT, por sus siglas en inglés, Nitro Blue Tetrazolium), el cual es una sal muy sensible a las reacciones enzimáticas oxido-reductoras, formando un producto colorido e insoluble llamado formazán cuya aparición indica la presencia del anión $\bullet\text{O}_2^-$. El aumento de color indica la formación de $\bullet\text{O}_2^-$ el cual puede reducirse en presencia de un antioxidante.

Figura 10. Producción del anión superóxido $\bullet\text{O}_2^-$ por la xantina oxidasa y su reacción con el NBT

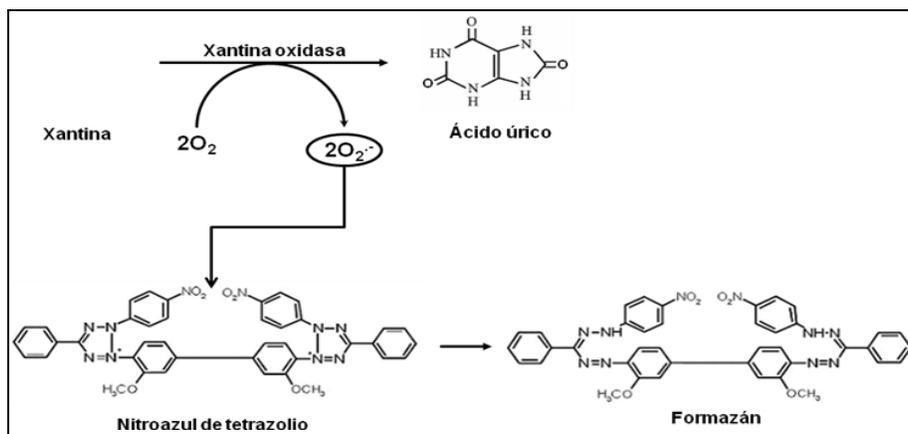
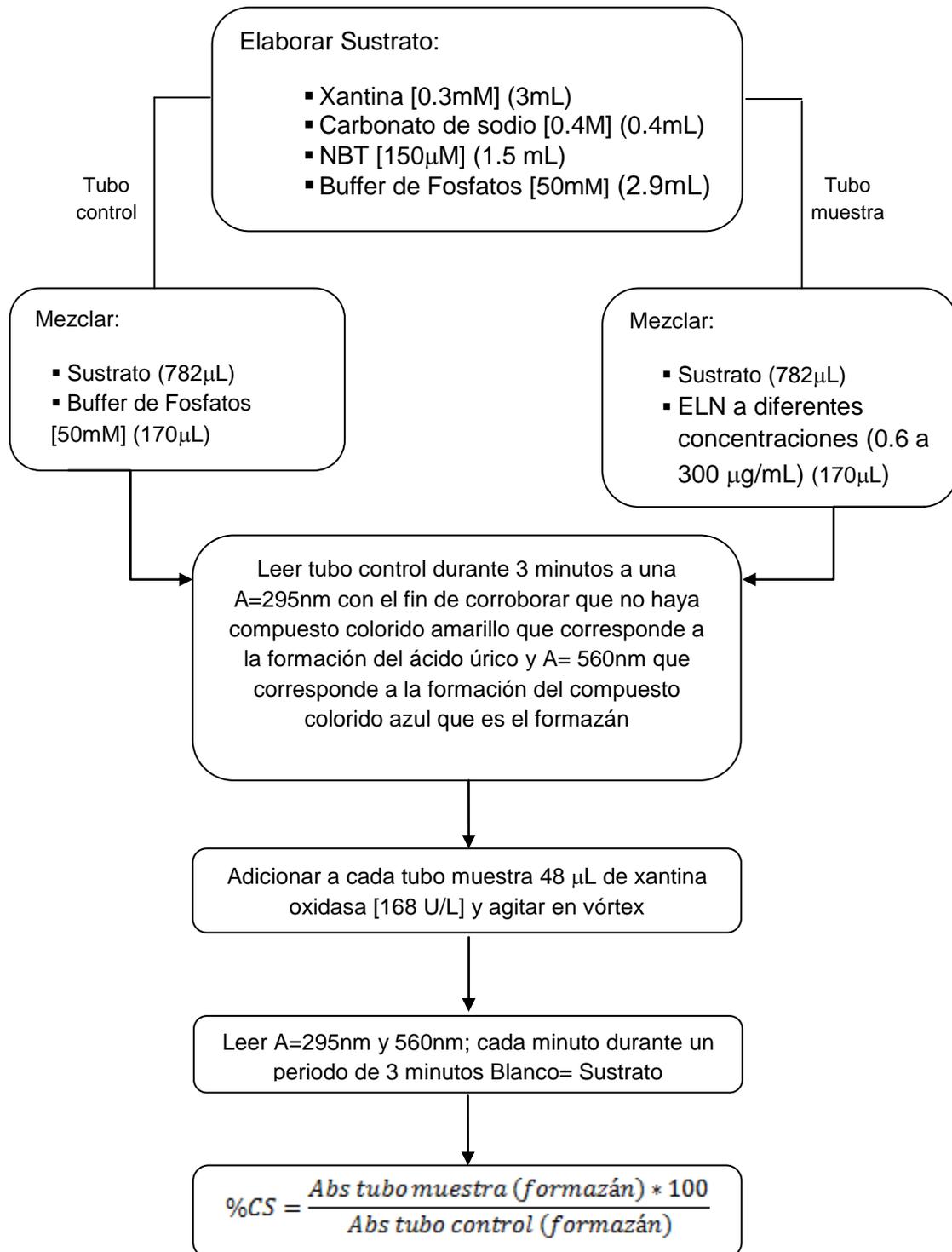


Diagrama del ensayo de capacidad inhibitoria sobre el radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$)



Método basado en Bielski, (1980)

Modelo de estudio: Jerbo (*Meriones unguiculatus*)

El modelo experimental utilizado en el presente estudio fue el jerbo *Meriones unguiculatus*, conocido como jerbo de Mongolia, provenientes originalmente de pies de cría del Centro Harlan (Indianápolis, Indiana, EUA), y criados actualmente en el Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ).

El animal pertenece a la orden Rodentia, suborden Myomorpha y la familia Cricetidae; de la misma familia que el hámster. Es también conocido como rata del desierto, es nativo de China y Mongolia. El color más común es beige claro, con una mezcla de blanco, amarillo y negro, dando un color general de pelaje marrón. También pueden ser de color negro, gris o blanco. Se caracterizan por una larga cola, completamente cubiertas de pelo, fuertes patas delanteras para cavar, y las posteriores usadas para saltar y para el mantenimiento de la postura erecta. El cuerpo y la cola son cada uno de unos 11-15 centímetros de longitud. Para nuestro estudio se emplearon un aproximado de 80 jerbos machos que llegaban a pesar entre 30-80 gramos y con una edad promedio entre 4-21 semanas.



Figura 12. Jerbo (*Meriones unguiculatus*)

Manejo de los animales

Los animales fueron manipulados de acuerdo al Reglamento para la obtención, mantenimiento, y utilización de animales para investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), el cuál a su vez se basa en la Norma Oficial Mexicana para la Producción, Uso y Cuidado de los

Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), la Ley General de Salud y su Reglamento (1988), y a los lineamientos internacionales aceptados para trabajar con animales de laboratorio. Los animales fueron alojados en cajas de policarbonato transparente de 56x28x23 cm, con cama de aserrín, con acceso libre al agua (potable clorinada en bebederos de botella) y al alimento comercial para roedores utilizado en el bioterio. Antes de comenzar el estudio, los organismos fueron familiarizados con la manipulación propia del experimento, la cual incluyó contacto físico, asimiento individual, pesado individual en balanza granataria, y cambio de cajas.

Dosis de ELN. Elaboración y administración

La dosis administrada correspondió a 2.0 mg de flavonoides totales / 100 g de peso corporal en un volumen de 200 µL de agua destilada. Para su correcta elaboración fue necesario pesar a los animales a los que se les iba a administrar la dosis para hacer una correlación y darles la concentración correspondiente. Las dosis se elaboraron cada tres días.

Para su administración por vía oral, se usaron sondas gástricas de 7cm de longitud provistas con burbuja de plata en la parte distal (para evitar daño en la mucosa oral del animal), acopladas a jeringas de 1mL de volumen. Las sondas se introducían en el hocico hasta llegar al esófago y depositar directamente la suspensión en el estómago.

Inducción de estrés oxidativo

Tratamiento de estrés por inmersión en agua y restricción física

La restricción de movimiento e inmersión en agua, conocido en la literatura científica con las siglas WIRS (water immersion restraint stress), es una técnica ampliamente utilizada en la investigación clínica para inducir la formación de úlceras gástricas en animales en condiciones de estrés oxidativo. (Yuang-Fang y *et al.*, 2005; Kwiecien *et al.*, 2002). En el presente experimento los jerbos fueron colocados en frascos de vidrio de aproximadamente 800mL de capacidad, y llenados con agua (24°C) dejando libre sólo la apófisis xifoide del animal. Los frascos fueron cerrados con tapa cribada para permitir la respiración.

Eutanasia y muestreo

Para la elaboración de la solución anestésica, se utilizaron dos productos de grado veterinario, Anesket® y Rompún®, cuyos principios activos son ketamina y xilacina, respectivamente. La dosis utilizada fue 7 mg ketamina + 0.8 mg xilacina por 100g de peso corporal y se administraron con disolución salina isotónica como vehículo. A cada jerbo se le suministró 0.1mL de mezcla de anestesia/10 g de peso corporal.

Una vez dormido se fijaron las extremidades del animal a la tabla de disección para facilitar la extracción de sangre por punción cardiaca. Después de ser extraída la sangre, ésta se conservó en un tubo vacutainer® con EDTA como anticoagulante.

Se aseguró el fallecimiento del animal mediante dislocación cervical, después de la cual se disectó como se muestra en la imagen 1. El estómago se lavó y conservó con solución salina fría hasta su análisis microscópico y/o histopatológico, mientras que el hígado se lavó con PBS frío, se dividió y conservó en congelación inmediata en nitrógeno líquido en tubos eppendorf®.

Imagen 1. Disección de Jerbo



La manipulación posterior de cada tejido se hizo de la siguiente manera:

Los tubos vacutainer® con sangre se centrifugaron a 2,000 rpm por 30 min a 4°C, el plasma obtenido se transfirió a un tubo eppendorf® y nuevamente se centrifugaron en una microcentrífuga Sorvall Legend 21 R a 3,500 rpm por 10min a 4°C. Finalmente se repartió en tubos eppendorf® (aproximadamente 150µL en cada uno) para ser congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80°C hasta su utilización.

A los estómagos se les retiró el tejido adiposo que pudieran presentar y tenían dos posibles tratamientos dependiendo de su finalidad:

Para observación macroscópica y estudio histopatológico; el estómago se fijó con formol al 10% por llenado durante 10 a 15 min., tiempo después del cual se cortó por la curvatura mayor para lavarse y eliminar los restos de comida con un pincel suave para no alterar su estructura. Posteriormente, se hicieron cortes de 2.5 mm de ancho convergentes a la curvatura menor y se colocó en rejillas que se sumergieron en un frasco con formol al 10% hasta su preparación para el estudio histopatológico.

Preparación de órganos y tejidos

▪ Plasma

El plasma se diluyó con solución salina cuando la determinación correspondiente así lo requirió.

▪ Hígado

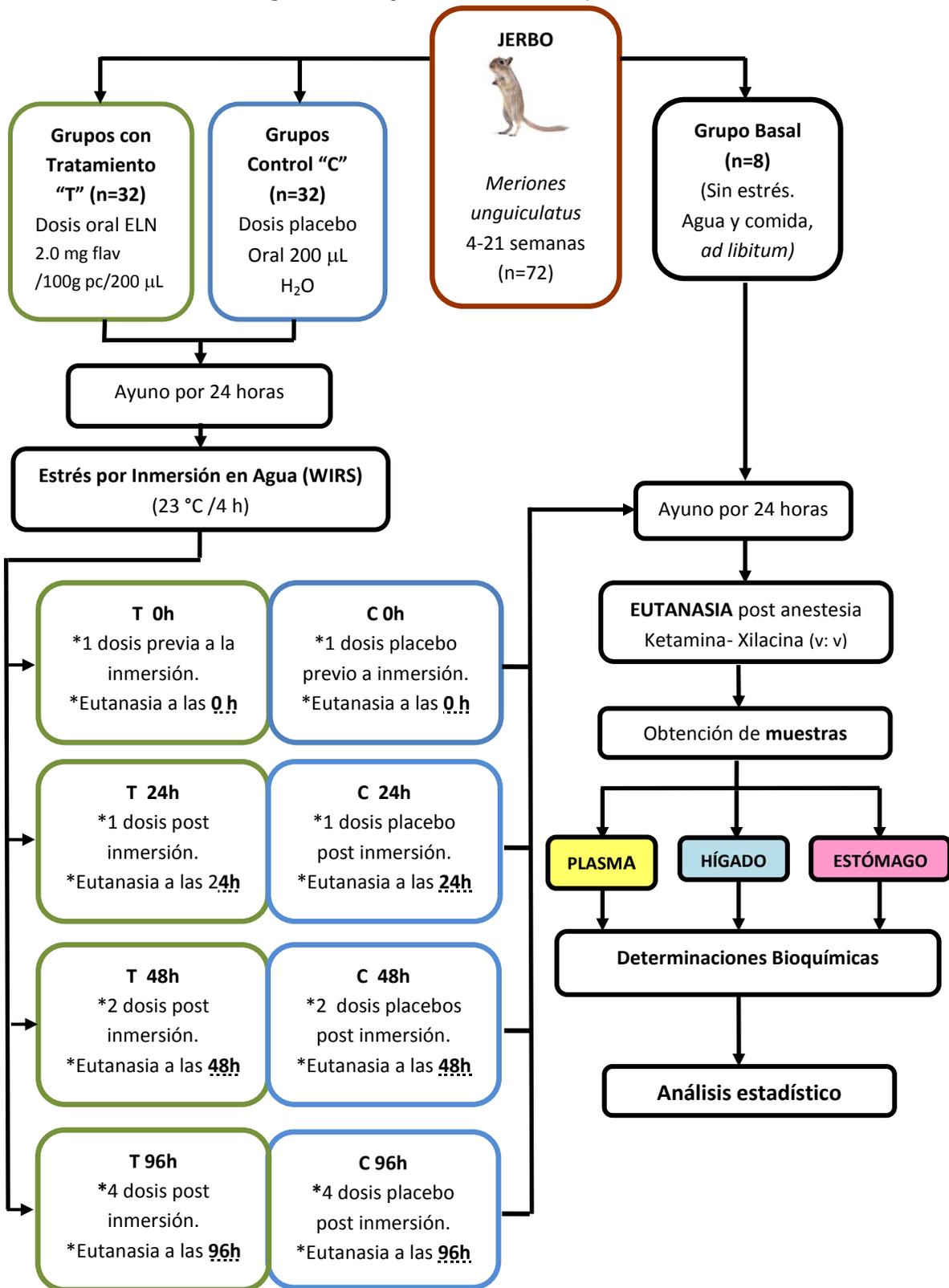
Se descongeló y se hizo la preparación del homogeneizado con el buffer correspondiente a la técnica para la cual iba a ser utilizado; con una proporción 1:5 (m:v), posteriormente se homogenizó con homogeneizador Ultraturax por 25 segundos para obtener un homogenizado, a partir de la cual se prepararon las diluciones necesarias.

