



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

Departamentos de Morfología y, Fisiología y Farmacología

TESIS:

**“Estudio de la capacidad antioxidante de la tuna *Opuntia streptacantha* y
Opuntia robusta en la intoxicación aguda con Acetaminofén ”**

Que presenta:

QFB. Herson Antonio González Ponce

Para obtener el grado de: Doctorado en Ciencias Biológicas

Tutor(es):

Dra. en C. Ma. Consolación Martínez Saldaña

Dr. en C. Fernando Jaramillo Juárez

Asesora:

Dra. en C. Ana Rosa Rincón Sánchez

Aguascalientes, Ags., Diciembre de 2016



M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

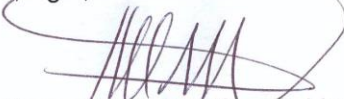
Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **HERSON ANTONIO GONZÁLEZ PONCE** con ID 42412 quien realizó la tesis titulada: **“ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA TUNA OPUNTIA STREPTACANTHA Y OPUNTIA ROBUSTA EN LA INTOXICACIÓN AGUDA CON ACETAMINOFÉN.”**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 28 de noviembre de 2016.



Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña
Tutor de tesis

c.c.p.- Herson Antonio González Ponce
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Dra. Rosa María Chávez Morales - Consejero
c.c.p.- Dr. Ma. Consolación Martínez Saldaña - Secretario Técnico



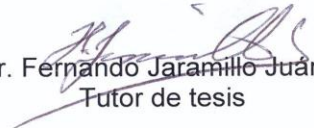
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **HERSON ANTONIO GONZÁLEZ PONCE** con ID 42412 quien realizó la tesis titulada: "**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA TUNA OPUNTIA STREPTACANTHA Y OPUNTIA ROBUSTA EN LA INTOXICACIÓN AGUDA CON ACETAMINOFÉN.**", y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 28 de noviembre de 2016.


Dr. Fernando Jaramillo Juárez
Tutor de tesis

c.c.p.- Herson Antonio González Ponce
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Dra. Rosa María Chávez Morales - Consejero
c.c.p.- Dr. Ma. Consolación Martínez Saldaña - Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **HERSON ANTONIO GONZÁLEZ PONCE** con ID 42412 quien realizó la tesis titulada: **ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA TUNA OPUNTIA STREPTACANTHA Y OPUNTIA ROBUSTA EN LA INTOXICACIÓN AGUDA CON ACETAMINOFÉN**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 28 de noviembre de 2016.

Dra. en C. Ana Rosa Rincón Sánchez
Asesor externo de tesis

- c.c.p.- Interesado
- c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
- c.c.p.- Jefatura del Depto. de Fisiología y Farmacología, y Morfología.
- c.c.p.- Consejero Académico
- c.c.p.- Secretario Técnico



HERSON ANTONIO GONZÁLEZ PONCE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTE.

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“Estudio de la capacidad antioxidante de la Tuna *Opuntia streptacantha* y *Opuntia robusta* en la intoxicación aguda con Acetaminofén”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

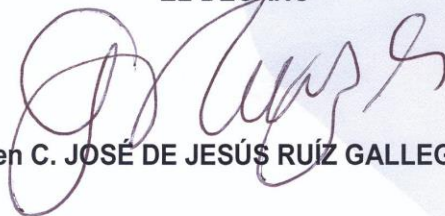
Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 28 de noviembre de 2016

“Se lumen proferre”

EL DECANO



M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.





Article

Hepatoprotective Effect of *Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha* Fruits against Acetaminophen-Induced Acute Liver Damage

Herson Antonio González-Ponce ^{1,5}, María Consolación Martínez-Saldaña ², Ana Rosa Rincón-Sánchez ³, María Teresa Sumaya-Martínez ⁴, Manon Buist-Homan ^{5,6}, Klaas Nico Faber ^{5,6}, Han Moshage ^{5,6} and Fernando Jaramillo-Juárez ^{1,*}

¹ Department of Physiology and Pharmacology, Basic Science Center, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20131, Mexico; herson_qfbd@hotmail.com

² Department of Morphology, Basic Science Center, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20131, Mexico; mcmtzsal@correo.uaa.mx

³ Department of Physiology, University Center of Health Sciences, Universidad de Guadalajara, Guadalajara 44340, Mexico; anarosarincon@yahoo.com.mx

⁴ Food Technology Unit, Secretary of Research and Graduate Studies, Universidad Autónoma de Nayarit, Tepic 63160, Mexico; teresumaya@hotmail.com

⁵ Department of Gastroenterology and Hepatology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen 9713 GZ, The Netherlands; m.buist-homan@umcg.nl (M.B.-H.); k.n.faber@umcg.nl (K.N.F.); a.j.moshage@umcg.nl (H.M.)

⁶ Department of Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen 9713 GZ, The Netherlands

* Correspondence: jara@att.net.mx; Tel.: +52-449-9910-7400 (ext. 345)

Received: 4 July 2016; Accepted: 20 September 2016; Published: 4 October 2016

Abstract: Acetaminophen (APAP)-induced acute liver failure (ALF) is a serious health problem in developed countries. *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), the current therapy for APAP-induced ALF, is not always effective, and liver transplantation is often needed. *Opuntia* spp. fruits are an important source of nutrients and contain high levels of bioactive compounds, including antioxidants. The aim of this study was to evaluate the hepatoprotective effect of *Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha* extracts against APAP-induced ALF. In addition, we analyzed the antioxidant activities of these extracts. Fruit extracts (800 mg/kg/day, orally) were given prophylactically to male Wistar rats before intoxication with APAP (500 mg/kg, intraperitoneally). Rat hepatocyte cultures were exposed to 20 mmol/L APAP, and necrosis was assessed by LDH leakage. *Opuntia robusta* had significantly higher levels of antioxidants than *Opuntia streptacantha*. Both extracts significantly attenuated APAP-induced injury markers AST, ALT and ALP and improved liver histology. The *Opuntia* extracts reversed APAP-induced depletion of liver GSH and glycogen stores. In cultured hepatocytes, *Opuntia* extracts significantly reduced leakage of LDH and cell necrosis, both prophylactically and therapeutically. Both extracts appeared to be superior to NAC when used therapeutically. We conclude that *Opuntia* extracts are hepatoprotective and can be used as a nutraceutical to prevent ALF.

Keywords: *Opuntia* fruits; acetaminophen; acute liver failure; antioxidants; hepatoprotective; nutraceutical

1. Introduction

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) are widely used for the alleviation of pain, fever and inflammation. NSAID are the most widely prescribed medications in the world and are used by millions of patients on a daily basis. However, excessive consumption of NSAID has been related to severe side effects caused by oxidative stress, resulting in considerable morbidity and mortality [1,2]. Acetaminophen (APAP), a non-prescription drug, is a safe and effective analgesic and antipyretic drug

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, la Dra. en C. Ma. Consolación Martínez Saldaña y el Dr. en C. Fernando Jaramillo Juárez por aceptar ser mis mentores, y supervisarme durante mi desarrollo como estudiante e investigador del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, han sido y serán para mí un modelo a seguir, gracias por sus enseñanzas, por la motivación y la oportunidad brindada.

A mi asesora de tesis, la Dra. en C. Ana Rosa Rincón Sánchez quien durante todo este proceso y a pesar de la distancia me brindó sus consejos, enseñanzas y apoyo constante para poder culminar mi proyecto de investigación.

A mis compañeros de laboratorio, el Dr. en C. Francisco A. Posadas del Río, la LCN. María Luisa Rodríguez Vásquez, a la LAQB. Irma G. Reynoso Andeola, al Tec. Raúl Ponce Gallegos, al Dr. en C. Enrique Escárcega González y la LAQB. Sonia Cruz Muñoz por sus consejos, apoyo, y por hacer divertido y productivo el tiempo dedicado a la investigación en el laboratorio y fuera de él.

A mis compañeros de la generación 2012-2016 del Doctorado en Ciencias Biológicas por todo su apoyo, consejos y aportes en el ámbito científico y social.

A todo el personal administrativo del Centro de Ciencias Básicas, del Departamento de Apoyo al Posgrado y del Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca no. 336940 otorgada, y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, al Dr. Prof. Han Moshage y a la Dra. en C. María Teresa Sumaya Martínez por su apoyo administrativo, tecnológico y académico para la realización del presente trabajo de investigación.

DEDICATORIAS

A mi dios:

Por darme vida, salud y la oportunidad de conocer gente maravillosa durante toda mi vida que de alguna forma han contribuido en mi desarrollo personal y profesional.

A mi esposa:

Por todo su amor, compañía, comprensión, paciencia, consejos y apoyo brindados incondicionalmente. ¡Lo logramos amor!

A mis padres:

Por la educación, principios, soporte, consejos y oportunidades brindadas, por su amor y por darme vida. ¡Gracias por creer en mí!

A mis hermanas:

Por todo su cariño, amor y apoyo incondicional en todo momento. ¡Las quiero mil-ocho-mil!

A mis abuelos y tíos:

Por su amor, consejos, apoyo y valores personales. ¡Gracias infinitas!

INDICE GENERAL

Índice de tablas.....	5
Índice de figuras.....	6
Abreviaturas.....	9
Resumen.....	11
Abstract.....	12
1 Introducción.....	13
1.1 Estrés oxidativo celular.....	13
1.1.1 Mecanismos prooxidantes endógenos.....	14
1.1.2 Radicales libres.....	14
1.1.2.1 Radicales libres inorgánicos o primarios.....	15
1.1.2.2 Radicales libres orgánicos o secundarios.....	16
1.1.2.3 Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno.....	16
1.1.3 Mecanismos antioxidantes.....	16
1.1.3.1 Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.....	17
1.1.4 Efecto de los radicales libres (Mecanismo de daño).....	18
1.1.4.1 Oxidación de lípidos.....	19
1.1.4.2 Oxidación de proteínas.....	19
1.1.4.3 Oxidación del ADN.....	20
1.1.5 Factores que incrementan el estrés oxidativo celular.....	21
1.1.5.1 Exposición a fármacos de venta libre. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE's).....	22
1.1.6 Antioxidantes naturales.....	23
1.1.6.1 Fuentes.....	24
1.1.6.1.1 Nopal.....	25
1.1.6.1.2 Tuna.....	26
1.1.6.2 Tipos de antioxidantes naturales.....	27
1.1.6.2.1 Flavonoides.....	28
1.1.6.2.2 Betalaínas.....	31

2 Antecedentes.....33

2.1 Acetaminofén (Paracetamol, APAP, N-acetil-p-aminofenol).....33

2.1.1 Mecanismo de acción del Acetaminofén.....34

2.1.2 Biotransformación del Acetaminofén.....35

2.1.3 Toxocinética del Acetaminofén.....35

2.1.3.1 Iniciación del daño celular inducido con Acetaminofén.....36

2.1.3.2 Disfunción mitocondrial y propagación del daño celular en hepatocitos.....37

2.1.4 Epidemiología del Acetaminofén.....41

2.2 Fitocaracterización de *Opuntia streptacantha* Lemaire y *Opuntia robusta* Wendland.....42

2.2.1 El género *Opuntia*, origen y taxonomía.....42

2.2.2 Evaluaciones previas de la capacidad antioxidante de los frutos de *Opuntia streptacantha* Lemaire y *Opuntia robusta* Wendland.....43

2.2.3 *Opuntia streptacantha* Lemaire.....44

2.2.4 *Opuntia robusta* Wendland.....46

3 Justificación.....48

4 Hipótesis.....50

5 Objetivo general.....50

5.1 Objetivos particulares.....50

6 Diseño experimental.....51

7 Material y métodos.....53

7.1 Recolección de los frutos y método de extracción.....53

7.2 Caracterización de los extractos.....53

7.2.1 Determinación de flavonoides.....53

7.2.2 Determinación de betalaínas.....54

7.2.3 Determinación de ácido ascórbico.....55

7.2.4 Determinación de compuestos fenólicos totales.....56

7.3 Capacidad antioxidante de los extractos.....57

7.3.1 Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS).....57

7.3.2 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP).....59

7.3.3	2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	60
7.3.4	Actividad quelante.....	61
7.3.5	Capacidad de absorción de radicales del oxígeno (ORAC).....	62
7.4	Ensayo biológico.....	64
7.4.1	Pruebas bioquímicas.....	65
7.4.1.1	Alanina aminotransferasa (ALT).....	65
7.4.1.2	Aspartato aminotransferasa (AST).....	66
7.4.1.3	Fosfatasa alcalina (FA).....	66
7.4.1.4	Glutatión reducido (GSH).....	67
7.4.1.5	Malondialdehido (MDA).....	67
7.4.2	Expresión génica relativa.....	68
7.4.2.1	Extracción de mRNA.....	68
7.4.2.2	Síntesis de cADN.....	69
7.4.2.3	Reacción en cadena de la polimerasa-cuantitativa (qPCR).....	70
7.5	Análisis estadístico.....	72
7.6	Histopatología.....	72
7.6.1	Ácido peryódico de Schiff (PAS).....	72
8	Resultados.....	73
8.1	Cuantificación de compuestos bioactivos.....	73
8.1.1	Flavonoides.....	73
8.1.2	Betalainas.....	73
8.1.3	Ácido ascórbico.....	74
8.1.4	Compuestos fenólicos totales.....	75
8.2	Capacidad antioxidante de los extractos.....	76
8.2.1	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS).....	76
8.2.2	Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP).....	77
8.2.3	2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	78
8.2.4	Actividad quelante.....	79
8.2.5	Capacidad de absorción de radicales del oxígeno (ORAC).....	80
8.3	Estandarización del modelo de intoxicación con APAP.....	82

8.4 Ensayo biológico.....	85
8.4.1 Determinación de los marcadores bioquímicos de daño hepático.....	85
8.4.1.1 Alanina aminotransferasa (ALT).....	85
8.4.1.2 Aspartato aminotransferasa (AST).....	86
8.4.1.3 Fosfatasa alcalina (FA).....	88
8.4.1.4 Glutación reducido (GSH).....	89
8.4.1.5 Malondialdehido (MDA).....	90
8.4.2 Expresión génica relativa.....	92
8.4.2.1 Citocromo P-450 isoforma 2E1.....	92
8.4.2.2 Manganeso-Superóxido dismutasa.....	93
8.4.2.3 Cobre/Zinc-Superóxido dismutasa.....	94
8.4.2.4 Glutación peroxidasa.....	96
8.4.2.5 Catalasa	97
8.4.3 Histopatología.....	98
8.4.3.1 Ácido peryódico de Schiff.....	99
9 Discusión.....	101
10 Conclusiones.....	109
11 Bibliografía.....	110

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación científica de <i>Opuntia streptacantha</i> (nopal cardón).....	46
Tabla 2. Clasificación científica de <i>Opuntia robusta</i> (nopal tapón).....	47
Tabla 3. Cantidad obtenida en las determinaciones espectrofotométricas de los principales compuestos antioxidantes presentes en las dos especies de tuna.	82
Tabla 4. Determinación cuantitativa de la capacidad antioxidante de las dos especies de tuna analizadas mediante diferentes metodologías.....	82
Tabla 5. Valores promedio de los principales marcadores bioquímicos de daño hepático en los diferentes grupos experimentales.....	92

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las plantas verdes biosintetizan a los flavonoides a partir de la fenilalanina, teniendo como principal intermediario a la benzo- γ -pirona, cuya estructura se muestra en la figura, así como la numeración de los átomos de sus anillos. Esto es básico para establecer la nomenclatura de los flavonoides derivados de la benzo- γ -pirona.....	28
Figura 2. Los flavonoides son un grupo de compuestos naturales que comparten una estructura básica similar. La gran mayoría son pigmentos ampliamente distribuidos en los alimentos de origen vegetal. En esta figura se presentan las estructuras químicas de los diferentes tipos de flavonoides.....	29
Figura 3. Estructuras generales del ácido betalámico (a), betacianinas (b) y betaxantinas (c).....	32
Figura 4. Estructura química del Acetaminofén (Paracetamol).....	35
Figura 5. Representación esquemática del proceso de biotransformación del Acetaminofén (Paracetamol).....	35
Figura 6. Destoxificación del NAPQI con glutatión reducido (GSH) y toxicidad inducida por sobredosis con acetaminofén (APAP).....	37
Figura 7. Mecanismo de daño celular hepático por intoxicaciones con APAP.....	38
Figura 7. Mecanismo de daño al interior de los hepatocitos inducido con acetaminofén (APAP).....	40
Figura 8. Imagen ilustrativa de <i>Opuntia streptacantha</i> Lemaire (nopal cardón) en estado silvestre (izquierda) y de una penca o cladodio con su fruto (derecha).....	45
Figura 9. Imagen del fruto de <i>Opuntia streptacantha</i> (tuna cardona).....	46
Figura 10. Imagen de un cladodio de <i>Opuntia robusta</i> Wendland (nopal tapón) en estado silvestre con diversos brotes frutales (tuna tapona).....	47
Figura 11. Imagen del fruto maduro de <i>Opuntia robusta</i> Wendland (tuna tapona).....	47
Figura 12. Mapa de la República Mexicana en el que se indica con color verde la principal zona de producción y distribución de las especies <i>Opuntia streptacantha</i> y <i>Opuntia robusta</i> (Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí, Michoacán, Hidalgo, Querétaro y Guanajuato) y con color azul los estados en los que se encuentran en menor proporción (Puebla, Oaxaca, Edo. de México y Tlaxcala).....	48
Figura 13. Curva estándar realizada con quercetina a concentraciones de 0-150 μ g/ml para cuantificar flavonoides totales en las muestras de tuna.....	54
Figura 14. Curva estándar realizada con ácido ascórbico para la cuantificación del mismo en los extractos de tuna tapona y tuna cardona.....	56
Figura 15. Curva estándar del ácido gálico para la cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos en las muestras de tunas tapona y cardona.....	57
Figura 16. Curva estándar con ABTS ⁺ (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) para determinar la capacidad antioxidante de los extractos de tuna tapona y tuna cardona.....	58
Figura 17. Curva estándar con ácido ascórbico para determinar la capacidad antioxidante de las muestras de tuna tapona y tuna cardona por el método FRAP.....	59

Figura 18. Curva estándar con Trolox® para determinar la capacidad antioxidante de la tuna tapona y tuna cardona por el método DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....61

Figura 19. Curva estándar con EDTA (ácido etilendiaminetetraacético) para determinar la capacidad de quelación de las muestras de tuna tapona y cardona.....62

Figura 20. Curva estándar con Trolox® para determinar la Capacidad de Absorción de Radicales del Oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés,) en las muestras de tunas tapona y cardona, mediante la obtención de la ecuación de la recta.63

Figura 21. Decaimiento del porcentaje de fluorescencia equivalente a la capacidad de absorción de radicales del oxígeno en las diferentes concentraciones del estándar empleadas para la curva de calibración64

Figura 22. Contenido total de compuestos flavonoides presentes en la tuna tapona y tuna cardona.....73

Figura 23. Contenido de pigmentos betalánicos (betacianinas, betaxantinas y total) en las muestras de tuna analizadas en el presente estudio.....74

Figura 24. Contenido de ácido ascórbico presente en las muestras analizadas de tuna tapona y tuna cardona.....75

Figura 25. Compuestos fenólicos totales presentes en los extractos de tuna tapona y tuna cardona76

Figura 26. Capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico de los extractos de tuna tapona y tuna cardona por el método ABTS⁺.....77

Figura 27. Capacidad antioxidante de las tunas tapona y cardona medida por el método FRAP (Poder Antioxidante de Reducción Férrica).....78

Figura 28. Valores de la tuna tapona y tuna cardona equivalentes a la capacidad antioxidante del Trolox® por el método DPPH•.....79

Figura 29. Capacidad quelante de la tuna tapona y tuna cardona equivalente a mol de EDTA / L.....80

Figura 30. Capacidad de absorción de radicales del oxígeno de la tuna tapona (azul) y tuna cardona (rojo) diluidas 1:600 del extracto original, lo que indica una fuerte capacidad antioxidante para ambas especies. Dicha capacidad se determinó por la técnica fluorométrica ORAC.....81