Diseño Experimental

Se utilizaron 72 animales machos de 4-21 semanas de edad, distribuidos aleatoriamente en 9 grupos de 8 organismos cada uno. Tanto los grupos experimentales como su control correspondiente fueron puestos en ayuno por 24 horas el día previo al estrés por WIRS durante 4 horas, y fueron suplementados con ELN (2.0 mg de flavonoides/100 g de peso) o con placebo (200 μ L de agua destilada) por 24, 48 ó 96 horas desde una hora después del estresamiento. Al término de la suplementación se pusieron en ayuno por 24 h antes de sacrificarlos. El manejo de cada grupo se describe a continuación:

- Basal: animales sin manipulación diferente a la habitual, con ayuno de 24 h, previo al sacrificio.
- Tratamiento 0h (T0h): animales con dosis de ELN, sometidos a estrés y sacrificados.
- Control 0h (C0h): animales con dosis de placebo, sometidos a estrés y sacrificados.
- Tratamiento 24h (T24h): animales con estrés, dosificados con ELN, y sacrificados a las 24 h.
- Control 24h (C24h): animales con estrés, dosificados con placebo, y sacrificados a las 24 h.
- Tratamiento 48h (T48h): animales con estrés, dosificados con ELN y sacrificados a las 48h.
- Control 48h (C48h): animales con estrés, dosificados con placebo y sacrificados a las 48 h.
- Tratamiento 96h (T96h): animales con estrés, dosificados con ELN y sacrificados a las 96h
- Control 96h (C96h): animales con estrés, dosificados con placebo y sacrificados a las 96h

Figura 13. Diagrama del Diseño Experimental



Indicadores de estrés oxidativo en el jerbo

Capacidad de reducción férrica (FRAP) en plasma

Reactivos. Acetato de Sodio [J.T.Baker,reactivo], Ácido Acético [J.T.Baker], Tripiridiltriazina (TPTZ) [Sigma Aldrich,reactivo], Cloruro Férrico (FeCl_3) [Sigma Aldrich,reactivo], Ácido Clorhídrico (HCl) [J.T.Baker,reactivo] y TROLOX [Sigma Aldrich,reactivo].

Equipo. Espectrofotómetro Génesis 10 VIS Scientific EQUIPAR.

Esta determinación tiene en mismo fundamento y el mismo procedimiento que la prueba FRAP realizada en el ELN.

Peroxidación lipídica en plasma

Reactivos. Tetraetoxipropano (TEP) [Sigma Aldrich,reactivo], Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) [JT Baker,reactivo], Ácido Tiobarbitúrico (TBA) [Sigma Aldrich,reactivo], Butil Hidroxitolueno (BHT) [Sigma Aldrich,reactivo], Solución Salina Fosfatada (PBS) [Cloruro de Sodio (NaCl) [JT Baker,reactivo], Cloruro de Potasio (KCl) [JT Baker,reactivo], Fosfato de Potasio monobásico (KH_2PO_4) [JT Baker,reactivo], Fosfato de Sodio dibásico (Na_2HPO_4) [JT Baker,reactivo], Ácido Acético (HAc) [JT Baker,reactivo]y n-Butanol [JT Baker,reactivo].

Equipo. Espectrofotómetro UV/Vis Beckman Coulter Du 640; USA

Fundamento.

La determinación de malondialdehído (MDA), como una de las especies principales aldehído, existe en forma libre y ligada a los grupos SH y NH_2 de macromoléculas en los sistemas biológicos y se evalúa con mayor frecuencia por la prueba de ácido tiobarbitúrico debido a su fácil manejo y sensibilidad (Pilz et al., 2000). El método utilizado para medir la presencia de MDA tomado de Turner (1954), fue la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés: Thiobarbituric Acid Reactive Substances) que se basa en la cuantificación espectrofotométrica del complejo colorido formado por la reacción de MDA con dos moléculas de TBA.

Figura 14. Reacción de determinación de MDA por Método Espectrofotométrico

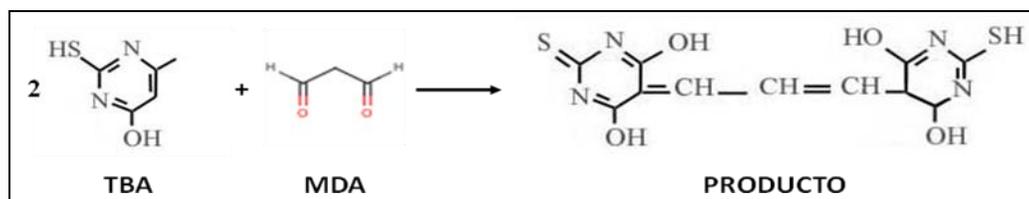
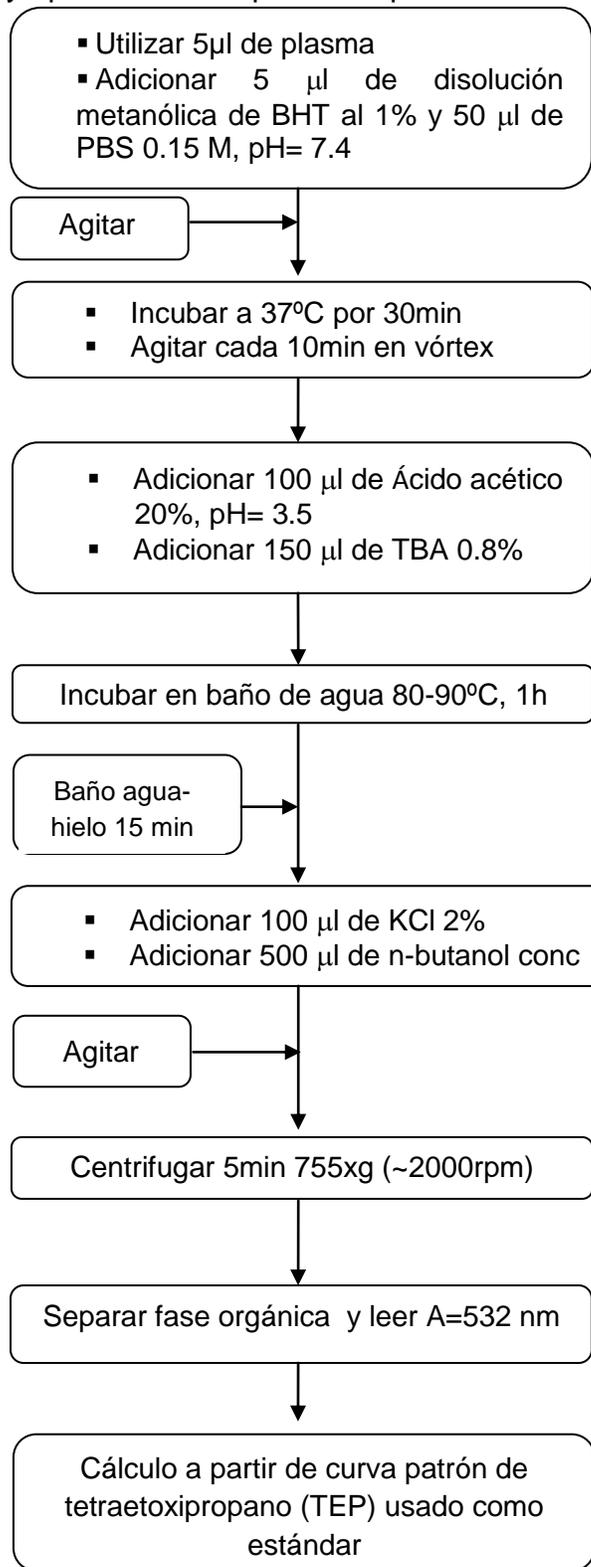


Diagrama del ensayo peroxidación lipídica en plasma



Método tomado de Turner, (1954).

Actividad enzimática antioxidante

Actividad de la enzima hepática superóxido dismutasa (SOD)

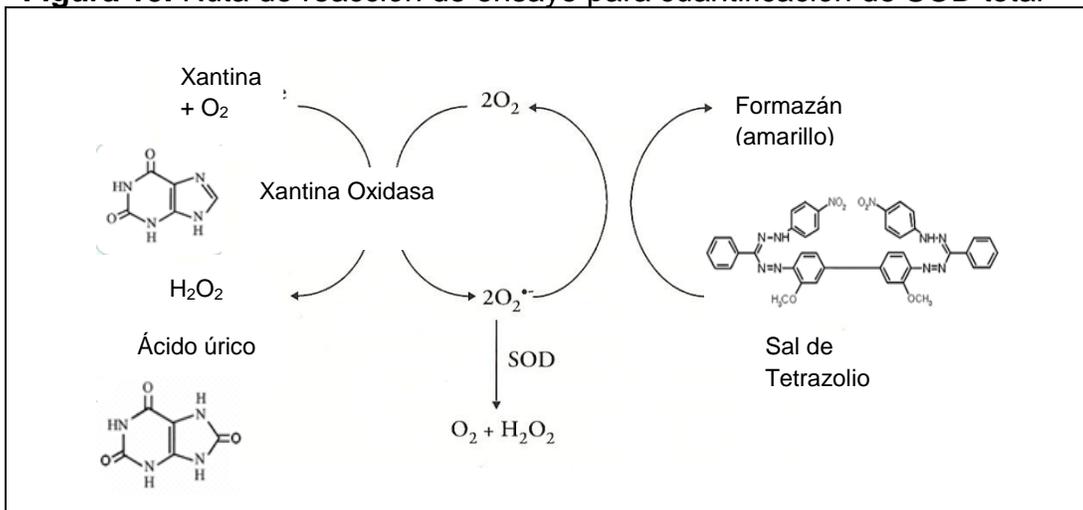
Reactivos. Kit de Ensayo para Medición de la Actividad de la Enzima Superóxido Dismutasa; Cayman-Chemical Company (Buffer de Ensayo, Buffer de Muestra, Detector del radical, Estándar de SOD y Xantina Oxidasa).

Equipos. Espectrofotómetro de Placas Spectramax Plus 384 Molecular Devices y Microcentrífuga Sorvall Legend Micro 21 R.

Fundamento.

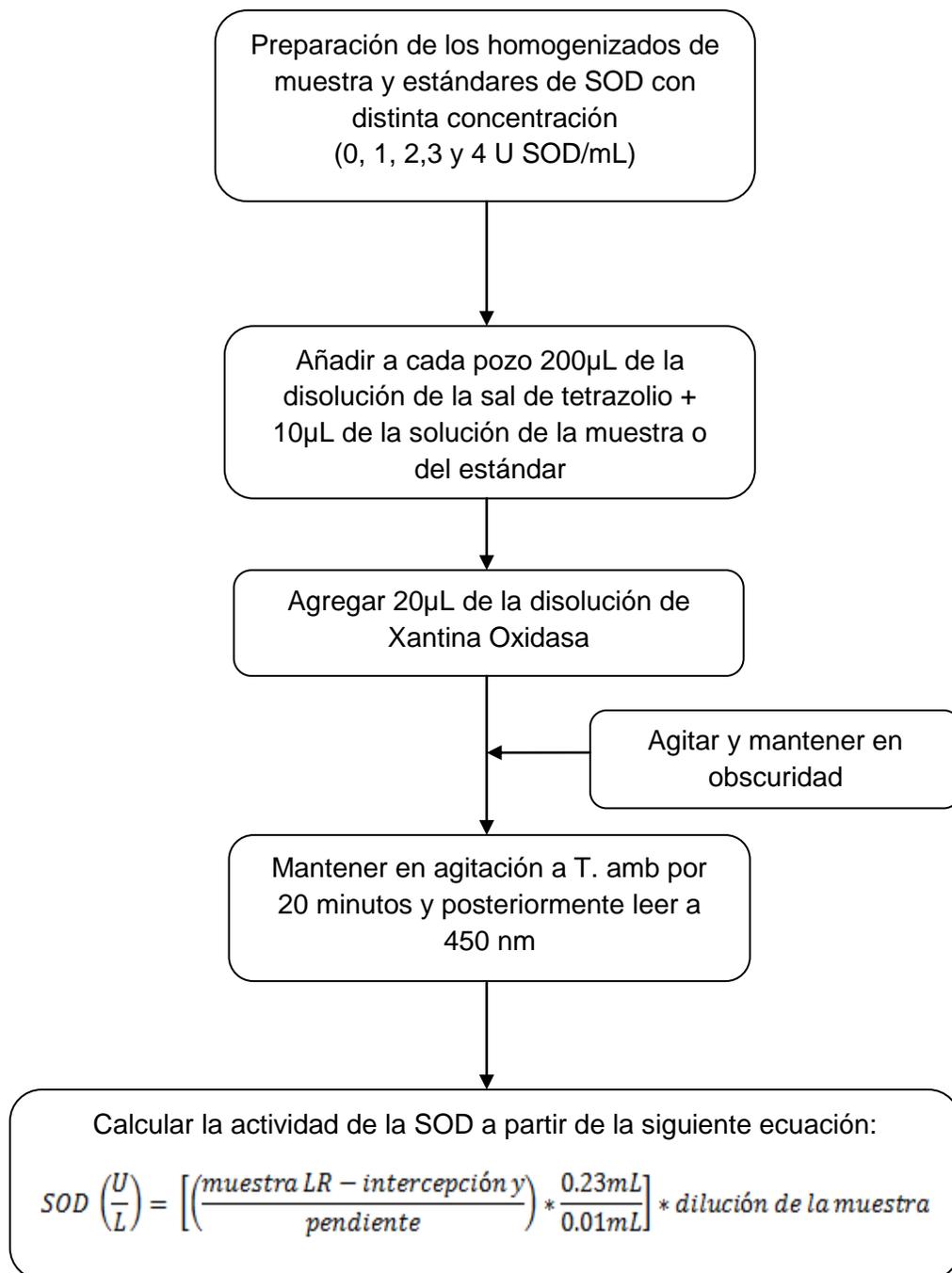
Este ensayo utiliza una sal de tetrazolio para la detección de los radicales superóxido generados por la xantina oxidasa e hipoxantina al aparecer una coloración amarilla detectable espectrofotométricamente (Fig. 15). Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para evidenciar el 50% de dismutación del radical superóxido. La ruta de reacción se muestra a continuación:

Figura 15. Ruta de reacción de ensayo para cuantificación de SOD total



Tomado del manual del kit para ensayo de SOD Cayman Chemical.

Diagrama del ensayo de la actividad de la enzima hepática superóxido dismutasa (SOD)



Método tomado de manual kit para ensayo de SOD Cayman Chemical.

Actividad de la enzima hepática glutatión peroxidasa (GPx)

Reactivos. Kit de Ensayo para Medición de la Actividad de la Enzima Glutatión Peroxidasa; Cayman-Chemical Company (Buffer de Ensayo, Buffer de Muestra, Glutatión Peroxidasa (Control), Mezcla de Co-sustrato de GPx y Hidroperóxido de Cumeno).

Equipos. Espectrofotómetro de Placas Spectramax Plus 384 Molecular Devices y Microcentrífuga Sorvall Legend Micro 21 R.