Figura 31. Gráfico que indica la cantidad en µM equivalente a Trolox® del extracto de tuna tapona y tuna cardona obtenidos mediante la técnica fluorométrica ORAC81

Figura 32. Valores en suero sanguíneo de ALT (alanina aminotransferasa) de ratas Wistar machos.....83

Figura 33. Concentraciones de GSH (glutación reducido) en homogenizados hepáticos de ratas Wistar machos, a diferentes tiempos post-intoxicación con acetaminofén (APAP).....84

Figura 34. Concentraciones de malondialdehido (MDA) en homogenizados de tejido hepático de ratas Wistar machos a diferentes tiempos post-intoxicación con APAP.....85

Figura 35. Valores séricos de alanina aminotransferasa (ALT) en los grupos estudiados.....86

Figura 36. Valores séricos de la aspartato aminotransferasa (AST) en los grupos estudiados.....87

Figura 37. Valores séricos de FA en los grupos de ratas estudiados.....88

Figura 38. Concentraciones de GSH en el hígado de ratas Wistar machos de los grupos estudiados.....90

Figura 39. Concentraciones hepáticas de MDA en los animales estudiados.....91

Figura 40. Expresión génica relativa de la enzima CYP2E1 en hepatocitos de los diferentes grupos experimentales.....93

Figura 41. Expresión génica relativa de la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD) en tejido hepático de rata.....94

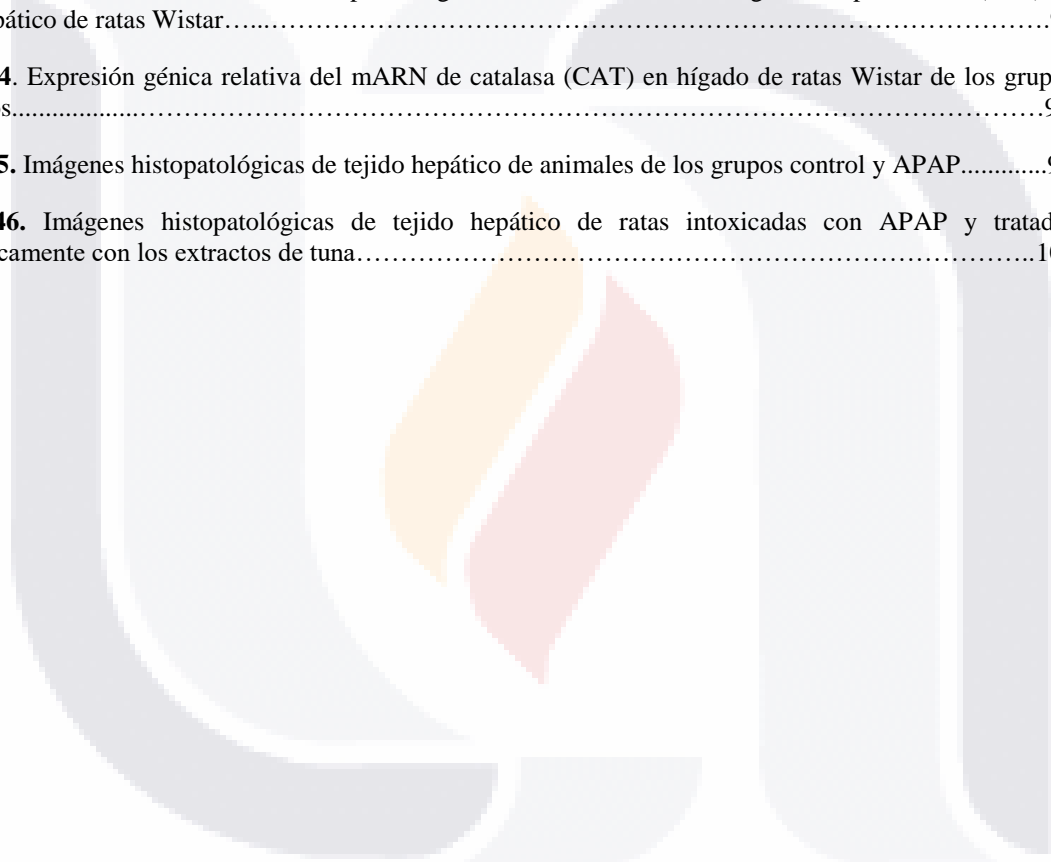
Figura 42. Expresión génica relativa de la enzima Cu/Zn-SOD en hígado de los diferentes grupos experimentales.....95

Figura 43. Niveles de inducción de la expresión génica relativa de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) en tejido hepático de ratas Wistar.....96

Figura 44. Expresión génica relativa del mARN de catalasa (CAT) en hígado de ratas Wistar de los grupos estudiados.....98

Figura 45. Imágenes histopatológicas de tejido hepático de animales de los grupos control y APAP.....99

Figura 46. Imágenes histopatológicas de tejido hepático de ratas intoxicadas con APAP y tratadas profilácticamente con los extractos de tuna.....100



ABREVIATURAS

AA – Ácido ascórbico	BCRP – Proteína de resistencia al cáncer de mama
AAPH – 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) disulfuro	CAT – Catalasa
ABCG2 – Transportador en cassette de unión a ATP, subfamilia G	cADN – Ácido desoxirribonucleico-complementario
ABTS – ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico	COX - Ciclooxygenasa
ADN – Ácido desoxirribonucleico	Cu/Zn-SOD – cobre/zinc-superoxido dismutasa
AIF – Factor de inducción de apoptosis	CYP450 – Citocromo P-450
AINE – Anti-inflamatorio no esteroideo	CYP1A2 – Citocromo P-450 isoforma 1A2
ALF – Falla hepática aguda	CYP2E1 – Citocromo P-450 isoforma 2E1
ALP – Fosfatasa alcalina	CYP2A6 – Citocromo P-450 isoforma 2A6
ALT – Alanina aminotransferasa	CYP3A4 – Citocromo P-450 isoforma 3A4
ANOVA – Análisis de varianza	DCPI – 2,6-diclorofenolindofenol sal disódica
APAP – Acetaminofén	DFF40 – Factor de fragmentación de ADN 40
AST – Aspartato aminotransferasa	DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ATP – Adenosín trifosfato	EDTA – Ácido etilenediaminotetraacético
ARN – Ácido ribonucleico	FDA – Administración de alimentos y medicamentos
Bcl-2 – Familia de proteínas derivadas del protooncogén	FRAP – Poder antioxidante de reducción férrica
Células-B de linfoma 2	GPx – Glutación peroxidasa
	GSH – Glutación reducido

GST – Glutación s-transferasa

GSSG – Glutación disulfuro

iNOS – Óxido nítrico sintasa inducible

i.p. – intraperitoneal

LDH – Lactato deshidrogenasa

LDL – Lipoproteína de baja densidad

mARN – Ácido ribonucleico-mensajero

MDA – Malondialdehido

M-MLV RT – Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney

Mn-SOD – manganeso-superóxido dismutasa

MPT – Permeabilidad de la membrana mitocondrial

MRP – Proteínas de resistencia a múltiples drogas

NAC – *N*-acetil-L-cisteína

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NAPQI – *N*-acetil-*p*-benzoquinonaimina

NO – Óxido nítrico

OPT – *o*-ftaldehido

ORAC – Capacidad de absorción de radicales del oxígeno

OTC – de venta libre “over-the-counter”

PAS – Ácido peryódico Shiff

PAH – Hidrocarburos policíclicos aromáticos

PBC – Bifenilos policlorados

PG – Prostaglandinas

qPCR – Reacción en cadena de la polimerasa-cuantitativa

ROS – Especies reactivas del oxigeno

RNS – Especies reactivas del nitrógeno

SD – Desviación estándar

SEM – Error estándar de la media

RESUMEN

Introducción y objetivo: El Acetaminofén (APAP) es la principal causa de falla hepática aguda inducida por fármacos. El objetivo del presente estudio fue analizar la capacidad antioxidante y el efecto hepatoprotector de los frutos de las especies *Opuntia robusta* y *Opuntia streptacantha*, contra la toxicidad inducida con acetaminofén.

Materiales y métodos: Los frutos fueron colectados y procesados en Aguascalientes, México. Los extractos fueron analizados con diferentes métodos para determinar la presencia de compuestos bioactivos como flavonoides, ácido ascórbico, betalaínas y compuestos fenólicos totales, así como su capacidad antioxidante. Para el ensayo biológico, una dosis de los extractos de los frutos (800 mg/kg/día, durante cinco días, oral) o glutatión reducido (50 mg/kg/día, durante cinco días, i.p.) fue dada a ratas Wistar machos antes de ser intoxicados con APAP (500 mg/kg). Suero sanguíneo y tejido hepático se colectaron después de 5 h de intoxicación para realizar pruebas bioquímicas y la expresión génica relativa, y después de 24 h para la histología.

Resultados: *Opuntia robusta* tuvo mayor cantidad de compuestos bioactivos y actividad antioxidante que *Opuntia streptacantha*. El APAP incrementó significativamente los niveles séricos de ALT 217% y AST 402%, y disminuyó los niveles de GSH 11% respecto del grupo control. No hubo cambios importantes en los niveles de MDA. La expresión génica en el grupo APAP mostró un incremento significativo de los niveles de CYP2E1 y ambas isoformas de la SOD; además, una subexpresión de GPx y CAT con respecto al grupo control. El estudio histológico mostró que el APAP indujo vacuolación citoplásmica de los hepatocitos y reducción del contenido de glucógeno. Los extractos de tuna redujeron el daño hepático producido por APAP (ALT 39% y AST 56%), mejoraron la histología y restauraron el contenido de glucógeno y GSH. Además, los extractos mostraron capacidad de regulación en la mayoría de las enzimas estudiadas.

Conclusión: Los extractos de tunas de *Opuntia robusta* y de *Opuntia streptacantha* pueden neutralizar radicales libres generados del metabolismo de APAP (NAPQI) debido a sus altos niveles de antioxidantes y protegen profilácticamente contra la necrosis de hepatocitos inducida con APAP. Por ello, estos extractos pueden ser usados en la falla hepática aguda inducida con APAP.