Fundamento.

El método utilizado para medir la actividad enzimática fue tomado del kit de ensayo Calbiochem, el cual mide la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) de una forma indirecta mediante la reacción en conjunto con la glutatión reductasa (GR). El glutatión oxidado (GSSG), producto de la reducción del hidroperóxido por la GPx, es transformado a su forma reducida por la glutatión reductasa (GR) y el NADPH; éste a su vez es convertido a su forma reducida, NADP⁺ provocando una disminución en la absorbencia a 340 nm, la cual es directamente proporcional a la actividad de la GPx presente en la muestra.

Figura 16. Reacción de determinación de GPx por Método Espectrofotométrico

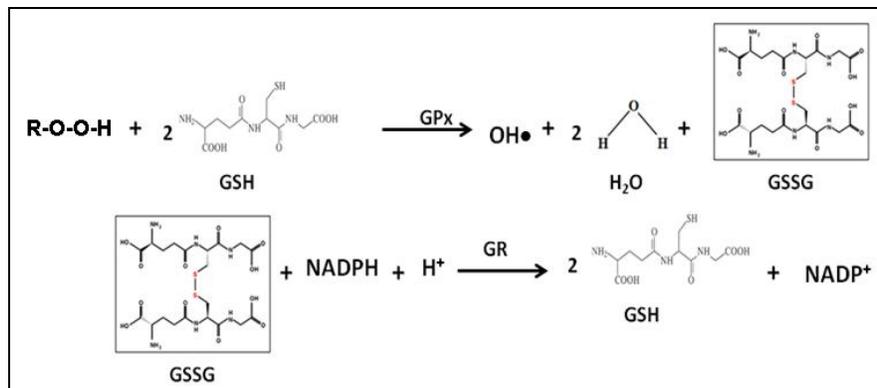
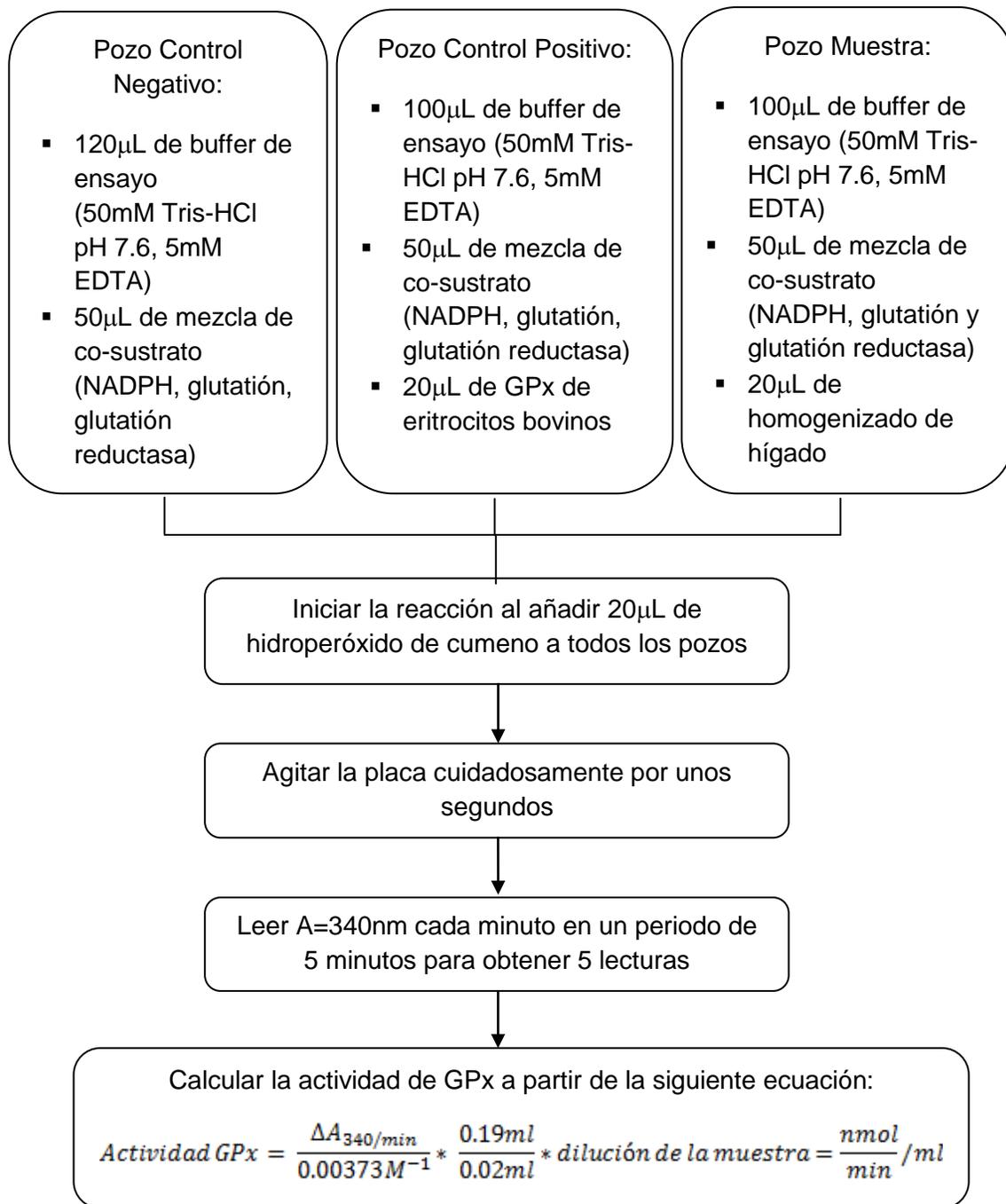


Diagrama del ensayo de la actividad de la enzima hepática glutatión peroxidasa (GPx)



Método tomado del manual de kit para ensayo de GPx Cayman Chemical

Concentración de glucosa en plasma

Equipo. Analizador automatizado YSI 2700; Select Biochemistry Analyzer.

Fundamento.

La concentración de glucosa en las muestras de plasma se midió indirectamente utilizando un analizador que hace pasar la muestra a través de una membrana de policarbonato para encontrarse con una enzima oxidasa específica, lo que permite la reacción del sustrato (en este caso la glucosa) con el oxígeno, produciendo peróxido de hidrógeno que es detectado por un ánodo de platino y da lugar a una señal eléctrica, la que le permite al equipo determinar la concentración de glucosa en la muestra. La única preparación que requiere la muestra es una dilución (en caso necesario) para quedar dentro del umbral de detección del equipo.

Daño en la mucosa gástrica y estudio histopatológico

Ensayo.

Seguido a su extracción, los estómagos se llenaron con formaldehído al 10% y se dejaron reposar en caja Petri por un tiempo de 10 minutos aproximadamente. Tiempo después, fueron cortados a lo largo de la curvatura mayor y una vez abiertos, fueron lavados con solución salina al 9% hasta dejar expuesta la mucosa gástrica, la cual fue examinada bajo microscopio estereoscópico (10X) para el reconocimiento de zonas de erosión o úlceras. Una vez identificadas las úlceras fueron contadas y medidas (largo x ancho en mm). La suma de las áreas (mm²) en los organismos fue promediado. Para realizar el examen histológico, la zona afectada por úlceras fue cortada en secciones rectangulares convergentes con la curvatura menor con la ayuda de un bisturí y fijada con formaldehído al 10%. Las secciones obtenidas fueron incluidas en parafina y cortadas en micrótopo a un grosor de 5μ y teñidas con hematoxilina-eosina para su observación al microscopio óptico. El estudio histopatológico de las muestras fue realizado por un patólogo del Departamento de Patología del INCMNSZ.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos en las diferentes determinaciones bioquímicas realizadas en las muestras biológicas, se muestran como el valor de la media con su respectivo error estándar. La comparación entre grupos o tratamientos se hizo por medio de la prueba *T-student* de dos colas asumiendo varianzas iguales. Se realizó además la prueba de *Regresión Lineal*, con el fin de buscar la linealidad de los datos obtenidos y saber si hubo o no influencia en los datos para cada determinación tanto en la administración del extracto como en el tiempo post estrés. Cuando los valores de P fueron <0.05 se consideró diferencia significativa.

$$t_{c^2} = \frac{\frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)S^2 + (n_2 - 1)S^2}{n_1 + n_2 - 2}}}}{\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Figura 17. Fórmula *T-student* dos colas varianzas iguales

El análisis estadístico se hizo mediante paquetes estadísticos elaborados por el Ingeniero Químico José Landeros Valdepeña, quien pertenece al Departamento de Matemáticas de la Facultad de Química, UNAM.

RESULTADOS

- Determinación de polifenoles y flavonoides en el extracto liofilizado de nopal (ELN)

Tabla 6. Resultados del contenido de polifenoles en disoluciones con distinta concentraciones de ELN

Concentración ELN (mg/mL)	mg eq ác. gálico/ ELN
0.5	0.81 ± 0.007
1.0	0.97 ± 0.003
1.5	1.04 ± 0.004
2.0	1.26 ± 0.005
2.5	1.50 ± 0.005
3.0	1.60 ± 0.001

Al realizar un promedio se obtuvo una concentración de 84.1 ± 0.4 mg EAG / g ELN que al considerar el nopal completo deshidratado nos da como resultado 14 ± 0.0007 mg EAG / g nopal p.s. (4-6% humedad); en tanto que la concentración de flavonoides fue de 16.8 ± 1 mg ER/ g ELN y considerando el nopal completo deshidratado obtenemos 3 ± 0.17 mg ER / g nopal p.s. Cabe mencionar que dichos resultados corresponden solo a la fase acuosa del extracto crudo de nopal.

➤ Poder antioxidante del extracto liofilizado de nopal (ELN) in vitro

- Capacidad secuestrante del radical DPPH

Se realizaron pruebas con el ELN en distintas concentraciones utilizando como referencia el ácido ascórbico en las mismas condiciones que las utilizadas para el extracto. Los resultados mostraron que la capacidad secuestrante (%CS) del extracto aumentó con el tiempo y la concentración (Fig. 18) habiéndose obtenido el mayor nivel (8.07%) a los 15 minutos, cuando la concentración fue de 200 µg/mL; mientras que para el ácido ascórbico fue de 89.06%, a la misma concentración.

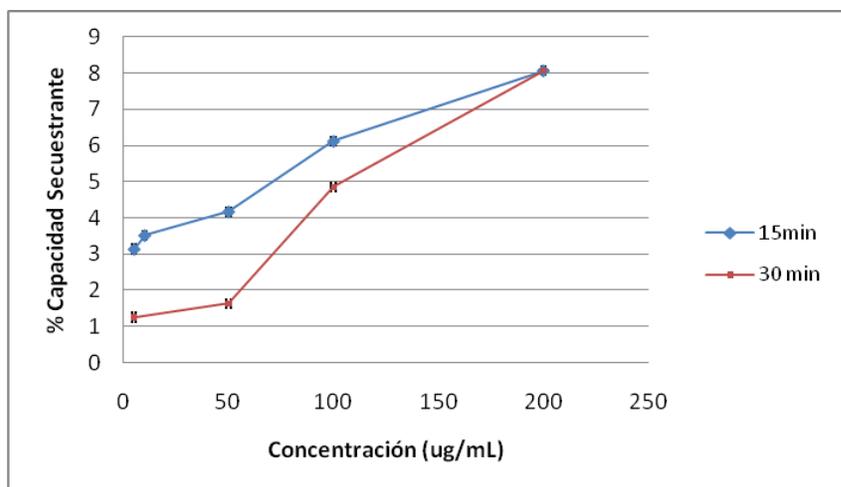


Figura 18. Capacidad secuestrante del ELN sobre el radical DPPH a diferentes concentraciones (5-200 µg/mL) a los 15 y 30 minutos (Media±Desv. Est.)

• Capacidad de reducción férrica (FRAP) del extracto liofilizado de nopal (ELN)

Las pruebas con distintas concentraciones de ELN (de 0.5 mg/mL a 4 mg/mL) mostraron que hay una tendencia creciente entre la concentración del ELN y su capacidad antioxidante como se muestra en la Fig.19. Al realizar un promedio, el resultado obtenido fue 198.63 nmol equivalentes de TROLOX/mg ELN; lo que muestra que la capacidad de reducción férrica de 1mg de ELN es equivalente a la capacidad de reducción de 10 nmol ($2.5 \cdot 10^{-3}$ mg) de TROLOX.

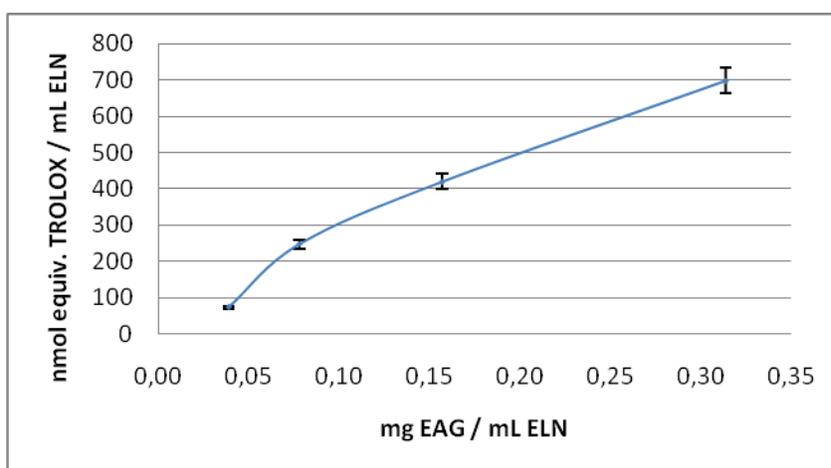


Figura 19. Capacidad de reducción férrica (FRAP) del ELN en función de su concentración de polifenoles (medias ± Desv. Est.).

• Capacidad inhibitoria sobre los radicales hidroxilo

La prueba de capacidad inhibitoria de los radicales hidroxilo, es una prueba en la que reacciona la desoxirribosa con los $\bullet\text{OH}^-$ formando un cromógeno rosa por la presencia del ácido tiobarbitúrico. Cuando se añadió a la reacción el ELN a diferentes concentraciones no se observó cambio de color en la reacción o disminución de las absorbencias lo que puede interpretarse como ausencia de efecto antioxidante del ELN en las diferentes concentraciones que se manejaron.

• Capacidad inhibitoria sobre los radicales superóxido

Al añadir la xantina oxidasa a los tubos que contenían diferentes concentraciones de ELN, no se observó cambio de color en la reacción o disminución de las absorbencias en ninguno de ellos, mientras que la absorbencia promedio de los tubos control fue de 0.0292 ± 0.015 (de 3 lecturas), debido a la presencia del indicador formazán. Por lo consiguiente se consideró nula la actividad secuestrante de radicales superóxido en el ELN.

➤ **Indicadores de estrés oxidativo en el jerbo**

• Capacidad de reducción férrica (FRAP) en plasma

Los valores de capacidad antioxidante del plasma en los diferentes grupos estudiados fueron semejantes entre sí y al del grupo basal como se ilustra en la figura 20. Dichos resultados muestran que ni el tratamiento de estrés, ni la administración del extracto modificaron la capacidad antioxidante de los organismos a lo largo del periodo experimental.

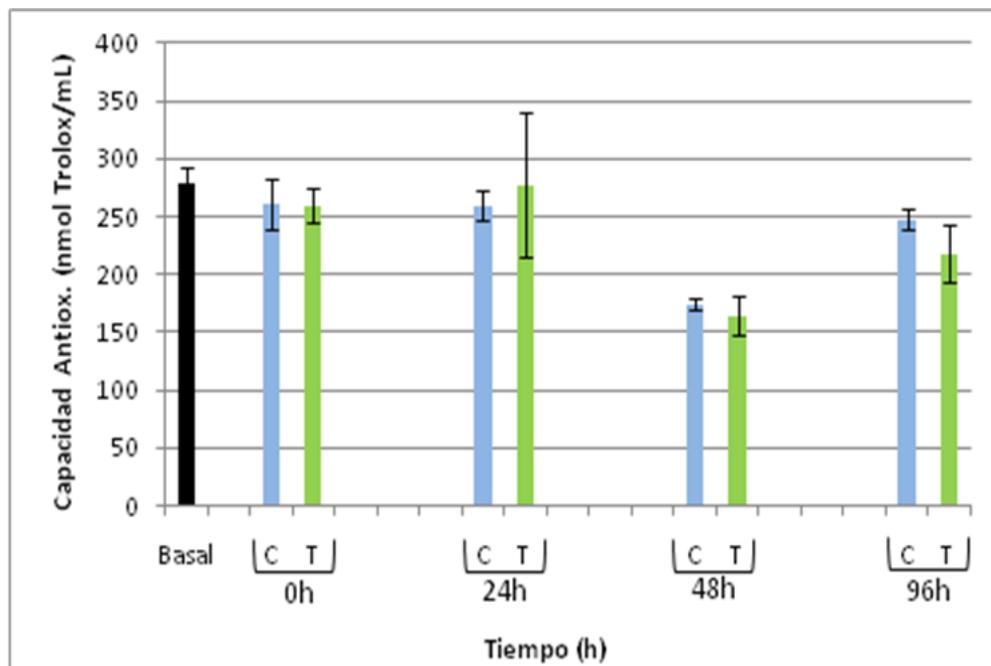


Figura 20. Capacidad antioxidante (FRAP) en nmol equivalentes de Trolox/mL de plasma de 0 a 96 h post estrés, en jerbos con tratamiento (T) y sin tratamiento (C) con ELN. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM (n= 6)- * $P < 0.05$ entre cada grupo de cada tiempo de medición, con respecto al grupo basal (sin estrés, sin ELN). Prueba *T-student* asumiendo varianzas iguales.

• Índice de peroxidación lipídica en plasma

La presencia de MDA en los tejidos es considerado como el principal subproducto de la peroxidación lipídica. Como se expone en la figura 21, la concentración de MDA posterior al estrés en el plasma de los animales de todos los grupos experimentales, fue aparentemente menor que en el grupo basal, sin embargo, de acuerdo a la prueba estadística no mostraron diferencia significativa ($P > 0.05$), a excepción del grupo T 96h ($P < 0.05$).

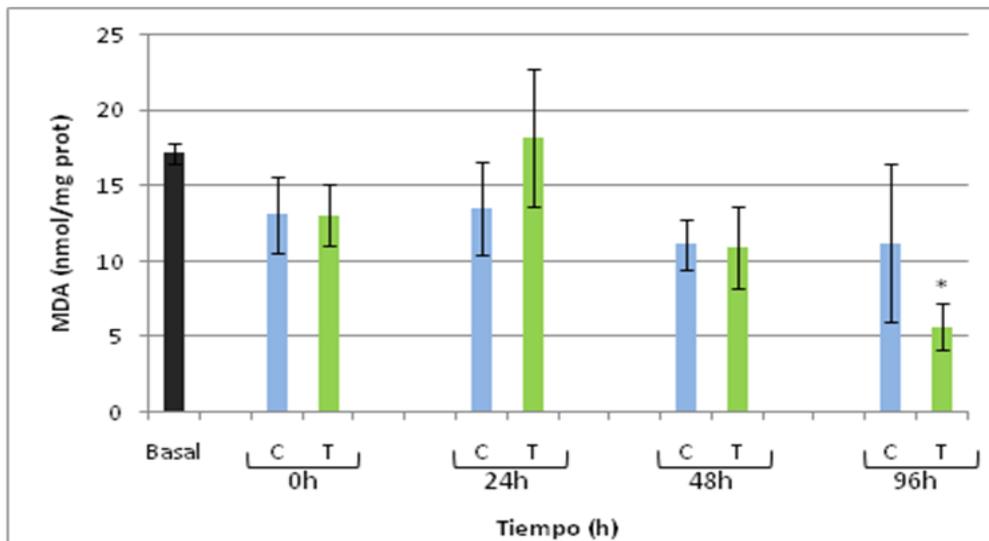


Figura 21. Cuantificación de MDA (nmol/mg prot) en plasma de 0 a 96 h post estrés, en jerbos con tratamiento (T) y sin tratamiento (C) con ELN. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM ($n=6$). * $P < 0.05$ con respecto al grupo basal sin estrés y sin ELN. Prueba *T-student* asumiendo varianzas iguales.

Estos resultados sugirieron que el estrés por inmersión en agua (WIRS) en los jerbos provoca una disminución en los niveles de MDA en plasma, a diferencia de lo observado en otros modelos experimentales como la rata (Ohta *et al.*, 2009), Por otro lado, la dosificación de los animales con ELN, tampoco influyó para modificar los niveles de MDA plasmáticos, a excepción del grupo T (96h) en los que se observó un decremento significativo con respecto del grupo basal y al grupo control.

• Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

El estrés generó un incremento significativo en la actividad de la SOD tanto a las 0h como a las 24 h después del estímulo de estrés, con tendencia a disminuir después de las 48h (Fig. 22); para el último tiempo de estudio (96 h) el grupo control tuvo un incremento en la actividad superior al normal. Por su parte el tratamiento con el ELN produjo en los animales una disminución significativa de dicha actividad enzimática con respecto a sus respectivos controles, a excepción de lo observado a las 24h de tratamiento. Dichos resultados muestran la influencia del ELN en la actividad de la enzima SOD.

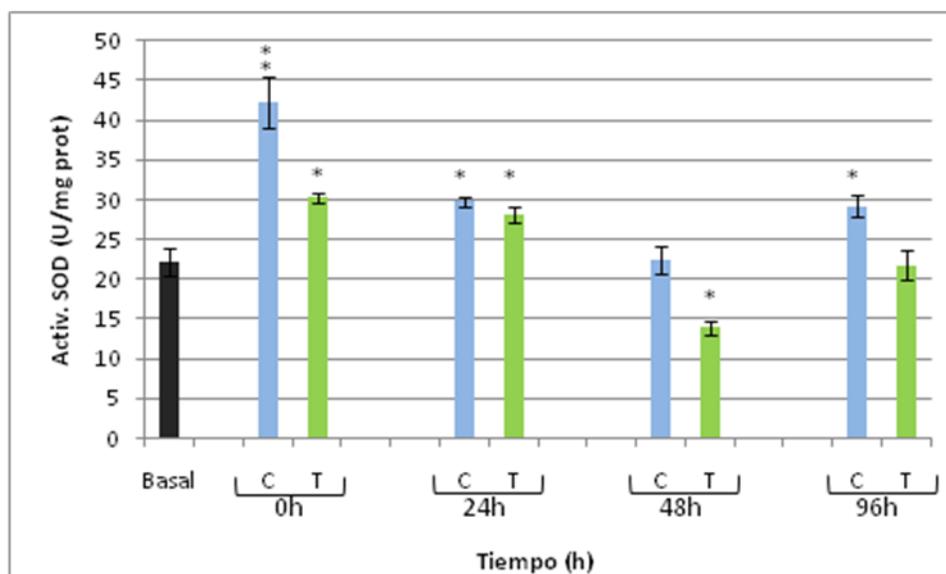


Figura 22. Actividad de la enzima SOD (U/mg) en homogenizado de hígado de 0 a 96 h post estrés, en jerbos con (T) y sin (C) extracto liofilizado de nopal (ELN). Los valores representados corresponden a la media \pm SEM (n= 6). *P<0.05 con respecto al grupo basal con respecto al grupo basal sin estrés y sin ELN. Prueba *T-student* asumiendo varianzas iguales.

• Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) en hígado

Los resultados de esta prueba mostraron un aumento significativo de la actividad de la enzima GPx con el estrés inmediatamente al término de éste (0h) y hasta las 24h, para disminuir hasta valores normales a partir de las 48h. Dicho aumento de actividad enzimática a las 0h fue de 11% menor en los animales que recibieron tratamiento con extracto de nopal con respecto al grupo control, efecto que fue invertido a las 24h en el que se observó 19% mayor actividad de la GPx en el grupo con tratamiento de nopal. A las 48 y 96 h no se observó diferencia significativa de la actividad enzimática en los animales administrados con ELN con respecto a los grupos control (Fig. 23).

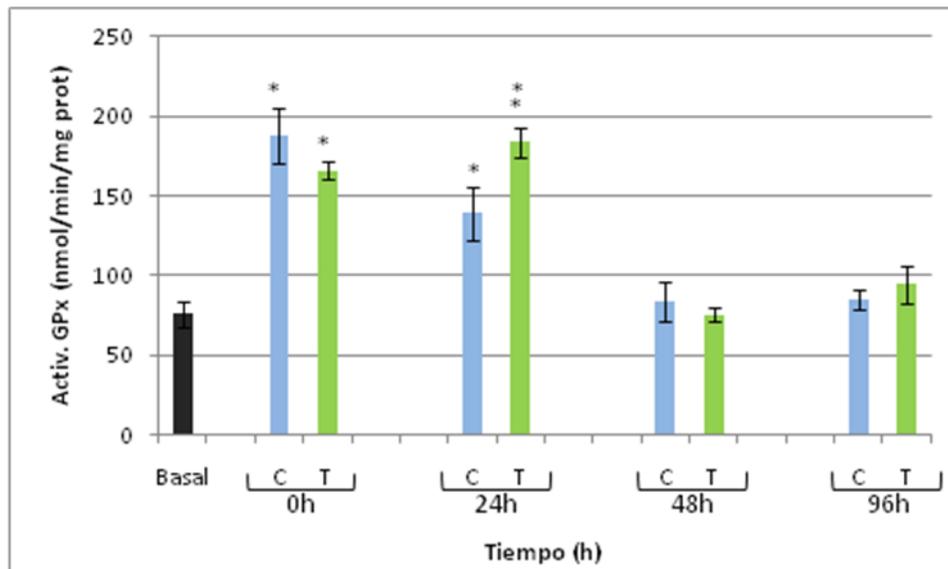


Figura 23. Actividad de la enzima GPx (nmol/min/mg prot) en homogenizados de hígado de 0 a 96 h post estrés en jerbos con tratamiento (T) y sin tratamiento (C) con ELN. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM (n= 5). *P<0.05 con respecto al grupo basal sin estrés y sin ELN. Prueba *T-student* asumiendo varianzas iguales.

- Concentración de glucosa

Con los resultados obtenidos se observa que los animales que recibieron estrés a las 0h tuvieron una reducción de la concentración de glucosa del 50% con respecto al valor normal, comportamiento que se mantuvo hasta las 24h, para remontar a las 48h a niveles significativamente superiores al de los organismos basales (normales) y sostenerse hasta las 96h. No se observaron cambios en la concentración de glucosa plasmática asociados a la suplementación con el ELN en ninguno de los tiempos de medición, lo que indica que el ELN no influyó en el transporte o metabolismo de la glucosa.

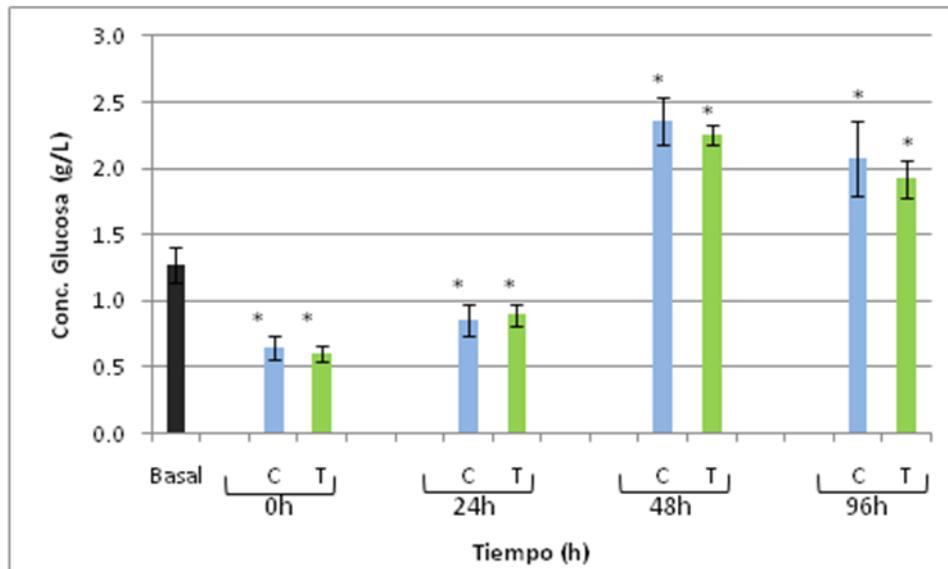


Figura 24. Cuantificación de Glucosa (g/L) en plasma de 0 a 96 h post estrés, en jerbos con (T) y sin (C) extracto liofilizado de nopal (ELN). Los valores representados corresponden a la media \pm SEM (n= 6). * $p < 0.05$ con respecto al grupo basal sin estrés y sin ELN. Prueba *T-student* asumiendo varianzas iguales

• Daño en la mucosa gástrica y Estudio Histopatológico del Estómago de los animales