ABSTRACT

Background and aim: Acetaminophen (APAP) is the leading cause of drug-induced liver failure. The aim of this study was to analyze the antioxidant activity and the hepatoprotective effect of the fruits of *Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha*, against acetaminophen-induced toxicity.

Materials and methods: Fruits were selected from Aguascalientes, Mexico and extracted. Phytochemical tests were done to the extracts to determine the presence of different bioactive compounds such as flavonoids, ascorbic acid, betalains and total phenolic compounds, as well as their antioxidant capacity by different methods. For the biological assay, a single dose of the extracts (800 mg/kg/day, orally) or reduced glutathione (50 mg/kg/day, i.p.) was given to male Wistar rats during five days, before intoxication with APAP (500 mg/kg). Blood and hepatic tissue samples were collected after 5 hrs post-intoxication for biochemical tests and relative gene expression, and 24 hrs for histology.

Results: The extract of *Opuntia robusta* had a greater amount of bioactive compounds and showed a significant anti-oxidant activity regarding *Opuntia streptacantha*. APAP significantly increased levels of hepatic transaminases (ALT 217%, AST 402% of control group) and decreased levels of GSH (11% of control group). There were not important changes in the levels of MDA. The gene expression showed a significant increase of the levels of CYP2E1 and both isoforms of SOD; also, an underexpression of GPx and CAT in the APAP group regarding the control group. Histopathological analysis confirmed APAP-induced cytoplasmic vacuolation and reduced glycogen content in hepatocytes. The extracts reduced liver damage (ALT 39% and AST 56% of APAP group), improved histology, restored glycogen and GSH content. Besides, the extracts showed a gene regulation capacity in almost all enzymes.

Conclusion: *Opuntia* extracts might scavenge free radicals generated by APAP metabolism (NAPQI) due to the high levels of antioxidants and protect prophylactically against APAP-induced necrotic cell death. Hence, we suggest that these extracts can be used in APAP-induced acute liver failure.

1 INTRODUCCION

1.1 Estrés Oxidativo Celular

La oxidación es un proceso en el que ocurre pérdida de electrones, captación de oxígeno o cesión de hidrógeno (deshidrogenación), mientras que la reducción es el proceso en el cual se captan electrones, se pierde oxígeno o se gana hidrógeno. Es decir, todo proceso de oxidación se acompaña de otro proceso de reducción y, por lo tanto, son reacciones de óxido-reducción o redox. Este proceso es fundamental para la vida de las células animales ya que participa en la generación de la energía necesaria para mantener las funciones celulares y la actividad metabólica. La producción de ATP mediada por oxígeno vía la cadena transportadora de electrones es, sin embargo, acompañada por la generación de oxidantes (radicales libres). Por tanto, cuando la oxidación es alta o prolongada pueden aparecer el estrés oxidativo, el daño celular y el deterioro funcional del organismo (Jaramillo et al., 2012; Vázquez-Medina et al., 2012).

Los radicales libres son fundamentales en la modulación de varios procesos bioquímicos y representan una parte esencial de la vida aeróbica y el metabolismo. A concentraciones bajas o moderadas, los radicales libres proveen efectos benéficos en la respuesta celular y función inmunitaria, pero a niveles altos estos radicales se vuelven tóxicos y alteran el sistema de defensa antioxidante del cuerpo, lo cual puede conducir al estrés oxidativo (Jothy et al, 2012).

Se ha demostrado que el estrés oxidativo está involucrado en más de 100 enfermedades, como su causa o consecuencia (Halliwell, 1992; Jothy et al. 2012), y se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto, se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número

creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos (Venereo Gutiérrez, 2002; Sena y Chandel, 2012).

1.1.1 Mecanismos pro-oxidantes endógenos

Las células de los organismos aeróbicos producen energía química mayoritariamente por consumo de oxígeno en sus mitocondrias. La mitocondria es entonces el principal sitio de consumo de oxígeno intracelular y la principal fuente de generación de radicales libres (Poljsak, 2011). Por tanto, las fuentes endógenas más importantes de agentes oxidantes que contribuyen al envejecimiento son mitocondriales como: la cadena transportadora de electrones y la reacción de la óxido nítrico sintasa (Poljsak et al, 2013).

Las fuentes no mitocondriales de radicales libres son la reacción de Fenton, el estallido respiratorio de células fagocíticas (NADPH oxidasas), enzimas del citocromo P-450 microsomal (monooxigenasas), beta-oxidación peroxisomal, xantina oxidasa, lipooxigenasas y ciclooxigenasas (Gilca et al, 2007). La auto-oxidación de muchas moléculas biológicamente importantes y la deslocalización de electrones que tiene lugar en las reacciones de hemo-proteínas, dan como resultado también la producción de oxidantes (Poljsak et al., 2013; Vázquez et al., 2012).

1.1.2 Radicales libres

De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O_2), con los electrones que forman el enlace (σ), anti-enlazante con el mismo espín, es decir, en lo que se conoce como estado triplete; así el oxígeno es poco reactivo y con una velocidad de reacción baja a temperatura fisiológica. Sin embargo, mediante reacciones puramente químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias pro-oxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de generar múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo y que llegan a producir daño celular. Por lo anteriormente expuesto se comprende que, si bien el oxígeno es imprescindible para el

metabolismo celular y las funciones del organismo, no se deben olvidar los efectos tóxicos que produce (Venereo Gutiérrez, 2002; Briehl, 2015).

Los radicales libres son especies químicas reactivas con un electrón desapareado o impar en un orbital externo, lo que les proporciona una configuración espacial sumamente inestable. Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media muy corta, por lo que actúan cerca del sitio en que se forman (Poljsak et al., 2013).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) comprenden a los radicales libres y moléculas no radicales que contienen oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), las cuales pueden participar en reacciones que conducen al incremento de agentes prooxidantes dañando el equilibrio redox de las células. También hay especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés), (Halliwell et al, 1992; Riley et al, 1994).

Las principales ROS y RNS o sustancias prooxidantes son:

- Radical hidroxilo (HO^\bullet)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)
- Oxígeno singlete (1O_2)
- Óxido nítrico (NO)
- Peróxido (ROO^\bullet)
- Peroxinitrito ($ONOO^\bullet$)
- Semiquinona (Q^\bullet)
- Ozono (O_3)

Estas especies reactivas se clasifican en primarias y secundarias.

1.1.2.1 Radicales libres inorgánicos o primarios.

Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados en la reducción de éste y se caracterizan por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidroxilo y el óxido nítrico.

1.1.2.2 Radicales libres orgánicos o secundarios.

Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de dos radicales primarios entre sí, poseen una vida media mayor que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre.

1.1.2.3 Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno.

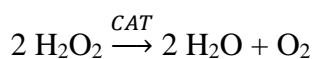
Incluyen a un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres producen estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, ejemplos, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos (Venereo Gutiérrez, 2002). También hay metales (hierro y cobre) y especies con azufre a las cuales se les podría atribuir el aumento en la formación de ROS y del estrés oxidativo, poniendo en peligro el equilibrio redox celular. No importa cuán cuidadosos seamos, no podemos evitar la formación de radicales libres endógenos y exógenos debido al metabolismo normal y a la exposición a oxidantes ambientales (Poljsak et al., 2013).

1.1.3 Mecanismos antioxidantes

La capacidad antioxidante es una habilidad de un conjunto de organismos o alimentos para atrapar radicales libres y prevenir su efecto nocivo. Estas sustancias que son comúnmente conocidas como “antioxidantes” están presentes en alimentos y suplementos alimenticios, más frecuentemente en frutas, vegetales, arroz, vinos, carne y otros comestibles de origen vegetal o animal. Por tanto, el efecto antioxidante incluye la protección de las células y sus estructuras contra el efecto dañino de los radicales libres, especialmente oxígeno y nitrógeno (Nekvapil et al., 2012).

En humanos y bajo condiciones metabólicas basales, $\approx 0.1\%$ del oxígeno consumido sufre una reducción univalente produciendo el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual puede reaccionar espontáneamente con óxido nítrico (NO) generando peroxinitrito ($ONOO^-$) o ser convertido por la superóxido dismutasa (SOD) en oxígeno y peróxido de hidrogeno (H_2O_2).

El H₂O₂ puede difundir a través de membranas biológicas o ser descompuesto en agua y oxígeno por la catalasa, glutatión peroxidasa y peroxirredoxinas, en una serie de reacciones que previenen la formación del altamente reactivo radical hidroxilo (HO•). La catalasa (CAT) transforma al H₂O₂ en agua y oxígeno mediante la siguiente reacción de dismutación:



En este contexto, los antioxidantes de los alimentos participan en las reacciones redox actuando como antioxidantes (donadores de electrones) o prooxidantes (receptores de electrones) dependiendo de su entorno. Por ejemplo, las frutas y vegetales contienen un amplio rango de sustancias que son conocidas por su importancia para la salud. Además de los mayores constituyentes en la comida como las proteínas, grasas, carbohidratos y micronutrientes como vitaminas, minerales y elementos traza; las frutas y vegetales contienen otros componentes que pueden tener un efecto positivo para la salud humana. Estos compuestos fitoquímicos incluyen carotenoides, flavonoides como epigallocatequina galato (té), quercetina (cebolla, vino tinto), genisteína (frijol de soya), taxifolina (frutas cítricas), etc., compuestos fenólicos, glucosinolatos, sulfuros alílicos, isotiocianatos, fibras dietéticas, fitoesteroles y monoterpenos, y otros compuestos que presentan diferentes grados de actividad antioxidante (Choueiri et al., 2012; Yahia, 2010).

1.1.3.1 Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos

Los efectos nocivos de los radicales libres son controlados en los seres vivos por diversos sistemas de protección antioxidante que involucran procesos o mecanismos encaminados a evitar la oxidación de estructuras de las células. Por ello, un sistema biológico sofisticado y evolucionado formado por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, inhibidores de enzimas oxidantes, cofactores de enzimas antioxidantes y quelantes de metales de transición es capaz de mantener la homeostasis redox celular. Sin embargo, este conjunto de defensas puede ser incapaz de mantener este balance bajo ciertas circunstancias, por ejemplo, durante una agresión crónica química o mecánica, lo cual puede conducir al estrés oxidativo (Damien Dorman & Hiltunen, 2011).