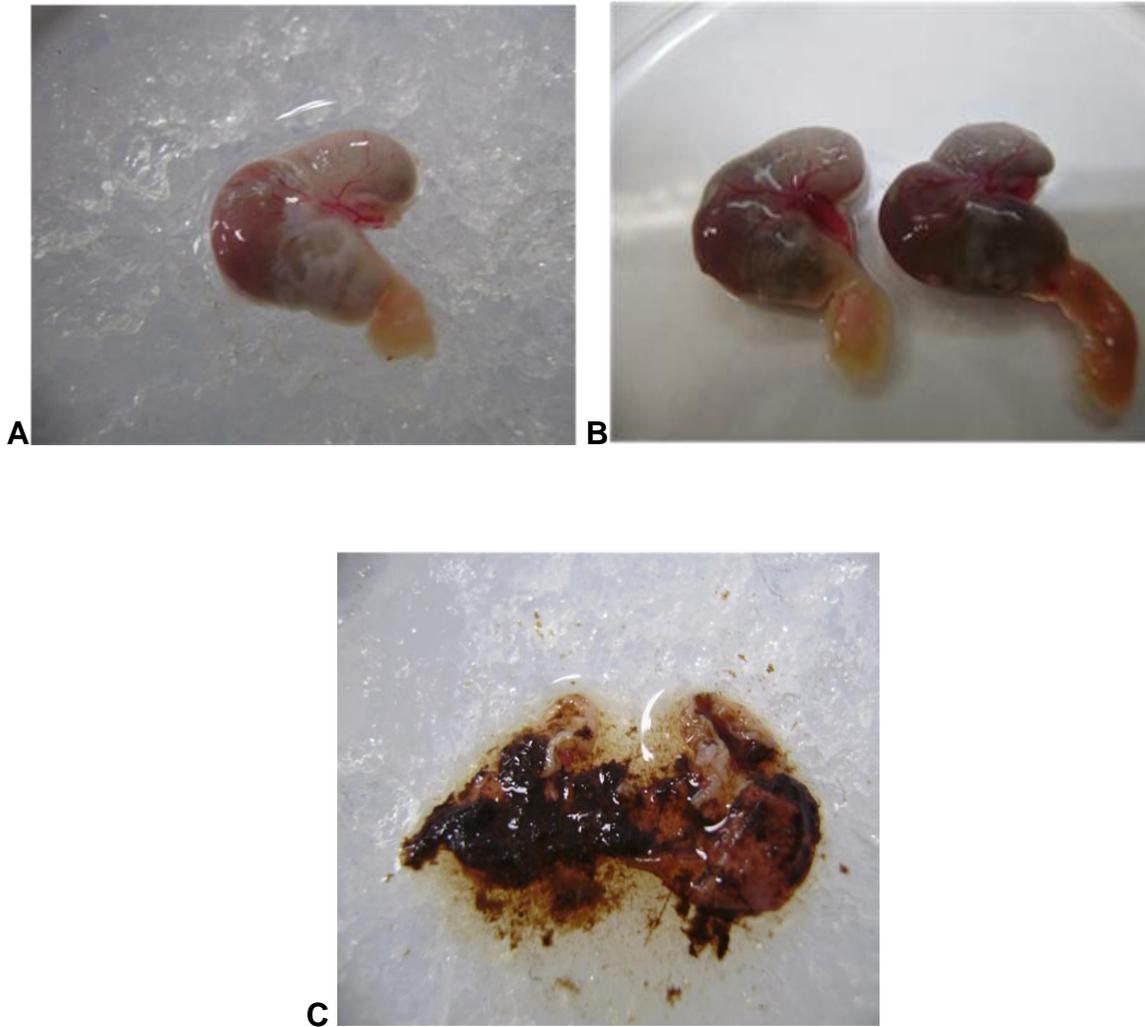


Imagen 2. Imágenes representativas del aspecto externo e interno del estómago de los animales antes (A), y después (B y C) del estrés por inmersión en agua (WIRS) por 4h. **A.** Aspecto normal del estómago en organismos del grupo basal (sin estrés, y sin tratamiento con ELN) **B.** Aspecto del estómago de algunos organismos con estrés, con y sin tratamiento de extracto de nopal (ELN), mostrando sangrado interno (hematuria). **C.** Formaciones melánicas en el interior de los estómagos con hematuria.

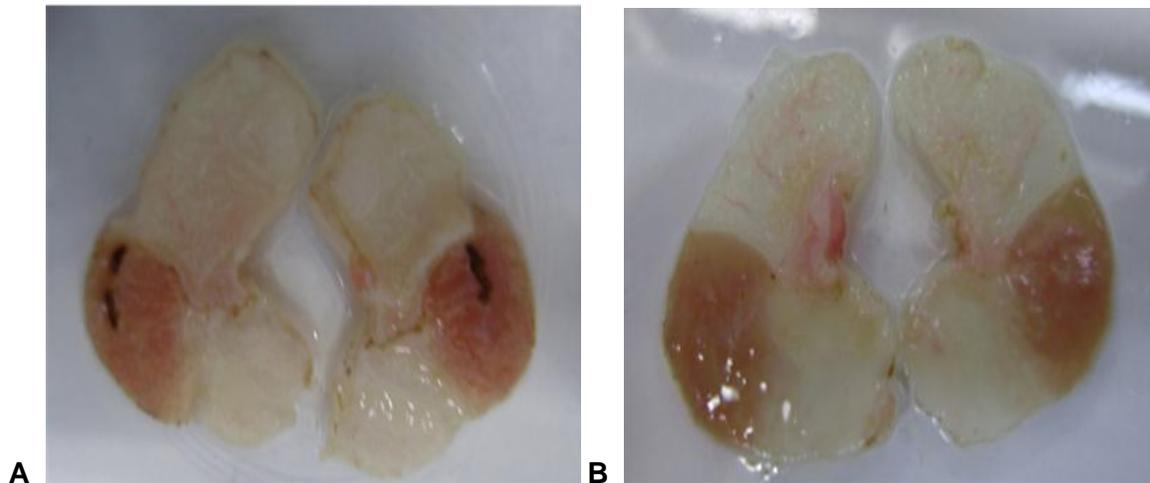


Imagen 3. Imagen representativa de la mucosa gástrica del estómago. **A.** Presencia franca de úlceras en la mucosa de la región antral del estómago en algunos animales del grupo control (sin tratamiento de extracto de nopal (ELN), y algunos con tratamiento de ELN, después del estrés por inmersión (WIRS) por 4h. **B.** Mucosa gástrica sana de animales del grupo basal (sin estrés, y sin tratamiento con extracto).

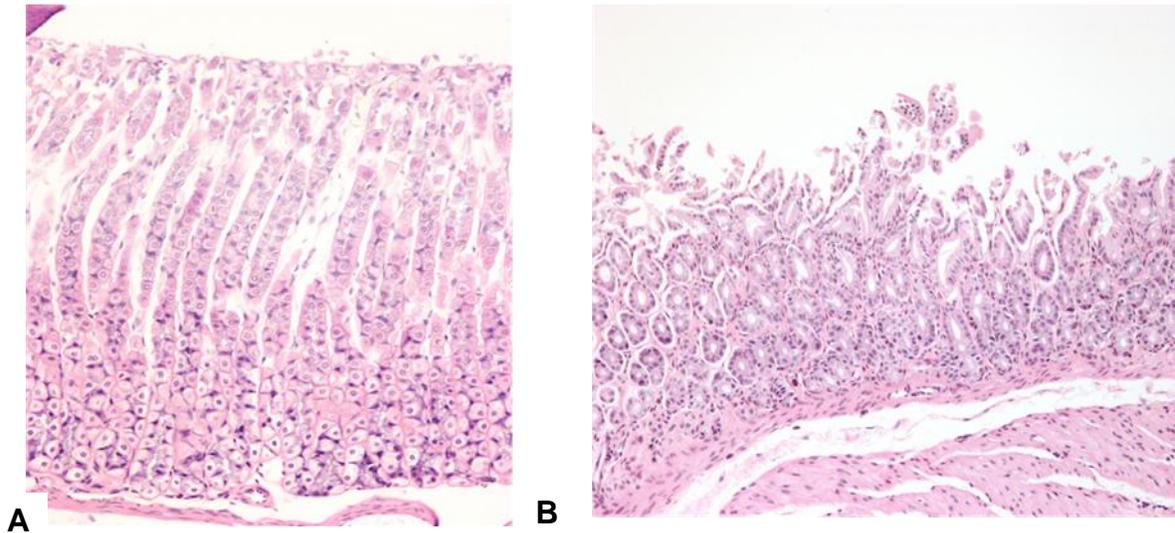


Imagen 4. Vistas representativas del estudio histopatológico de la mucosa gástrica. **A.** Células epiteliales de estructura normal en la mucosa gástrica de organismos del grupo basal (sin estrés y sin tratamiento con ELN). **B.** Tejido lesionado mostrando exfoliación del epitelio de la mucosa gástrica, correspondiente a estómagos ulcerados de algunos organismos del grupo control (con estrés WIRS por 4h, y sin tratamiento con ELN), así como de algunos con tratamiento de ELN.

Con la observación macroscópica de los estómagos durante la necropsia de los animales, se pudo apreciar que el estímulo de estrés por inmersión (WIRS) produjo sangrado interno (hematuria) (Imagen 2B y 2C). Dichos resultados fueron notables desde las 0h hasta las 48 h, con frecuencia indistinta en los diferentes grupos. Al examinar la mucosa gástrica se observó que dicho sangrado obedeció a la presencia de úlceras en la región antral del estómago de tamaño variable (entre 1 a 6 mm de largo por 1mm de ancho). La mucosa gástrica de los animales del grupo basal mostró aspecto sano, como se muestra en la (Imagen 3B). Es importante indicar, que congruente a lo indicado en otros estudios con ratas Konturek *et al.* (2000), se observó menor frecuencia de ulceración en los animales control a las 0h que a las 24h, y sólo el 25% de animales presentó úlceras al término del tratamiento de estrés. Por su parte, los organismos que recibieron tratamiento con ELN, presentaron úlceras en el 37.5% del grupo a las 0h, frecuencia que disminuyó a 25% a las 24 y 48h. Los resultados obtenidos en el presente estudio discrepan con los de otros estudios similares en los que se obtuvo fuerte correlación entre estrés (WIRS) y frecuencia de ulceración, y permanencia de las úlceras hasta por 10 días Konturek *et al.* (2000). El tamaño de las úlceras observadas en los diferentes grupos (Fig. 25); estuvo estrechamente relacionado con la frecuencia de animales afectados.

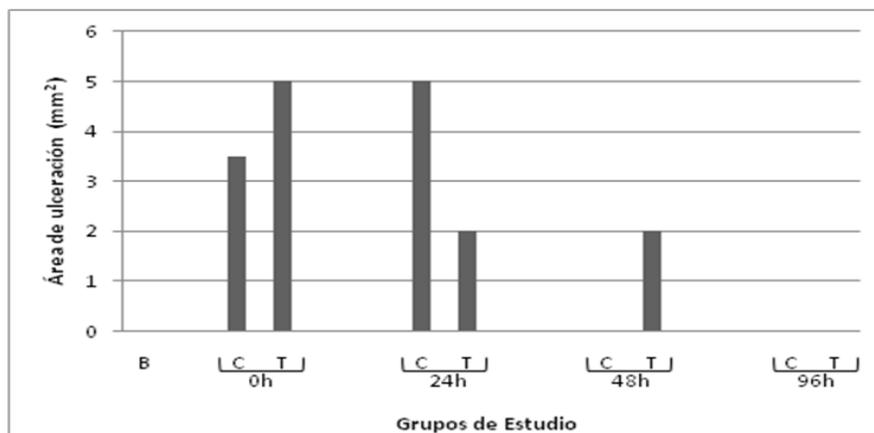


Figura 25. Dimensiones (mm^2) de las úlceras observadas en los diferentes grupos de estudio

DISCUSIÓN

Antes de desarrollar el experimento fue necesario determinar la concentración de polifenoles totales, y específicamente de flavonoides, en el extracto acuoso liofilizado ya que, por un lado, dicho extracto fue administrado a los animales para el estudio in vivo, y por otro, el poder antioxidante de los vegetales es atribuible a estos compuestos. Corral-Aguayo *et al.*, (2008), realizaron un estudio para determinar el contenido de compuestos con potencial antioxidante en ocho cultivos vegetales comestibles en México, entre ellos el nopal *O. ficus-indica* var. Milpa Alta; los autores establecen que los polifenoles de la fracción hidrofílica poseen una actividad antioxidante 95 veces mayor que los equivalentes a la fracción lipofílica. Las razones por las que se administró la fracción acuosa en el experimento in vivo fueron para administrar a los animales una dosis no tóxica, y con objeto de emular la disolución de los compuestos bioactivos en el agua, como sucede generalmente en la alimentación.

La concentración de polifenoles en este estudio fue de 14 ± 0.0007 mg EAG/g de nopal peso seco, correspondiente a los compuestos fenólicos hidrosolubles. Gallegos-Infante *et al.* (2009), al desarrollar un estudio similar en *O. ficus-indica* var. Milpa Alta, obtuvieron una concentración de polifenoles de 41 ± 2 mg EAG / g muestra seca; por su parte, Guevara-Figueroa *et al.* (2010), reportaron en esta misma especie pero de la variedad manso de Guanajuato, un contenido de 11.7mg EAG/g de nopal liofilizado. Lee *et al.* (2002), evaluaron *O.ficus-indica* variedad Saboten de Korea, y encontraron 3.7 ± 0.7 mg / g de polifenoles totales en el nopal completo liofilizado y 180 mg EAG / g de extracto metanólico. Para situar al nopal verdura entre algunas verduras comestibles en cuanto a su aporte de polifenoles, se hará una aproximación considerando un 90% de humedad inicial con lo que se obtienen 210 mg EAG / g peso húmedo; mientras que la lechuga presenta 9.69 mg EAG / g de peso húmedo, la espinaca $3.25 \cdot 10^{-1}$ mg EAG / g de peso húmedo, y la coliflor $1.04 \cdot 10^{-1}$ mg EAG / g de peso húmedo (Chuquimia, *et*

al. 2008); niveles inferiores a los observados en los cladodios de nopal del presente estudio.

En cuanto al contenido de flavonoides encontrados, 3 ± 0.17 mg ER / g nopal peso seco fue menor a lo reportado por Gallegos-Infante *et al.* (2009), quienes encontraron 23.4 ± 1.8 mg ER/ g muestra, y por Guevara-Figueroa *et al.* (2009), al reportar 9.8 mg EQ /g de muestra, utilizando quercitina como referencia. Como en la mayoría de los estudios revisados, es evidente la heterogeneidad de resultados en cuanto a la medición de los compuestos químicos en las plantas, en este caso el nopal. Las diferencias de dichos contenidos puede deberse a la procedencia del nopal, al estado de madurez, la época de producción, al estado fisiológico, entre otras, factores que pueden afectar la síntesis, o la utilización de los compuestos en un momento dado. A todo ello, también contribuyen los diferentes métodos químicos de extracción y determinación que se utilizan en las investigaciones, como lo afirman Corral-Aguayo *et al.* (2008).

Martínez-Flórez (2002), afirma que los flavonoides son compuestos polifenólicos con una gran capacidad antioxidante debido a características como 1) Las propiedades reductoras de sus grupos hidroxilo de sus anillos aromáticos, 2) La capacidad de secuestro de radicales libres generando un radical fenoxilo, y 3) Por presentar propiedad de quelación del hierro y otros metales de transición.

Tomando como referencia lo descrito por dicho autor, fue importante hacer la determinación de la capacidad antioxidante del extracto de nopal por varios métodos.

Al determinar la capacidad secuestrante (%CS) sobre el radical DPPH se observó que dicho efecto incrementa al aumentar la concentración de extracto (Fig. 18); esta tendencia nos da idea de la presencia de compuestos antioxidantes activos. Sin embargo, dicha capacidad es reducida (8.07%) con respecto al antioxidante de referencia (ác. ascórbico) el cual mostró una capacidad de

secuestro de 89.06%; la notable diferencia puede ser debido a la pureza de dicho compuesto. Lee *et al.* (2002), llevaron a cabo un ensayo similar utilizando extracto metanólico de *Opuntia-ficus indica* var. *Saboten*, en el que obtuvieron una inhibición total del radical DPPH a una concentración del extracto de 15 µg/mL y la reducción del 50% de radicales con una concentración de 9.3µg/mL mientras que en su ensayo Valente *et al.* (2010), con extractos metanólicos de *Opuntia monacantha*, y siguiendo el mismo procedimiento que Lee *et al.* (2002), obtuvieron la reducción del 50% de DPPH con una concentración de 833 µg/mL. Los resultados expuestos presentan una notable diferencia a pesar de utilizar la misma metodología y habiendo obtenido extractos muy similares. Las diferencias pueden ser atribuibles a la variación de la capacidad antioxidante entre diferentes especies, a la composición molecular de los flavonoides presentes en los extractos, o a la presencia o ausencia de otros compuestos antioxidantes como carotenoides, tocoferoles, ácido ascórbico, que de acuerdo a su concentración pueden influir en la actividad reductora de los extractos.