Los sistemas antioxidantes incluyen enzimas como la superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1.), catalasa (EC 1.11.1.6.), glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9.), glutatión S-transferasa (EC 2.5.1.18.), y sustratos no enzimáticos como el glutatión reducido, ácido úrico, ácido lipoico, bilirrubina, coenzima Q, vitamina C (ácido L-ascórbico), vitamina A (retinol), vitamina E (tocoferol), flavonoides, carotenoides (ej. astaxantina, zeaxantina), licopeno, fosvitina, resveratrol, compuestos de teína en té verde, y otros. Algunas biomoléculas también son consideradas biológicamente activas y antioxidantes clínicamente significativas, por ejemplo, transferrina, ferritina, lactoferrina, ceruloplasmina, hemopexina y haptoglobina (Nekvapil et al., 2012; Nimse y Pal, 2015).

1.1.4 Efecto de los radicales libres (Mecanismo de daño)

Los niveles altos de ROS, comparados con las defensas antioxidantes, pueden dañar estructuras celulares de vital importancia. En este contexto, el papel de las ROS en el daño o muerte celular ha sido paulatinamente reconocido, ya que los radicales $O_2^{\cdot-}$ e HO^{\cdot} están involucrados en cambios crónico-degenerativos, a menudo asociados con un incremento en los procesos oxidantes y con una concentración baja de antioxidantes. Adicionalmente, el peroxinitrito y el estrés nitroxidativo han sido también implicados en varios aspectos del daño celular pues el peroxinitrito también produce un electrón oxidante secundario (Jaramillo et al., 2012; Poljsak, 2011).

La cascada del estrés oxidativo es iniciada cuando los radicales libres obtienen su estabilidad por apareamiento de electrones con macromoléculas biológicas como proteínas, lípidos y ADN de células humanas causando daño en estructuras celulares que incluyen dichas macromoléculas. La cantidad de macromoléculas oxidadas en la célula es el resultado de la velocidad con la que son formadas menos las moléculas que son reactivadas por la velocidad de los procesos de reparación (Poljsak et al, 2013). En este contexto, la formación de radicales libres acorta el tiempo de vida de las células y produce cambios que conducen al envejecimiento. Estos cambios contribuyen a la generación de muchas patologías como la enfermedad coronaria cardiaca, desordenes neurodegenerativos, artritis, diabetes, inflamación, daño pulmonar, envejecimiento y cáncer (Dhalla et al, 2000; Uttara et al, 2009; Nowak, 2013). Aunque el envejecimiento es probablemente un proceso

multifactorial que no se puede reducir a una sola causa, existe evidencia de la teoría del radical libre que detalla el impacto de estos radicales libres sobre el envejecimiento celular (Jothy et al., 2012).

Uno de los mecanismos de muerte celular provocada por el estrés oxidativo es la apoptosis activada por diferentes vías de señalización mediadas por la mitocondria, daño al ADN y/o estrés del retículo endoplásmico (vía intrínseca), o bien por activación/modulación de receptores de muerte celular (vía extrínseca), aunque se presume que solo una pequeña porción de la muerte celular generada por la hepatotoxicidad inducida con acetaminofén se da por esta vía (Franco et al, 2009). Se ha demostrado que la ruta principal de muerte celular tras la intoxicación aguda con acetaminofén es la necrosis por efecto de la lipoperoxidación causada por la formación de radicales libres y la disfunción mitocondrial por incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Ward et al., 2012).

1.1.4.1 Oxidación de lípidos

La oxidación de lípidos induce su desnaturalización y afecta la viabilidad de las células ya que altera las estructuras ricas en ellos, como las membranas celulares y las lipoproteínas. En el primer caso, se altera la permeabilidad, lo que puede conducir al edema y muerte celular; mientras que, en el segundo caso, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) contribuye a la generación de la placa ateromatosa. La oxidación de los lípidos por las ROS se produce mediante una reacción en cadena en la que el ácido graso al ser oxidado, se convierte en un radical de ácido graso, capaz de oxidar a otra molécula vecina. Este proceso se conoce como “peroxidación lipídica o lipoperoxidación” y genera diversos subproductos, entre ellos el malondialdehído (MDA), cuya determinación en los tejidos, plasma sanguíneo u orina es útil para evaluar el estrés oxidativo (Angelova et al., 2015).

1.1.4.2 Oxidación de proteínas

El ataque de las ROS sobre las proteínas de las células puede modificar su estructura y/o función. Este daño puede aumentar la actividad de los sistemas proteolíticos intracelulares. En efecto, las proteínas oxidadas son más sensibles a la proteólisis, proceso en el que los

aminoácidos liberados por el daño oxidativo pueden ser reutilizados en la *síntesis de novo*. Sin embargo, en presencia de estrés oxidativo, la capacidad proteolítica de las células no responde frente al elevado número de moléculas oxidadas. En estas condiciones, las proteínas oxidadas que no han sido hidrolizadas se unen mediante enlaces hidrofóbicos y forman acúmulos que conducen al funcionamiento anormal de la célula.

Los mecanismos involucrados en la oxidación de proteínas por las ROS se identificaron mediante estudios en los cuales los aminoácidos, los péptidos y las proteínas fueron expuestos a radiaciones ionizantes para formar radicales HO[•] o una mezcla de radicales HO[•]/O₂^{-•}. De esta manera la oxidación de las cadenas laterales de aminoácidos, particularmente los residuos de cisteína y metionina, pueden ser oxidados por las ROS y RNS (Stadtman, 2004; Nagy, 2013).

1.1.4.3 Oxidación del ADN

Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno pueden oxidar y dañar el ADN. Además, durante la lipoperoxidación se generan compuestos electrofílicos y genotóxicos que al interactuar con el ADN forman aductos como: el malondialdehído (MDA), el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y el trans-2,4-decadeinal (DDE). En condiciones normales, los aductos formados se reparan continuamente para mantener la integridad del ADN; sin embargo, cuando esto no ocurre, la replicación del ADN puede conducir a diferentes mutaciones. Las modificaciones genéticas resultantes pueden iniciar una serie de eventos que conducen a la carcinogénesis. Por ello los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores están directamente implicados en el cáncer humano (Yin et al., 2013).

En resumen, los radicales libres dañan la estructura del ADN produciendo: mutaciones de pares de bases, deleciones, inserciones y amplificaciones de secuencia, rompimientos del ADN, daño a genes supresores de tumores y amplificación de la expresión de proto-oncogenes. Además, se ha encontrado que el estrés oxidativo conduce a la transformación maligna de las células. Asimismo, la acumulación del daño al ADN se relaciona con el proceso de envejecimiento (Jaramillo et al., 2012).

1.1.5 Factores que incrementan el estrés oxidativo celular

Además de los factores endógenos como la respiración celular y exógenos como los xenobióticos, existen otros factores que pueden contribuir o provocar una alteración/ruptura del equilibrio entre las reacciones prooxidantes y las antioxidantes que se realizan en los organismos vivos, produciendo el estrés oxidativo o nitrosativo y generando en algunos casos la falla permanente del sistema antioxidante endógeno (enzimático y no enzimático). Estos factores pueden ser: la exposición celular a infecciones microbianas, materia particulada, humo de cigarro, monóxido de carbono, asbestos, la exposición frecuente al alcohol etílico, la radiación ionizante y UV, pesticidas, dioxinas, bifenilos policlorados (PBC's, *por sus siglas en inglés*), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's, *por sus siglas en inglés*), ozono, y el uso desmedido de productos para el cuidado personal y fármacos de venta libre (Poljsak et al., 2013).

El medio ambiente representa un factor clave para la salud y la enfermedad de los humanos. La exposición a muchas sustancias como contaminantes y químicos (estresantes ambientales) tienen efectos que deterioran la salud y son considerados como contribuyentes substanciales de muchas de las enfermedades de mayor significancia en materia de salud pública. Las enfermedades ambientales son aquellas generalmente causadas o exacerbadas por la exposición a estresantes ambientales que incluyen la inmunosupresión, el cáncer, enfermedad crónica de pulmón, diabetes y neurodegeneración (Ballinger, 2005; Pham-Huy et al, 2008; Reuter et al, 2010; Jomova y Valko, 2011).

La célula responde y se adapta a señales ambientales como sustancias tóxicas o estresantes a través de múltiples mecanismos que involucran vías de comunicación o procesos de transducción de señales. Aunque un gran número de estudios toxicológicos han sido diseñados para entender las bases biológicas de la respuesta celular al estrés ambiental, aún falta mucha evidencia para aclarar la explicación mecanística de estos efectos. Los estresantes ambientales son bien conocidos por mediar una amplia variedad de efectos tóxicos como el daño al ADN o la genotoxicidad (Franco et al., 2009).

Aunque una dieta balanceada provee una cantidad suficiente de antioxidantes, algunas personas consumen antioxidantes a partir de suplementos alimenticios con la esperanza de

reducir el proceso oxidativo biológico que contribuye al envejecimiento y la aparición de enfermedades. Por lo tanto, existe la posibilidad de que, resulte un entorno con actividad prooxidante por el consumo excesivo de antioxidantes a partir de suplementos, lo cual puede interferir con el mantenimiento de los niveles deseados de ROS. La suplementación con antioxidantes puede ser actualmente causa de daño en términos de incrementar el riesgo de nuevas enfermedades o interferir en ellas (Miller et al, 2005; Choueiri et al., 2012).

1.1.5.1 Exposición a fármacos de venta libre. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE's)

Los AINE's son medicamentos analgésicos y antiinflamatorios de venta libre (OTC "*over-the-counter*", por sus siglas en inglés) usados para el control del dolor en pacientes ambulatorios con artritis, cirugía menor, dolor de cabeza, dismenorrea, dolor de espalda, torceduras y esguinces. Por ello, son los fármacos más ampliamente recetados y comprados en los Estados Unidos de América (EUA) (Hersh et al., 2007).

Los eicosanoides son sustancias que participan en la mayoría de las reacciones inflamatorias y pertenecen a una familia de ácidos grasos poliinsaturados derivados del ácido araquidónico, el cual se localiza en los fosfolípidos de las membranas celulares. Entre los eicosanoides se encuentran: las prostaglandinas, la prostaciclina, tromboxanos, lipoxinas, leucotrienos y el ácido 12-hidroxieicosatetraenoico (12-HETE). La acción analgésica de los AINE's se debe a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX), la cual convierte el ácido araquidónico en el precursor de prostaglandinas (PG's), PGH_2 . Hay dos isoformas de la enzima COX: a) COX-1 es expresada constitutivamente y generalmente produce PG's para modular procesos fisiológicos, b) COX-2 es inducible y produce PG's en respuesta al estrés fisiológico como la infección y la inflamación. Estas acciones han fundamentado el desarrollo de inhibidores selectivos de COX-2 con eficacia antiinflamatoria, comparada con los AINE's tradicionales, y para reducir los efectos adversos, particularmente en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, dos inhibidores

selectivos de COX-2 han sido retirados subsecuentemente por incrementar el riesgo de eventos tromboembólicos adversos (Lee et al., 2007).

El uso crónico de analgésicos OTC es más común en los ancianos, muchos de los cuales toman AINE's para aliviar el dolor. Debido a la amplia disponibilidad y seguridad de los fármacos OTC, se ha hecho muy común la automedicación con estos agentes. Muchos pacientes ignoran el potencial tóxico y adverso de las interacciones medicamentosas asociadas con el uso inapropiado o por largos periodos de los analgésicos OTC. Ellos pueden usar analgésicos de venta libre en dosis mayores a las recomendadas o en combinaciones que aumentan el riesgo de interacciones adversas. Adicionalmente, muchos de ellos no saben que los medicamentos para la gripe o tos común pueden contener analgésicos OTC. Aunque los analgésicos OTC se han asociado con efectos adversos solamente en un pequeño porcentaje de la población, su uso inapropiado transforma el incremento del riesgo en ese segmento poblacional en un problema clínicamente relevante (Fendrick et al., 2008).

1.1.6 Antioxidantes naturales

Los antioxidantes de origen natural han ocupado una posición prominente como compuestos fitoquímicos eficaces para la prevención y/o tratamiento de muchas enfermedades y trastornos fisiopatológicos en los humanos. La importancia de estos compuestos radica en su capacidad antioxidante ya que atrapan o eliminan radicales libres, son inhibidores de la lipoperoxidación y reducen el estrés oxidativo celular. Los antioxidantes fitoquímicos incluyen moléculas simples como las vitaminas C, E y K; pigmentos de plantas como los carotenoides (β -carotenos, xantofilas, licopeno), flavonoides, betalainas y feofitinas; así como metabolitos secundarios de las plantas que incluyen compuestos fenólicos simples o más complejos (polifenoles) (Pham-Huy et al, 2008).

En las plantas se han identificado dos rutas principales de biosíntesis de polifenoles fitoquímicos: a) la vía shikimato y b) la vía del acetato o policétidos. Estructuralmente, los polifenoles vegetales tienen un anillo fenólico o bencénico con un grupo hidroxil unido y

también ciertos sustituyentes como ésteres y glicósidos presentes como grupos funcionales. La mayoría de los polifenoles vegetales tienen dos o tres grupos hidroxil, y por ello son llamados polifenoles dihidricos o trihidricos, respectivamente. Los polifenoles son conocidos por su capacidad para quelar metales traza. También se ha observado que atenúan el daño al ADN inducido con hierro al formar complejos con el mismo y mantenerlo en su estado Fe^{+3} después de su oxidación en el estado Fe^{+2} en presencia de oxígeno molecular (Malireddy et al., 2012).

En las últimas décadas han sido identificados más de 8,000 compuestos polifenólicos en diferentes especies de vegetales. Los grupos principales de polifenoles incluyen compuestos fenólicos ácidos, flavonoides, estilbenos y lignanos. Desde finales del siglo XX, los estudios realizados sobre las propiedades nutraceuticas de los polifenoles han sugerido que el consumo frecuente de vegetales ricos en estos compuestos protege al organismo contra el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como: cáncer, diabetes, osteoporosis, alteraciones cardiovasculares y patologías neurodegenerativas (Pandey y Rizvi, 2009; Graf et al, 2005; Arts y Hollman, 2005).

1.1.6.1 Fuentes

Los animales y humanos obtienen polifenoles fitoquímicos a partir de la dieta o suplementos nutricionales. La mayoría de los polifenoles fitoquímicos están presentes en las plantas como polímeros o como moléculas glicosiladas (conjugados con azúcares). Estas moléculas complejas unidas a residuos de azúcar pueden ser *O*-glicósidos o *C*-glicósidos (Malireddy et al., 2012).

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soya, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual y también pueden utilizarse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales. Los flavonoides también se encuentran en extractos de plantas y subproductos naturales como arándano, Gingko biloba, nopal, cardo, crataegus y propóleo (Crozier et al., 1997).

Las pocas fuentes comestibles conocidas de betalaínas son el betabel rojo y amarillo (*Beta vulgaris L. ssp. vulgaris*), acelga suiza (*Beta vulgaris L. ssp. cicla*), granos u hoja de

amaranto (*Amaranthus sp.*) y tunas de los géneros *Opuntia* e *Hylocereus* (Azeredo H., 2009).

1.1.6.1.1 Nopal

El nopal es un miembro de la familia de las cactáceas, el cual está distribuido principalmente en México y en otras partes del mundo como en África, la cuenca del Mediterráneo, el cercano Oriente, algunas partes de Asia, Australia y China. Tiene la más amplia variabilidad de germoplasma y un elevado número de usos. El nopal es un cultivo de fruta emergente que se desarrolló comercialmente durante la segunda mitad del siglo XX. Solamente en México existen cerca de 50,000 hectáreas de cultivo de nopal tunero por año para su consumo (Yahia & Mondragon-Jacobo, 2011).

El grupo *Opuntia* (nopal) tiene dos géneros, *Opuntia* y *Nopalea*, de la familia Cactaceae. Este grupo es originario del continente americano y sus especies pueden ser encontradas desde el sur del círculo ártico en Canadá hasta la punta de la Patagonia en Sudamérica, y desde el nivel del mar hasta una altitud de 5100 metros en Perú, en climas con no más de 500 centímetros de precipitación anual. México es el país con la mayor diversidad de géneros y especies de Cactáceas, incluyendo *Opuntia*, la mayoría de los cuales son endémicas (73 y 78 %, por género y especie, respectivamente). Existen cerca de 200 especies reconocidas, de las cuales al menos 84 se encuentran en México. La conservación de especies de *Opuntia* en México es importante para la persistencia de la biodiversidad y la sustentabilidad económica. Muchas de estas especies se encuentran en regiones áridas o semi-áridas, donde están expuestas a diferentes tipos de amenazas generalmente debidas a la actividad humana, principalmente por el desarrollo urbano, también por la recolección desmedida para su uso directo y para su venta en mercados nacionales e internacionales (Bravo, 1978; Flores y Aranda, 1997).

Las especies *Opuntia* son localmente abundantes y con frecuencia forman componentes dominantes de la flora natural, especialmente en regiones áridas, donde éstas tienen una importancia sustancial. Son un componente ecológico importante de la flora de los desiertos de Chihuahua y Sonora, en donde forman grupos conocidos como nopaleras, las

cuales contribuyen a la estabilidad del suelo y constituyen un componente importante en la dieta de diversas especies de mamíferos (Illoldi-Rangel et al., 2012).

La planta es usada principalmente para la producción de su fruto (tunas), aunque en algunos países también se utiliza como un vegetal para consumo humano (nopalitos) o para forraje. También es factible usar la planta en forma más integral, para aprovechar las propiedades de la parte vegetal (cladodios). La familia Cactaceae se caracteriza por producir mucílago, un carbohidrato complejo que se encuentra en la fibra que obtenemos de la dieta. Por esto y otras razones, el mucílago es un excelente prospecto para ser usado como aditivo no solamente en la industria alimentaria, sino también en otro tipo de industrias (Sáenz et al., 2004).

Se han realizado una serie de estudios sobre la composición química y nutricional del nopal principalmente en variedades fácilmente disponibles, algunas de ellas sin identificar. Sin embargo, la diversidad y variabilidad del nopal en diferentes partes del mundo, especialmente en México, es muy grande, y en consecuencia también lo es en el contenido del fruto. Es decir, la variabilidad es expresada en todas las partes de la planta, incluido el fruto. Características tales como la piel, el color y textura de la pulpa, el contenido de azúcares y la acidez de su jugo están directamente relacionadas con la presencia, la intensidad y la actividad de compuestos nutricionales y funcionales (Yahia & Mondragon-Jacobo, 2011).

1.1.6.1.2 Tuna

La tuna es un fruto carnoso, de forma variante, tamaño y color, con un número consistente de semillas duras. Se caracteriza por su alto contenido de azúcar (12 a 17%) y su baja acidez (0.03 a 0.12%). Tiene un mayor contenido de vitamina C respecto de la manzana, pera, uva y plátano, y además es rica en potasio, calcio y fósforo, y baja en sodio. Puede ser considerada un alimento de importancia funcional y nutracéutica por su alto contenido de compuestos químicos que se caracterizan por sus propiedades nutricionales y benéficas para la salud. Es bien conocida en la medicina tradicional por sus propiedades hipoglucémicas e hipolipidémicas. La evidencia científica ha proporcionado información sobre los beneficios del consumo de la tuna: disminuye el estrés oxidativo y brinda efectos

cardioprotectores en humanos, además, tiene efectos anti-ulceras y hepatoprotectores en las ratas. Atención especial merecen sus componentes no nutritivos como los antioxidantes fitoquímicos. La importancia nutricional de la tuna se debe principalmente al contenido de ácido ascórbico, fibras y aminoácidos libres (particularmente prolina, glutamina y taurina). Otros componentes como lípidos, proteínas, ácidos orgánicos y minerales no difieren significativamente de otras frutas tropicales (Cassano et al., 2009).