Por otra parte, en la determinación de la capacidad de reducción férrica del EAN, los resultados muestran un efecto quelante del hierro aunque menor que el obtenido para el TROLOX. La capacidad reductora de 1mg de EAN fue equivalente a la capacidad reductora de $2.5 \cdot 10^{-3}$ mg de TROLOX. Corral-Aguayo *et al.* (2008), realizaron pruebas con cladodios frescos de *O. ficus-indica* var. Milpa Alta proveniente de Guanajuato y San Luis Potosí, obteniendo que la capacidad reductora de 1 mg de muestra fresca fue equivalente a $8.3 \cdot 10^{-4}$ mg de TROLOX. Ambos resultados confirman que el principal efecto reductor de los cladodios de nopal se manifiesta frente al Fe^{3+} , uno de los metales de transición existente en los sistemas biológicos, sustentado en su contenido de polifenoles como se mostró en la Fig. 19.

En cuanto a la cuantificación de la capacidad inhibitoria del extracto de nopal sobre los radicales superóxido e hidroxilo, el extracto en distintas concentraciones no mostró afinidad por ninguno de los aniones, a diferencia de lo observado por

Lee *et al.* (2002), en el extracto metanólico de *O. ficus-indica* var. Saboten. Tales resultados se pueden atribuir a que los flavonoides presentes en el extracto están glicosilados por lo que su actividad antioxidante sobre los radicales superóxido e hidroxilo no fue evidente. Lo anterior se puede sustentar con el estudio realizado por Martínez-Valverde *et al.* (2000), donde mencionan que los glicósidos de los flavonoides no presentan actividad antioxidante como respuesta a un impedimento estérico cuando el glúcido bloquea al grupo 3-hidroxilo del anillo heterocíclico.

Para conocer la posible acción antioxidante del nopal en vivo, se determinó la capacidad de reducción férrica (FRAP) del plasma, ya que el aumento del consumo de vegetales en la literatura científica es asociado con un incremento en la capacidad antioxidante del plasma. Los resultados de las pruebas mostraron que no hubo influencia del tratamiento con el extracto de nopal sobre dicha capacidad en plasma. Lo anterior puede sugerir una pobre absorción de los compuestos fenólicos en el intestino de los jerbos, como resultado de su composición molecular, o el tránsito rápido de dichos compuestos en la sangre impidió conferirle tal propiedad. Se tiene conocimiento q existen enlaces intermoleculares entre flavonoides y las proteínas de la sangre, como por ejemplo la quercitina y la albúmina, haciendo que estos compuestos fenólicos se retengan en el torrente circulante por lo que su eliminación del organismo se vuelve lenta (D'Archivio *et al.* 2010). En el presente caso, el hecho de no observar cambios en el potencial antioxidante en plasma pudo deberse a la ausencia de dichos enlaces entre los compuestos del EAN y los componentes de la sangre, generando un tránsito rápido de estos compuestos con la consecuente ausencia antioxidante en las determinaciones. Algunos autores como Silvina y Balz (2006), afirman que de presentarse capacidad antioxidante en plasma después del consumo de alimentos ricos en flavonoides, obedece no precisamente a los flavonoides, sino, al incremento de sus metabolitos como el ácido úrico.

Uno de los biomarcadores más conocidos y utilizados para medir el índice de peroxidación lipídica, es la concentración de malondialdehído en tejidos. En el

ensayo realizado por Ohta *et al.* (2009), se afirma que la concentración de lipoperóxidos en el suero de ratas aumenta al ser sometidas a estrés por inmersión en agua (WIRS) durante 6h, en comparación con aquellas que no recibieron este tipo de estrés, sin embargo a las ratas que se les pre administró una dosis de vitamina E, mostraron una reducción significativa en sus niveles de lipoperóxidos en el suero. Por su parte, Musalmah *et al.* (2002) reportaron que la suplementación con un extracto que contenía α -tocoferol, influyó en la disminución de los niveles de malondialdehído en plasma de ratas diabéticas; disminuyendo de forma proporcional al aumento en la concentración del extracto. Este efecto también fue observado por Ohta *et al.* (2009), al administrar la vitamina E a diferentes concentraciones.

En el presente estudio, los resultados fueron diferentes a los anteriores, al no haberse observado el efecto del estrés en la generación de subproductos de oxidación de lípidos, como el MDA. Por su parte, la dosificación con el extracto de nopal tampoco influyó en estos resultados en los diferentes grupos, con respecto al grupo basal. Este hecho sugiere que los radicales libres como el superóxido ($\bullet\text{O}^-$) producidos por el estrés, los cuales afectan directamente a los lípidos poliinsaturados de la membrana celular, fueron dismutados oportunamente por el sistema de defensa enzimático antioxidante del jerbo, impidiendo la acumulación de subproductos de oxidación en el plasma. Otra posible explicación de la ausencia de incremento de MDA en plasma puede ser que el tiempo de estrés por 4h haya sido insuficiente para generar daño en los compuestos lipídicos de las células, abriendo la posibilidad para futuras investigaciones de aumentar dicho periodo a 6h.

Michiels *et al.* (1993), afirman que la actividad antioxidante enzimática celular se incrementa cuando éstas son sometidas a un cuadro severo de estrés oxidativo. Un parámetro importante en la medición de estrés oxidativo y su modificación por la suplementación del ELN, fue la medición de actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual es considerada como la primera del

sistema de defensa enzimático contra la oxidación producida por las EROs. Debido a que esta enzima es altamente específica en su forma de acción catalítica, las modificaciones en su actividad pueden ser interpretadas como indicadores de la participación de radicales libres de oxígeno en la patogénesis de un proceso oxidativo (Pihan *et al.* 1987). En la presente investigación se observó un incremento en la actividad de la SOD hepática inmediatamente al término del periodo de estrés (0h) en los organismos control. El incremento de actividad de esta enzima es considerado como un mecanismo de protección de los organismos cuando enfrentan una condición de estrés oxidativo (Kawai *et al.* 1988). Los organismos administrados con ELN mostraron una actividad enzimática significativamente inferior con respecto a los controles a las 0, 48 y 96h; lo cual pone en evidencia el efecto del nopal como factor regulador de los efectos del estrés, probablemente debido a que alguno de los compuestos fenólicos o sus metabolitos, tienen un efecto directo a nivel hepático mediante su posible unión a algún receptor.

La glutatión peroxidasa (GPx) es otra enzima específica en su forma de acción, que consiste en la reducción del hidroperóxido de hidrógeno. Se ha demostrado que 4h después de un estímulo de estrés en ratas, los niveles de hidroperóxidos en el hígado aumentan (Kawai *et al.* 1988). El hígado es un órgano considerado importante en el metabolismo de los peróxidos, de ahí la relación directa con el incremento de actividad enzimática (GPx) frente al daño oxidativo.

Se observó que durante las primeras 24h post estrés, la actividad enzimática aumentó de forma considerable, siendo esto una muestra notoria de que el estrés inducido por inmersión en agua generó cambios detectables a nivel hígado y posteriormente ésta decayó hasta alcanzar niveles semejantes a los del grupo basal. Tomando esto en cuenta y extrapolándolo a un estudio realizado en plasma por Arakawa *et al.* (1997) donde observaron una similar tendencia en los resultados, dieron como posible explicación a que los sistemas adrenérgicos y colinérgicos juegan un papel importante en la patogénesis del incremento de la actividad de las enzimas en plasma; esto nos lleva a observar que el estrés si tuvo

influencia y a encontrar una posible explicación del aumento de la actividad enzimática en hígado durante las primeras 24 horas y su decremento posterior a este tiempo. A su vez, se observó que la diferencia en la actividad de la enzima GPx entre los organismos con tratamiento EAN, y los controles, no fue significativa a las 0h, sin embargo, fue evidente una actividad disminuida en los primeros lo cual puede atribuirse al efecto regulador del nopal.

La reducción del contenido de la glucosa en plasma fue significativamente alto tanto en los grupos con y sin tratamiento con EAN como respuesta al estrés, al ser comparados con el grupo basal. Este comportamiento a las 0 y 24h podría obedecer a una considerable utilización de este compuesto durante el estrés por inmersión, no compensado con la síntesis de la misma (o gluconeogénesis). Resultados opuestos fueron observados por Odio y Maickel (1985), en ratas sometidas a estrés por inmovilización las cuales mostraron un aumento significativo de la glucosa en plasma, atribuida por los autores a una baja utilización del compuesto en dichas condiciones de estrés. La heterogeneidad de las respuestas puede corresponder a las características específicas de ambos modelos o especies. Otra posible explicación es que el estrés pudo haber provocado una disminución en el funcionamiento de la insulina, y por lo consiguiente, la acumulación de la misma a niveles mayores que el normal, provocando hipoglicemia. Macho *et al.* (1999), confirma que en ratas con estrés por inmovilización, disminuye la capacidad específica de unión de los receptores de la insulina, en tejidos como hígado, adiposo, o músculo esquelético, afectando su función.

Odio y Maickel (1985), refieren de que la respuesta bioquímica que se da ante el daño provocado por el estrés puede ser apreciada a través de diferentes formas de estimulación del estrés, por ejemplo usando bajas temperaturas, inmovilización choques eléctricos, inmersión en agua (WIRS), entre otros. Sin embargo Bagchi *et al.* (1999), hacen referencia de que el método de WIRS incrementa la pérdida de células epiteliales provocando así lesiones macroscópicas en la mucosa gástrica

de ratas así como un incremento en la concentración de radicales $\bullet\text{OH}^-$. Por su parte Arakawa *et al.* (1996), afirman que el estrés por WIRS activa el sistema nervioso simpático periférico por medio de los β -adrenoreceptores, el cual es favorecido también por el incremento de epinefrina (adrenalina), provocando la liberación de enzimas de los diferentes órganos y daño celular.

Por otra parte Kwiecien *et al.* (2002), también demostraron que la generación de especies reactivas de oxígeno por medio de isquemia-reperfusión son capaces de ocasionar daños en la mucosa gástrica con una frecuencia similar a la obtenida por el método de WIRS y por efecto de administrar etanol al 100% y que a su vez esto provoca una disminución del flujo sanguíneo gástrico y cambios inflamatorios.

Trombetta *et al.* (2006), realizaron un estudio con el objeto de evaluar el efecto de un extracto de *Opuntia ficus indica* en la cicatrización de úlceras de la mucosa gástrica. Frente a los resultados, los autores explican que el potencial de cicatrización parte del contenido de polisacáridos presentes en dicho extracto, los cuales ayudan a acelerar dicho proceso. También menciona que la regeneración de los tejidos originales es mucho mayor en heridas tratadas con los extractos generando así una reparación cutánea completa.

Con respecto a lo expuesto anteriormente, la valoración macroscópica de los estómagos realizada en el presente estudio, muestra que el estrés afectó sólo a un número parcial de organismos (25%) del grupo control y al 37.5% del grupo suplementado con EAN a las 0h. Este resultado parece indicar nuevamente una resistencia en los organismos no afectados al presente estímulo de estrés. Por otro lado, la ulceración en la mucosa de la zona glandular del estómago hasta 48h pos-estrés en el 25% de organismos con tratamiento de EAN indica la poca influencia del extracto del nopal y de sus componentes en la prevención y/o curación de las lesiones provocadas por el estrés. Hernández-Muñoz *et al.* (2006), en una investigación con ratas, demostraron que el mucílago del nopal *Opuntia ficus indica* var., Milpa Alta, posee efecto antiinflamatorio y cicatrizante en úlceras provocadas por ingestión de alcohol, promoviendo el proceso de curación por lo

menos en tres formas: formando una cubierta de protección física de la mucosa gástrica contra el daño provocado por los radicales libres, promoviendo la restauración de la superficie del epitelio del estómago, y favoreciendo la estabilización de las membranas plasmáticas del tejido. La ausencia de protección de la mucosa gástrica de los organismos afectados en este estudio pudo obedecer al poco contenido de mucílago en las dosis administradas. Finalmente, se demuestra en este trabajo que los órganos blanco del estrés por inmersión en el jerbo, *Meriones unguiculatus*, fueron el hígado y el estómago, los cuales fueron afectados en su funcionamiento o en su anatomía.

CONCLUSIONES

1. El contenido de compuestos polifenólicos en el extracto acuoso de los cladodios de nopal fue de 14 ± 0.0007 mg de EAG/ g nopal p.s., en tanto que de flavonoides fue de 3 ± 0.17 mg ER/ g nopal p.s.
2. En las pruebas *in vitro*, se demostró que dicho extracto posee actividad antirradical de DPPH, y reductora de iones metálicos como el Fe^{3+} , las cuales aumentan conforme se incrementa la concentración.
3. El extracto acuoso no presentó actividad antirradicales superóxido ($\cdot\text{O}^-$), ni hidroxilo ($\cdot\text{OH}^-$).
4. En el estudio *in vivo*, el estrés por inmersión en agua (4h), indujo estado de estrés oxidativo en los animales experimentales, evidente en hígado y estómago. En plasma, no se observaron cambios significativos en cuanto a su potencial antioxidante, ni en los niveles de malondialdehído (MDA).
5. En hígado, la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa fueron incrementadas significativamente por el efecto de estrés. Dicho incremento fue disminuido con la administración del extracto acuoso de nopal (EAN).
6. En el estómago, el estrés por inmersión provocó la formación de úlceras en la mucosa gástrica de la región antral, las cuales no fueron disminuidas con la administración del extracto.
7. Los cambios significativos que se observaron en la concentración de glucosa en sangre de los animales frente al estrés, no fueron modificados por el extracto acuoso suplementado.
8. Finalmente, se puede afirmar que el extracto de nopal *Opuntia ficus-indica*, variedad Milpa Alta, tuvo un efecto regulador del estrés oxidativo inducido en los animales, en las condiciones del presente estudio.