La fruta de algunos tipos de nopales contiene dos pigmentos betalaínos, un colorante natural ampliamente usado en la industria alimentaria, betacianina (morado-rojo) y betaxantina (amarillo), ambos con propiedades reductoras y para atrapar radicales libres. Las actividades antioxidantes totales de diferentes tunas de color medidas por diferentes ensayos están altamente correlacionadas entre sí y también con las concentraciones de compuestos fenólicos totales, betalaínas y ácido ascórbico (Yahia & Mondragon-Jacobo, 2011).

Otros estudios de investigación han identificado la presencia de flavonoides como flavonoles glicosilados, de los cuales se encuentran en cantidades significativas rutina, isorhamnetina-3-rutinósido y canferol-3-rutinósido en los extractos de tunas rojo-moradas y amarillas (Sáenz et al., 2009).

1.1.6.2 Tipos de antioxidantes naturales

La clasificación de polifenoles vegetales se basa en: a) el número de anillos fenólicos o bencénicos presentes, y 2) el número y tipo de sustituyentes presentes en los anillos fenólicos. Los polifenoles fitoquímicos generalmente son clasificados como: a) fenoles simples (ácido gálico y ferúlico), b) estilbenos (dihidrofenoles como el resveratrol), c) chalconas y d) flavonoides. Los metabolitos secundarios vegetales como los fenólicos simples y los polifenólicos, son conocidos por jugar un papel crucial en las plantas como: protectores contra el estrés oxidativo y la radiación ultravioleta, cicatrizantes, en la defensa contra microorganismos, hongos, herbívoros y competidores vegetales, y en la resistencia a enfermedades. Sin embargo, los mecanismos de protección y su rol fisiológico aún no son bien entendidos. (Malireddy et al., 2012).

1.1.6.2.1 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo amplio y diverso de metabolitos de las plantas con más de 10,000 compuestos que han sido identificados hasta ahora; sin embargo, solo pocos de ellos se han estudiado con detalle (Pollastri y Tattini, 2011). Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regula la permeabilidad de los capilares. El término flavonoide se usa para designar a los pigmentos de las plantas. Todos son derivados de la benzo- γ -pirona o cromona (Figura 1).

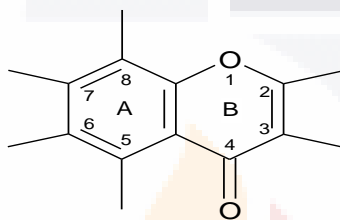
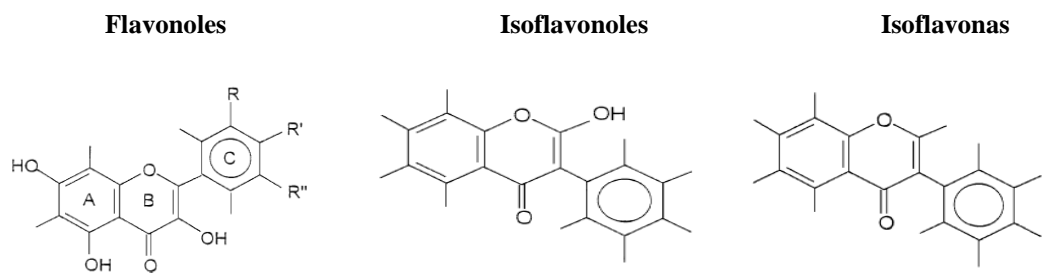
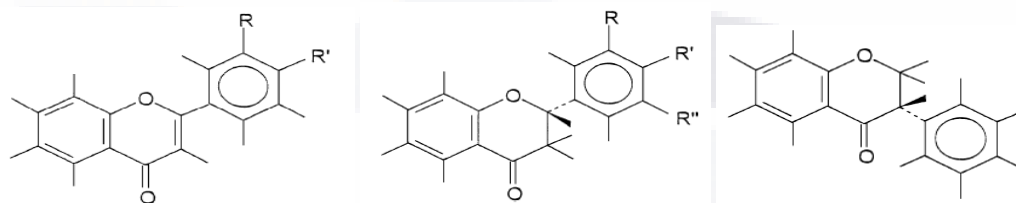


Figura 1. Las plantas verdes biosintetizan a los flavonoides a partir de la fenilalanina, teniendo como principal intermediario a la benzo- γ -pirona, cuya estructura se muestra en la figura, así como la numeración de los átomos de sus anillos. Esto es básico para establecer la nomenclatura de los flavonoides derivados de la benzo- γ -pirona. (Tomado de Andersen & Markham, 2005).

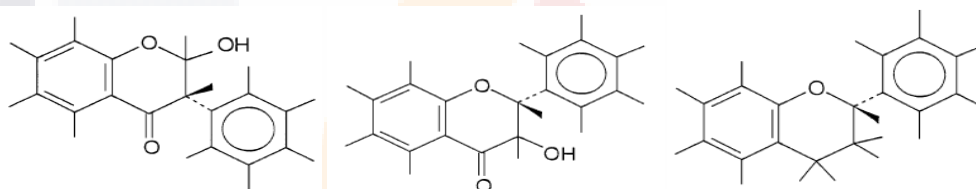
Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos con excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Figura 2). Los flavonoides de origen vegetal tienen tres grupos hidroxilo, dos de los cuales se ubican en el anillo A en las posiciones cinco y siete, y uno se localiza en el anillo B en la posición tres. Las acciones bioquímicas de los flavonoides dependen de la presencia y posición de varios grupos sustituyentes que afectan el metabolismo de cada compuesto. Pueden encontrarse en forma libre y en forma combinada (aglicona o β -glicósidos). Basados en su estructura química, los grupos de flavonoides incluyen: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, antocianinas e isoflavonas (Malolepska y Urbanek, 2000; Graf et al., 2005).



Flavonas **Flavanonas** **Isoflavanonas**



Isoflavanoles **Flavanoles** **Flavanes**



Isoflavanes **Coumarinas** **Auronas**

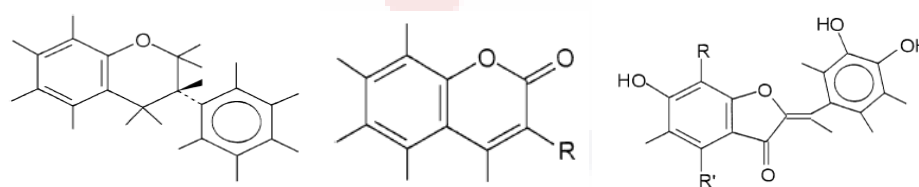


Figura 2. Continúa

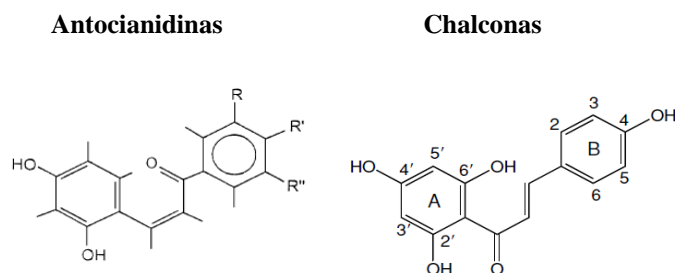


Figura 2. Los flavonoides son un grupo de compuestos naturales que comparten una estructura básica similar. La gran mayoría son pigmentos ampliamente distribuidos en los alimentos de origen vegetal. En esta figura se presentan las estructuras químicas de los diferentes tipos de flavonoides. (Modificado de Havsteen, 2002).

Los flavonoides protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, radicales libres derivados del metabolismo celular, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias protectoras, por lo que debe obtenerlas con los alimentos o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas. Los nutriólogos estiman que el consumo promedio de flavonoides por humano en una dieta normal es de 1-2 g por día, siendo predominantes los flavonoles especialmente la quercetina (Andersen & Markham, 2005).

Estas sustancias desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y pueden tener efectos terapéuticos en diversas patologías como la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la peroxidación lipídica. También se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma) (Cai et al., 2014; Yi et al., 2011, Navarro-Núñez et al., 2009).

En este contexto, además de sus conocidos efectos antioxidantes, los flavonoides presentan otras propiedades que incluyen la estimulación de las comunicaciones a través de las uniones en hendidura (uniones gap), el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación como las mono-oxigenasas dependientes del

citocromo P-450, entre otras. En los animales, los diferentes efectos biológicos que producen los flavonoides se dividen en cuatro categorías: a) fuerte afinidad por los polímeros biológicos, b) formación de enlaces con iones de metales pesados, c) catálisis del transporte de electrones y e) capacidad para atrapar radicales libres (Havsteen, 2002).

Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo. Una excepción son los tubérculos de cebolla que contienen gran cantidad de quercetina 4'-D-glucósidos. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre (Martínez et al., 2002).

En resumen, los flavonoides son un grupo de compuestos bioactivos que se encuentran en los vegetales y en algunos alimentos procesados. Su consumo regular se asocia con la disminución del riesgo de varias patologías crónicas como el cáncer, la enfermedad cardiovascular y las alteraciones neurodegenerativas. Sus acciones a nivel molecular incluyen propiedades antioxidantes, así como la capacidad para modular varias rutas enzimáticas importantes. Los avances de las evidencias científicas indican que los flavonoides desempeñan un papel benéfico en la prevención de enfermedades, aunque para confirmarlo se requiere realizar un mayor número de estudios clínicos y epidemiológicos (Kozłowska y Szostak-Węgierek, 2014).

1.1.6.2.2 Betalaínas

Las betalaínas son pigmentos hidrosolubles que contienen nitrógeno, los cuales son sintetizados a partir del aminoácido tirosina en dos grupos estructurales: las betacianinas (rojo-violeta) y las betaxantinas (amarillo-naranja). El ácido betalámico (Figura 3a) es el cromóforo común de todos los pigmentos betalaínicos. La naturaleza de la adición del residuo del ácido betalámico determina la clasificación del pigmento como betacianina o betaxantina (Figura 3b y c, respectivamente) (Azeredo, 2009).