ABREVIATURAS

B	Grupo Basal
C	Grupo sin tratamiento
CAT	Catalasa
CS	Capacidad secuestrante
DPPH	1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo
E	Epinefrina
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EAN	Extracto acuoso de nopal
ELN	Extracto liofilizado de nopal
ER	Equivalentes a rutina
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FRAP	Poder antioxidante de reducción férrica
G	Glucosa
GHS	Glutación
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSSG	Glutación oxidado
HLC	Hormona corticotrópica del hipotálamo
HPA	Hipotálamo pituitario adrenal
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
INT	Colorante indicador
LPO	Peroxidación lipídica
LPS	Lipopolisacáridos
MDA	Malondialdehído
NBT	Nitroazul de tetrazolium
NE	Norepinefrina

•ONOO ⁻	Peroxinitrito
p.s.	peso seco
SNS	Sistema nervioso simpático
SOD	Superóxido Dismutasa
T	Grupo con tratamiento
TBA	Ácido tiobarbitúrico
WIRS	Restricción de movimiento e inmersión en agua
XO	Xantina oxidasa
ZDF	Zucker diabetic fatty

ANEXO I

a) Cuantificación de MDA

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
C0 vs. T0	2.228	0.015	H0
C0 vs. C1	2.228	0.098	H0
C0 vs. T1	2.228	0.975	H0
C0 vs. CII	2.228	0.667	H0
C0 vs. TII	2.228	0.596	H0
C0 vs. CIII	2.228	0.328	H0
C0 vs. TIII	2.228	2.542	H1
C0 vs. B	2.228	1.571	H0

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
C1 vs. T0	2.228	0.119	H0
C1 vs. T1	2.228	0.851	H0
C1 vs. CII	2.228	0.682	H0
C1 vs. TII	2.228	0.629	H0
C1 vs. CIII	2.228	0.377	H0
C1 vs. TIII	2.228	2.275	H1
C1 vs. B	2.228	1.165	H0

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
CII vs. T0	2.228	0.750	H0
CII vs. T1	2.228	2.034	H0
CII vs. TII	2.228	1.453	H0
CII vs. CIII	2.228	0.016	H0
CII vs. TIII	2.228	2.445	H1
CII vs. B	2.228	3.430	H1

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
CIII vs. T0	2.228	0.331	H0
CIII vs. T1	2.228	1.006	H0
CIII vs. TII	2.228	0.052	H0
CIII vs. TIII	2.228	1.016	H0
CIII vs. B	2.228	1.132	H0

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
B vs. T0	2.228	1.936	H0
B vs. T1	2.228	0.210	H0
B vs. TII	2.228	2.106	H0
B vs. TIII	2.228	6.874	H1

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
T0 vs. T1	2.228	1.026	H0
T0 vs. TII	2.228	0.635	H0
T0 vs. TIII	2.228	2.927	H1
T1 vs. TII	2.228	1.365	H0
T1 vs. TIII	2.228	2.587	H1
TII vs. TIII	2.228	1.665	H0

b) Capacidad de reducción férrica (FRAP)

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
C0 vs. T0	2.228	0.190	H0
C0 vs. C1	2.228	0.884	H0
C0 vs. T1	2.228	0.914	H0
C0 vs. CII	2.228	0.634	H0
C0 vs. TII	2.228	0.216	H0
C0 vs. CIII	2.228	1.594	H0
C0 vs. TIII	2.228	0.946	H0
C0 vs. B	2.228	0.546	H0

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
C1 vs. T0	2.228	0.874	H0
C1 vs. T1	2.228	0.041	H0
C1 vs. CII	2.228	0.051	H0
C1 vs. TII	2.228	0.313	H0
C1 vs. CIII	2.228	0.905	H0
C1 vs. TIII	2.228	0.167	H0
C1 vs. B	2.228	0.624	H0

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
CII vs. T0	2.228	0.599	H0
CII vs. T1	2.228	0.020	H0
CII vs. TII	2.228	0.303	H0
CII vs. CIII	2.228	0.708	H0
CII vs. TIII	2.228	0.081	H0
CII vs. B	2.228	0.453	H0

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
CIII vs T0	2.228	1.596	H0
CIII vs. T1	2.228	0.867	H0
CIII vs. TII	2.228	1.003	H0
CIII vs. TIII	2.228	0.720	H0
CIII vs. B	2.228	1.434	H0

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
B vs T0	2.228	0.603	H0
B vs. T1	2.228	0.627	H0
B vs. TII	2.228	0.027	H0
B vs. TIII	2.228	0.726	H0

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
T0 vs T1	2.228	0.905	H0
T0 vs. TII	2.228	0.165	H0
T0 vs. TIII	2.228	0.931	H0
T1 vs. TII	2.228	0.341	H0
T1 vs. TIII	2.228	0.128	H0
TII vs. TIII	2.228	0.422	H0

c) Concentración de glucosa

<i>Comparaciones</i>	<i>T tablas</i>	<i>T calc</i>	<i>R.D.</i>
C0 vs. T0	2.262	0.432	H0
C0 vs. C1	2.306	1.452	H0
C0 vs. T1	2.306	2.093	H0
C0 vs. CII	2.306	9.500	H1
C0 vs. TII	2.306	14.262	H1
C0 vs. CIII	2.262	4.456	H1
C0 vs. TIII	2.262	7.351	H1
C0 vs. B	2.262	3.771	H1

<i>Comparaciones</i>	<i>T tablas</i>	<i>T calc</i>	<i>R.D.</i>
C1 vs. T0	2.228	1.987	H0
C1 vs. T1	2.228	0.230	H0
C1 vs. CII	2.228	6.976	H1
C1 vs. TII	2.228	10.862	H1
C1 vs. CIII	2.228	3.691	H1
C1 vs. TIII	2.228	5.611	H1
C1 vs. B	2.228	2.249	H1

<i>Comparaciones</i>	<i>T tablas</i>	<i>T calc</i>	<i>R.D.</i>
CII vs. T0	2.228	9.959	H1
CII vs. T1	2.228	7.476	H1
CII vs. TII	2.228	0.504	H0
CII vs. CIII	2.228	0.844	H0
CII vs. TIII	2.228	1.918	H0
CII vs. B	2.228	5.011	H1

<i>Comparaciones</i>	<i>T tablas</i>	<i>T calc</i>	<i>R.D.</i>
CIII vs T0	2.228	5.098	H1
CIII vs. T1	2.228	3.697	H1
CIII vs. TII	2.228	0.557	H0
CIII vs. TIII	2.228	0.489	H0
CIII vs. B	2.228	2.602	H1

<i>Comparaciones</i>	<i>T tablas</i>	<i>T calc</i>	<i>R.D.</i>
B vs T0	2.228	4.526	H1
B vs. T1	2.228	2.295	H1
B vs. TII	2.228	6.160	H1
B vs. TIII	2.228	3.400	H1

<i>Comparaciones</i>	<i>T tablas</i>	<i>T calc</i>	<i>R.D.</i>
T0 vs T1	2.262	2.977	H1
T0 vs. TII	2.262	17.645	H1
T0 vs. TIII	2.228	8.502	H1
T1 vs. TII	2.306	13.826	H1
T1 vs. TIII	2.262	6.304	H1
TII vs. TIII	2.262	2.061	H0

d) Actividad GPx

<i>Comparaciones</i>	<i>T tablas</i>	<i>T calc</i>	<i>R.D.</i>
C0 vs. T0	2.306	1.193	H0
C0 vs. C1	2.306	1.994	H0
C0 vs. T1	2.306	0.216	H0
C0 vs. CII	2.306	4.894	H1
C0 vs. TII	2.306	6.194	H1
C0 vs. CIII	2.306	5.443	H1
C0 vs. TIII	2.306	4.351	H1
C0 vs. B	2.365	5.296	H1

<i>Comparaciones</i>	<i>T tablas</i>	<i>T calc</i>	<i>R.D.</i>
C1 vs. T0	2.306	1.491	H0
C1 vs. T1	2.306	2.320	H1
C1 vs. CII	2.306	2.702	H1
C1 vs. TII	2.306	3.695	H1
C1 vs. CIII	2.306	3.000	H1
C1 vs. TIII	2.306	2.160	H0
C1 vs. B	2.365	3.139	H1

<i>Comparaciones</i>	<i>T tablas</i>	<i>T calc</i>	<i>R.D.</i>
CII vs. T0	2.306	6.234	H1
CII vs. T1	2.306	6.680	H1
CII vs. TII	2.306	0.675	H0
CII vs. CIII	2.306	0.099	H0
CII vs. TIII	2.306	0.629	H0
CII vs. B	2.365	0.526	H0

<i>Comparaciones</i>	<i>T tablas</i>	<i>T calc</i>	<i>R.D.</i>
CIII vs T0	2.228	9.210	H1
CIII vs. T1	2.228	8.733	H1
CIII vs. TII	2.228	1.251	H0
CIII vs. TIII	2.228	0.673	H0
CIII vs. B	2.228	0.915	H0

<i>Comparaciones</i>	<i>T tablas</i>	<i>T calc</i>	<i>R.D.</i>
B vs T0	2.228	9.608	H1
B vs. T1	2.228	8.724	H1
B vs. TII	2.228	0.071	H0
B vs. TIII	2.228	1.208	H0

<i>Comparaciones</i>	<i>T tablas</i>	<i>T calc</i>	<i>R.D.</i>
T0 vs T1	2.306	1.819	H0
T0 vs. TII	2.306	13.936	H1
T0 vs. TIII	2.306	5.800	H1
T1 vs. TII	2.306	11.800	H1
T1 vs. TIII	2.306	6.415	H1
TII vs. TIII	2.365	1.628	H0

e) Actividad SOD

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
C0 vs. T0	2.228	3.583	H1
C0 vs. CI	2.228	3.748	H1
C0 vs. TI	2.228	4.128	H1
C0 vs. CII	2.228	5.289	H1
C0 vs. TII	2.228	8.401	H1
C0 vs. CIII	2.228	3.672	H1
C0 vs. TIII	2.228	5.496	H1
C0 vs. B	2.228	5.472	H1

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
CI vs. T0	2.228	0.647	H0
CI vs. TI	2.228	1.357	H0
CI vs. CII	2.228	3.773	H1
CI vs. TII	2.228	15.067	H1
CI vs. CIII	2.228	0.341	H0
CI vs. TIII	2.228	4.196	H1
CI vs. B	2.228	4.219	H1

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
CII vs. T0	2.228	4.099	H1
CII vs. TI	2.228	2.800	H1
CII vs. TII	2.228	4.257	H1
CII vs. CIII	2.228	2.982	H1
CII vs. TIII	2.228	0.267	H0
CII vs. B	2.228	0.139	H0

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
CIII vs T0	2.228	0.731	H0
CIII vs. TI	2.228	0.628	H0
CIII vs. TII	2.228	9.608	H1
CIII vs. TIII	2.228	3.322	H1
CIII vs. B	2.228	3.283	H1

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
B vs T0	2.228	4.572	H1
B vs. TI	2.228	2.983	H1
B vs. TII	2.228	4.118	H1
B vs. TIII	2.228	0.137	H0

Comparaciones	T tablas	T calc	R.D.
T0 vs TI	2.228	1.897	H0
T0 vs. TII	2.228	15.983	H1
T0 vs. TIII	2.228	4.531	H1
TI vs. TII	2.228	11.379	H1
TI vs. TIII	2.228	3.179	H1
TII vs. TIII	2.228	3.979	H1

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd M., Okada K. and Yasuda J. *Oxidative stress and bovine liver diseases: Role of glutathione peroxidase and glucose 6-phosphate dehydrogenase*. Japanese Journal of Veterinary Research, 2007, p. 163-173.
- Alessio H.H., Hogerman A.E. *Oxidative Stress, Exercise and Aging*. Ed. Imperial College Press, Miami University, USA, 2006, p. 1-7.
- Arakawa H., Kodama H., Matsuoka, Yamaguchi I. *Stress Increases Plasma Enzyme Activity in Rats: Differential Effects of Adrenergic and Cholinergic Blockades*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics V. 280 N. 3, 1997, p. 1296-1303.
- Arzate R. E., Tesis de Licenciatura: *Alimentos funcionales de México: Determinación del perfil de compuestos bioactivos en nopal deshidratado*. Tesis Facultad de Química, UNAM, 2007.
- Bagchi D., Carryl O.R., Tran M.X., Bagchi M., Garg A., Milnes M.M., Williams C.B., Balmoori J., Mitra S., Stohs S.J. *Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal mucosa injury in rats and protection by bismuth subsalicylate*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1999, p. 109-116.
- Balz F. *Molecular and biological mechanisms of antioxidant action*. The FASEB Journal V.13, USA, 1999, p. 963-964.
- Bedi, M. & Shenefelt, P. *Herbal therapy in dermatology*. Archives of Dermatology 138, 2002, p. 232-242.
- Benzie F. and Strain J. *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay*. Analytical Biochemistry 239, 1996, p. 70-76.
- Bielski B., Shlue GG, Bajuk S. *Reduction of nitro tetrazolium by CO_2^- and O_2^- radicals*. Journal of Physical Chemistry 84, 1980, p. 830-833.

- Botsoglou N.A., Fletouris D.J., Papageorgiou G.E., Vassilopoulos V.N., Mantis A. J., Trakatellis A.G. *Rapid Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Peroxidation in Animal Tissue, Food, and Feedstuff Samples.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, p.1931-1937.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity.* Lebensm.-Wiss. Technol., 1995, p. 25-30.
- Calva P. V. *Entre nopales, tunas y xoconostles.* Consejo Mexicano de Nopal y Tuna A.C. (CoMeNTuna).
- Ceriello A. *Oxidative Stress and Glycemic Regulation.* Metabolism V. 49, N. 2, 2000, p 27-29.
- Cho JY; Park SC; Kim TW; Kim KS; Song JC; Kim SK; Lee HM; Sung HJ; Park HJ; Song YB; Yoo ES; Lee CH; Rhee MH. *Radical scavenging and anti-inflammatory activity of extracts from Opuntia humifusa Raf.* Journal of Pharmacy and Pharmacology 58, 2006, p. 113-119.
- Chuquimia F., Alvarado J.A., Peñarrieta J.M., Bergenståhl B., Åkesson B. *Determinación de la capacidad antioxidante y la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoidicos de cuatro especies vegetales de la región andina de Bolivia.* Revista Boliviana de Química. V. 25, N.1, 2008., p.75-83
- Comisión Nacional de las Zonas Áridas (CONAZA). *Usos y Aplicaciones del Nopal.* Instituto Nacional de Ecología (INE), SEMARNAT, 1º Ed., México, 1994, p. 1-31.
- Corral-Aguayo R., Yahia E.M., Carrillo-López A., González-Aguilar G. *Correlation between Some Nutritional Components and the Total Antioxidant Capacity Measured with Six Different Assays in Eight Horticultural Crops.* Agricultural and Food Chemistry 56, 2008, p. 10498-10504.
- D'Archivio M, Filesis C, Vari R, Sczzochio B y Marsella R. *Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies.* Int. J. Mol. Sci. 2010, 11, 1321-1342.
- De la Rosa, J.P. y Santana, D. *El nopal. Usos, manejo agronómico y costos de producción en México.* CONAZA-UACH-CIESTAAM, Texcoco, 2001, p. 23-35.

- Dorado M. C., Rugerio V.C., Rivas A.S. *Estrés Oxidativo y Neurodegeneración*. Revista de la Facultad de Medicina, UNAM. V. 46 N. 6, 2003, p. 229-235.
- Eggenberg J. *Inflammation and Oxidative Damage during Exam Stress*. Tesis Universidad de Pittsburg, 2006, p.1-69.
- Esterbauer H, Rotheneder M, Striegl G, Waeg G, Ashy A, Sattler W, Jtirgens G. *Vitamin E and other lipophilic antioxidants protect LDL against oxidation*. Fat Sci. Technology, 1989, p.316-324.
- Ferrandiz ML, Alcaraz MJ. *Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids*. Agents Actions 32, 1991, p. 83-288.
- Flores Valdez C.A., De Luna Esquivel J.M., Ramírez Moreno P.P. *MERCADO MUNDIAL DEL NOPALITO*. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA); Universidad Autónoma Chapingo (UACH); Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y de la Agricultura Mundial (CIESTAAM), México, 1995, p.p. 1-112.
- Food and Agriculture Organization (FAO). *Boletín de Servicios Agrícolas*, 2006.
- Forstrom J.W., Zakowski J.J., Tappel A.L. *Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine*. Biochemistry 17, 1978, p. 2639-2644.
- Frati M. AC., Vera L.O., Ariza A. CR. *Evaluation of Nopal Capsules in Diabetes mellitus*. Gaceta Médica de México 128, 1992, p.431-436.
- Frati M. AC., Gordillo BE., Altamirano P., Ariza CR., Cortés FR., Chávez NA., Islas A. *Influence of nopal intake upon fasting glycemia in type II diabetics and healthy subjects*. Archivos de Investigación Médica. 22, México, 1991, p.51-56.
- Galati E. M., Monforte M.T., Tripodo M.M., d'Aquino A., Mondello M.R. *Opuntia ficus-indica (L.) Mill (Cactaceae): ultrastructural study*. Journal of Ethnopharmacology 76, 2001, p. 1-9.
- Galati E. M., Monforte M. T. et al. *Opuntia ficus indica (L.) Mill. Mucilages show Cytoprotective Effect on Gastric Mucosa in Rat*. Wiley InterScience, 2007, p. 344-346.

- Galindo-Leal C. *Entre nopales, tunas y xoconostles*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), 2008.
- Gallegos-Infante J.A., Rocha-Guzman N.E., González-Laredo R.F., Reynoso-Camacho R., Medina-Torres L., Cervantes-Cardozo V. *Effect of air flow rate on the polyphenols content and antioxidant capacity of convective dried cactus pear cladodes (Opuntia ficus indica)*. International Journal of Food Science and Nutrition, 60, 2009, p. 80-87.
- García M. J. *Estado Oxidativo Metabólico y Afectación Retiniana en Diabetes Mellitus e Hipertensión Arterial*. Servei de Publicacions, 2006, p. 19-102.
- Ginestra G., Parker M.L., Bennett R.N., Robertson J.; Mandalari G., Narbard A., Lo Curto R.B., Bisignano G., Faulds C.B., Waldron K.W. *Anatomical, Chemical, and Biochemical Characterization of Cladodes from Prickly Pear [Opuntia ficus-indica (L.) Mill.]* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, p. 10323-10330.
- Guevara-Figueroa T. Jiménez-Islas H., Reyes-Escogido M., Mortensen A., Laursen B., Lin L.W., León-Rodríguez A., Fomsgaard I., Barba de la Rosa A. *Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids, characterization of commercial and wild nopal (Opuntia spp.)*. Journal of Food Composition and Analysis, 23, 2010, p. 525-532.
- Gutiérrez-Avella D.M., Ortiz-García C.A., Mendoza-Cisneros A. *Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal*. Simposio de Metrología Octubre, Santiago de Querétaro, México, 2008.
- Habibi Y., Mahrouz M. & Vignon M.R. *Microfibrillated cellulose from the peel of prickly pear fruits*. Food Chemistry 115, 2009, p. 423-429.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. and Aruoma O.I. *The Deoxyribose Method: A Simple "Test-Tube" Assay for Determination of Rate Constants for Reaction of Hydroxyl Radicals*. Analytical Biochemistry 165, 1987, p. 215-219.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. *Hidroxy radical assayed by aromatic hydroxylation and deoxyribose degradation*. Handbook of methods for oxygen radical research. Greewald, 1995.

- Halliwell B. *Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans.* Free Radical Research 25, 1996, p. 57-74.
- Hernández-Muñoz R., Vázquez-Ramírez R., Olguín-Martínez M., Kubli-Garfias C. *Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of Opuntia ficus-indica mucilage.* World J Gastroenterol, 2006, p. 4318-4324.
- Hollman, P. C. & Katan, M. B. *Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability.* Food Chem. Toxicology. 37, 1999, p.937-942.
- Ikawa H., Kamitani H., Calvo B.F., Foley J.F., Eling T.E. *Expression of 15-Lipoxygenase-1 in human colorectal Cancer.* Cancer Research 59, 1999, p. 360-366.
- Jaramillo-Flores M.E., González-Cruz L., Cornejo-Mazón M., Dorantes-Álvarez L., Gutiérrez-López G.F., Hernández-Sánchez H. *Effect of thermal treatment on the antioxidant activity and content of carotenoids and phenolic compounds of cactus pear cladodes (o. ficus-indica).* Food Science technology, 2003, p. 271-278.
- Jurd L. *Aluminum complexes of phenolic flavones. Spectral and structural correlations.* Phytochemistry V. 8, 1969, p. 445-462.
- Jovanovic SV & Simic MG. *Antioxidants in nutrition.* Annals NY Academy of Sciences. 2000; p. 326-34.
- Kawai S., Komura J., Asada Y., Niwa Y. *Experimental burn-induced changes in lipid peroxide levels, and activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in skin lesions, serum, and liver of mice.* Archives of Dermatological Research, V. 280 N. 3, 1988, p. 171-175.
- Konturek P. Ch., Duda A., Brzozowski T., Konturek S.J., Kwiecien S., Drozdowicz D., Pajdo R., Meixner H., Hahn E.G. *Activation of Genes for Superoxide Dismutase, Interleukin-1 β , Tumor Necrosis factor- α , and Intercellular Adhesion Molecule-1 during Healing of Ischemia-Reperfusion-Induced Gastric Injury.* Scand J Gastroenterol, 2000, p. 452-463.

- Kohri T, Matsumoto N, Yamahawa M, Suzuki M, Nanjo F, Hara Y. *Metabolic fate of (-)- [4-3H] epigallocatechin gallate in rats after oral administration.* Journal Agriculture Food Chemistry, 2001, p. 4102–4112.
- Kumaran A. and Karunakaran R. J. *In vitro antioxidant of methanol extracts of five Phyllanthus species from India.* LWT 40, 2007, p. 344-352.
- Kwiecien S., Brzozowski T. and Konturek S.J. *Effects of Reactive Oxygen Species Action on Gastric Mucosa in Various Models of Mucosal Injury.* Journal of Physiology and Pharmacology, 2002, p. 39-50.
- Lee J.C. Kim H.R., Kim J., Jang Y.S. *Antioxidant Property of an Ethanol Extract of the Stem of Opuntia ficus-indica var. Saboten.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, p.6490-6496.
- Lima Hernández L.B. *Estrés Oxidativo y Antioxidantes: Actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos.* Revista Cubana, 2001, p. 1-8.
- Limón-P.J. & Gonsebatt M. E. *The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress.* Mutation Research 674, 2009, p.137-147.
- Lindahl M, Tagesson C. *Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2.* Inflammation 21, 1997, p. 347-356.
- Macho L., Fickova M., Zorad S., Kvetnansky R. *Changes of insulin binding in rat tissues after exposure to stress.* Physiology Research, 1999, p.51-58.
- Magloire Feugang J., Konarski P. Zou D., Conrad Stintzing F., Zou C. *Nutritional and medicinal use of Cactus pear (Opuntia spp.) cladodes and fruits.* Frontiers in Bioscience 11, 2006, p. 2574-2589.
- Martínez-Florez S., et al. *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes.* Nutrición Hospitalaria 6, 2002, p. 271-278.
- Martínez-Valverde I., Periago M.J., Ros G. *Significado Nutricional de los Compuestos Fenólicos en la Dieta.* Archivos Latinoamericanos de Nutrición V.50, 2000, p. 5-18.

- Matthäus B. *Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Residues of Different Oilseeds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, p. 3444-3452.
- Medina-Torres L., Brito-De la Fuente E., Torrestiana-Sánchez B., Katthain R. 2000. *Rheological properties of the mucilage gum (Opuntia ficus-indica)*. Food Hydrocolloids. 2000, p. 417-424.
- Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J. *Importance of Cu/Sn-SOD for Se-Glutathione Cell Survival Peroxidase, Catalase, and against Oxidative Stress*. Free Radical Biology & Medicine, V. 17. N. 3, 1994, p. 235-248.
- Morel I, Lescoat G, Cogrel P. *Antioxidant and iron chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocytes cultures*. Biochemical Pharmacology 45, 1993, p.13-19.
- Murrant C. & Reid M. *Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle*. Microscopy Research and Technique 55, 2001, p.236-248.
- Musalmah M., Fairuz A.H., Gapor M.T., Wan-Ngah W.Z. *Effect of vitamin E on plasma malondialdehyde, antioxidant enzyme levels and the rates of wound closures during wound healing in normal and diabetic rats*. Journal of Clinical Nutrition 11, 2002, p. S448-S451.
- Nobel P., Cavelier J. y Andrade J. L. *Mucilage in cacti: its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations*. J. Experim. Botany 43, 1992, p. 641 – 648.
- Noroozi M, Angerson WJ, Lean ME. *Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes*. American Journal of Clinical Nutrition 67, 1988, p. 1210-1218.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Odio M. R. & Maickel R. P. *Comparative Biochemical Responses of Rats to Different Stressful Stimuli*. Physiology & Behavior V. 34, 1985, p.595-599.
- Ohta Y., Kaida S., Chiba S., Tada M., Teruya A., Imai Y., Kawanishi M. *Involvement of Oxidative Stress in Increases in the Serum Levels of various*

- enzymes and components in rats with Water-Immersion Restraint Stress.* Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 45, 2009, p. 347-354.
- Ortiz F. H., Sánchez F. W., Méndez J., Murillo E. *Potencial antioxidante de hojas y corteza de Bauhinia kalbreyeri harms: contribución de sus flavonoides en esta actividad.* Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, V.33, N127, 2009, p. 183-191.
 - Park Eun-H., Kahng Ja-H. Hyun Lee S., Shin K.H. *An anti-inflammatory principle from cactus.* Fitoterapia 72, 2001, p. 288-290.
 - Pérez G.R. *Fundamentos del Trabajo con Animales de Laboratorio en Proyectos de Investigación.* Revista del Hospital J. M. Ramos Mejía V.XII N. 3, 2007, p. 1-10.
 - Pihan G, Regillo C. and Szabo S. *Free Radicals and Lipid Peroxidation in Ethanol or Aspirin Induced Gastric Mucosal Injury.* Digestive Diseases and Sciences, V.32, N12, 1987, p. 1395-1401.
 - Pilz J., Meineke I. and Gleiter C.H. *Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative.* Journal of Chromatography B., 2002, p. 315-325.
 - Ratty AK, Das NP. *Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship.* Biochemical Medicine and Metabolic Biology 39, 1988, p. 69-79.
 - Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios, 1988.
 - Revista SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), *De nuestra cosecha*, 2001.
 - Reznick, A. Z., Cross C. E., Hu M.L. *Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation.* Biochemical Journal 286, 1992, p. 607-611

- Robertson P. *Chronic Oxidative Stress as a Central Mechanism for Glucose Toxicity in Pancreatic Islet Beta Cells in Diabetes*. Journal of Biological Chemistry. V. 279, N. 41, 2004, p. 42351–42354.
- Sáenz C. *Processing technologies: an alternative for cactus pear (Opuntia spp) fruits and cladodes*. J. Arid Environment, 2000, p. 209-225.
- Sánchez-Rodríguez M. A., Santiago-Osorio E., Vargas L.A. *Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo*. Bioquímica, V. 29 N. 3, 2004, p. 81-90.
- Schaffer, C. & Nanney, L. *Cell biology of wound healing*. International Review of Cytology 169, 1996, p. 151-181.
- Scheinvar, L. *Taxonomía de las Opuntias utilizadas en Agroecología, Cultivo y Usos del Nopal*. Estudio FAO Producción y Protección Vegetal N. 132, Roma, 1999, p. 21-28.
- Schmidgall, J. et al. *Evidence for bioadhesive effects of polysaccharides and polysaccharide-containing herbs in an ex vivo bioadhesion assay on buccal membranes*. Planta Medica 66, 2000, p. 48-53.
- Schwedhelm E., Maas R., Troost R., Böger R.H. *Clinical Pharmacokinetics of Antioxidants and Their Impact on Systemic Oxidative Stress*. Clinical Pharmacokinetic, 2003, p. 437-459.
- Seino H., Ueda H., Kokai M., Kashiwamura S., Morita Y., Okamura H. Tsuji N. *IL-18 mediates the formation of stress induced histamine-dependent gastric lesions*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, p.G262-G267.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. *Datos Producción Nopal en México y Milpa Alta*. (SIAP), 2010.
- Siddhuraju P., Mohan P.S., Becker K. *Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (Cassia fistula L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp*. Food Chemistry, 2002, p. 61-67.
- Silvina B. Lotito, Balz Frei. *Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?* Free Radical Biology & Medicine, 2006, p. 1727–1746.

- Stintzing, F. C., Carle, R. *Cactus stems (Opuntia spp.): A review on their chemistry, technology, and uses*. Molecular Nutrition of Food Research 49, 2005, p. 175–194.
- Sudheesh S, Sandhya C, Sarah KA, Vijayalakshmi NR. *Antioxidant activity of flavonoids from Solanum melongena* *Phytother*. 1999, p. 393-396.
- Tornero D., Ceña V., González-García C., Jordán J. *Papel del Poro de Permeabilidad Transitoria Mitocondrial en los Procesos Neurodegenerativos*. Revisión en Neurociencias, 2002, p. 354-361.
- Torres L. M. *El Nopal, sus propiedades medicinales y beneficios*. Revista de la Colección Popular Mina Especial, 2010, p. 1-27.
- Trombetta D., Puglia C., Perri D., Licata A., Pergolizzi S., Lauriano E.R., De Pasquale A., Saija A., Bonina F.P. *Effect of polysaccharides from Ountia ficus-indica (L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat*. *Phytomedicine*, 2006, p. 352-358.
- Turner E., Paynter, W. Montie E., Bessert M., Struck M., Olson F. *Use of the 2-Thiobarbituric Acid Reagent to Measure Rancidity in Frozen Pork*. *Food Technology* 8, 1954, p. 326-330.
- Valente L.M.M., da Paixao D., do Nascimento A.C., Dos Santos P.F.P., Scheinvar L.A., Moura M.R.L., Tinoco L.W., Gomes N.L.F., da Silva J.F.M. *Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of O. monacantha (Cactaceae)*. *Food Chemistry* 123, 2010, p. 1127-1131.
- Velásquez, E. *El nopal y su historia*. Editorial Clío. México, 1998.
- Wagner. J.E. *Mongolian Gerbils: Care, Diseases and Use in Research*. *Laboratory Animal Medicine and Science* S.II, 1999, p.1-18.
- Wingfield, J.C., Junt K., Breuner C., Dunlap K., Fowler G.S., Freed L., Lepson J. *Environmental Stress, Field Endocrinology, and Conservation Biology*. Buchholz, J.R. & R. Clemmons Eds. EUA, 1997, p. 95-131.
- Yuan-Fang Xie, Qing Jiao, Shu Guo, Fu-Zhen Wang, Ji-Min Cao, and Zheng-Guo Zhang. *Role of parasympathetic overactivity in water immersion stress-induced gastric mucosal lesion in rat*. *J Appl Physiol*, 2005, p. 2416–2422.