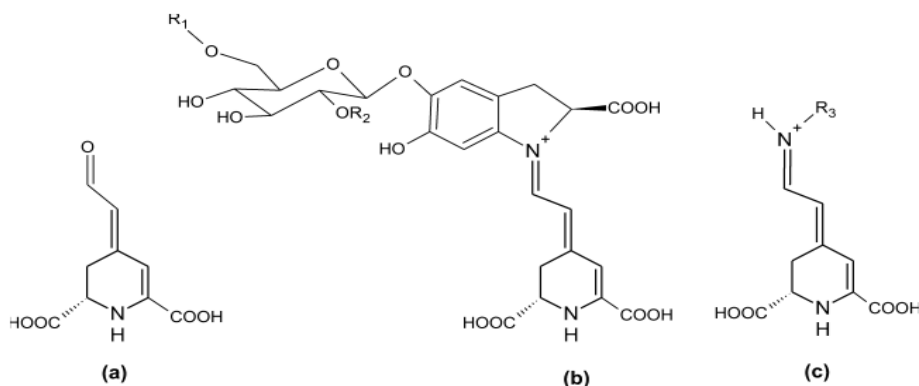


Figura 3. Estructuras generales del ácido betalámico (a), betacianinas (b) y betaxantinas (c). Tomado de Azeredo (2009).

Las diferencias estructurales reflejan la variación de los subgrupos de las betalaínas. Las betacianinas contienen un residuo ciclo-3,4-dihydroxifenilalanina (ciclo-Dopa). La condensación con la estructura cerrada de ciclo-Dopa extiende la resonancia electrónica de los anillos aromáticos difenólicos. Esta conjugación extra brinda un pico máximo de absorbancia desde 480 nm (amarillo, betaxantinas) hasta cerca de 540 nm (violeta, betacianinas). Antocianinas y betalaínas nunca han sido reportadas en la misma planta, ya que al parecer son mutuamente excluyentes en el reino plantae. Las betalaínas pueden ser encontradas en raíces, frutas y flores. Estas absorben radiación visible sobre el rango de los 476-600 nm con un máximo de 537 nm a pH 5.0 (Strack et al., 2003).

Con relación a los aspectos estructurales, se ha reportado que las betacianinas son más estables que las betaxantinas, ambas a temperatura ambiente o tras calentamiento. Comparando la estabilidad de diferentes betacianinas, las glicosiladas son más estables que las agliconas, probablemente debido al alto potencial de óxido-reducción de las primeras. Algunos estudios indican que la estabilidad de las betacianinas resulta de su esterificación con ácidos alifáticos o aromáticos, especialmente en la posición 6-O. Las betalaínas no son susceptibles a rompimientos hidrolíticos con cambios de pH como las antocianinas, reaccionan fácilmente con el O₂ por lo que deben protegerse del contacto con el ambiente para evitar su decoloración y su pérdida, son fotosensibles y pueden degradarse por la presencia de metales como: hierro, cobre, estaño y aluminio. La temperatura es el factor más importante para la estabilidad de las betalaínas durante el procesamiento y

almacenamiento de alimentos. Algunos estudios han reportado que las betalaínas pueden degradarse a temperaturas altas (Cai y Corke, 1999).

Varios trabajos de investigación han demostrado la potente actividad antioxidante de las betalaínas *in vitro*. Algunos reportes basados en pruebas *in vitro* colocaron al betabel como uno de los 10 principales vegetales con mayor capacidad antioxidante, siendo las betalaínas los compuestos parcialmente responsables de este efecto benéfico (Azeredo, 2009). Uno de los primeros estudios *in vivo* sobre la actividad biológica de las betalaínas mostró que la betanina de la remolacha roja producía incrementos transitorios de la presión sanguínea y de la frecuencia cardiaca, al ser administrada por vía intravenosa. Estos efectos cardiovasculares no se observaron cuando las betalaínas fueron administradas por vía intraesofágica, probablemente por su degradación en el tracto gastrointestinal (Reynoso et al, 1999). Posteriormente, los estudios sobre estos compuestos se centraron en las funciones fisiológicas asociadas a su actividad antioxidante (Khan, 2016).

En efecto, la protección contra la lipoperoxidación ha permanecido como uno de los factores esenciales para valorar a un antioxidante *in vivo*. La evidencia preliminar se obtuvo de un estudio *in vitro* que mostró que la betanina y la betanidina son inhibidores eficientes de la lipoperoxidación de las membranas y de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL): la betanina mostró mayor eficacia que la betanidina (Kanner et al, 2001; Khan, 2016).

2 ANTECEDENTES

2.1 Acetaminofén (Paracetamol, APAP, N-acetil-p-aminofenol)

El Acetaminofén, introducido en la medicina desde 1893 por von Mering, es un metabolito activo de la fenacetina, analgésico derivado de la anilina. Este medicamento fue aprobado e introducido en EUA por la FDA (Food and Drug Administration) en 1960, como tableta de liberación inmediata de 325 mg. Las cápsulas y tabletas de 500 mg fueron aprobadas en 1973 y 1975, respectivamente. Basados en la literatura disponible, la FDA ha determinado que el acetaminofén es un medicamento antipirético y analgésico de venta libre, seguro y

efectivo a una dosis máxima diaria de 4 gramos en 24 horas (Mancipe, Fernández & Fernández, 2010).

Aunque el acetaminofén es reconocido como un medicamento seguro y efectivo, también ha sido asociado con una morbi-mortalidad significativa (hepatotoxicidad) si se ingieren inapropiadamente dosis mayores a las terapéuticas (Krenzelok & Royal, 2012).

2.1.1 Mecanismo de acción del Acetaminofén

El Acetaminofén (Figura 4) es ampliamente usado para el manejo del dolor y la fiebre como una alternativa de la aspirina y otros AINE's o inhibidores selectivos de la COX-2, pero su acción a nivel molecular está poco definida. Aunque éste no inhibe enzimas COX a concentraciones terapéuticas *in vitro*, el acetaminofén ha demostrado que inhibe una variante de COX *in vivo*. Simmons et al. (1999) demostraron que una variante de COX-2 es especialmente sensible al acetaminofén.

Cada isoforma COX ha sido reportada por ser diferencialmente activada de acuerdo a la concentración de ácido araquidónico: COX-2 es 2-4 veces más activa que COX-1 a concentraciones de ácido araquidónico por debajo de 0.5 μM ; COX-1 es más activa que COX-2 cuando las concentraciones de ácido araquidónico están por encima de los 2.5 μM . El Acetaminofén es un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas en células intactas, a bajas concentraciones de ácido araquidónico, pero este efecto decrece con el incremento en la concentración del mismo, sugiriendo que puede inhibir la función de COX-2 (Lee et al., 2007). Como antipirético, actúa a nivel del centro termorregulador al bloquear la síntesis de prostaglandinas en medios pobres de peróxido como el hipotálamo, se produce vasodilatación periférica y, en consecuencia, se incrementa el flujo sanguíneo de la piel, sudoración y disipación de calor, lo que contribuye al efecto antipirético. Respecto a su efecto analgésico, este medicamento es útil para el control del dolor de leve a moderada intensidad como cefaleas, mialgia, dismenorrea y dolor posparto (Mendoza, 2008).

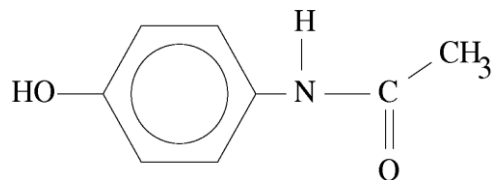


Figura 4. Estructura química del Acetaminofén (Paracetamol).

2.1.2 Biotransformación del Acetaminofén

Su absorción está relacionada con el grado de vaciamiento gástrico y, por lo general, las concentraciones sanguíneas máximas se alcanzan en un lapso de 30-60 min, presentando una biodisponibilidad del 88%. Se une poco a proteínas plasmáticas (20%) y se distribuye en todos los líquidos corporales. Se biotransforma en el hígado por enzimas microsómicas formando conjugados inactivos con ácido glucurónico y sulfato inorgánico (90%) (Figura 5). Su vida media de eliminación es de 2-3 hrs a través de la orina y no se ve afectada de manera notoria por la función renal. Con cantidades tóxicas o en presencia de trastorno hepático, la vida media puede aumentar al doble o más (Katzung, 2005; Mendoza, 2008).

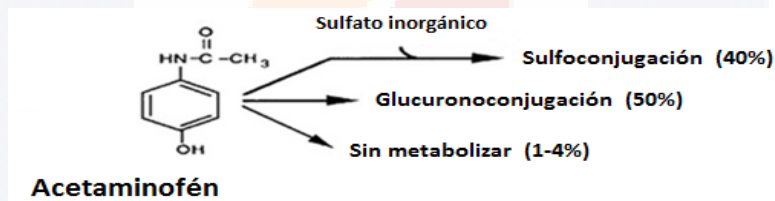


Figura 5. Representación esquemática del proceso de biotransformación del acetaminofén (Paracetamol). (Modificado de Katzung, 2005).

2.1.3 Toxocinética del Acetaminofén

En adultos, las dosis terapéuticas (30-50 mg/kg/día) son consideradas seguras. En caso de sobredosis y al saturarse las vías metabólicas de conjugación, intervienen enzimas del citocromo P-450 (oxidasas de función mixta) generando metabolitos intermediarios muy reactivos (quinoneiminas) que son capaces de formar uniones covalentes con macromoléculas biológicas, dando lugar a hepatotoxicidad. De acuerdo con la FDA, cada semana aproximadamente 50 millones de adultos consumen fármacos que contienen acetaminofén. La ingesta de APAP a dosis elevadas produce necrosis hepática

centrolobulillar que puede llegar a ser fatal. Las alteraciones bioquímicas tempranas de la intoxicación son bien conocidas, mientras que el mecanismo que conduce a la muerte del hepatocito es menos entendido (Terrones, 2012; Mendoza, 2008).

2.1.3.1 Iniciación del daño celular inducido con Acetaminofén

Una gran porción de la dosis terapéutica de APAP es directamente conjugada con ácido glucurónico o sulfato a través de las glucuroniltransferasas o sulfotransferasas, respectivamente. El fármaco conjugado (glucurónido de APAP) es excretado por la bilis a través de las proteínas asociadas a la resistencia de múltiples drogas 2 (MRP2, *por sus siglas en inglés*) y en sangre a través de la MRP3. La eliminación biliar del sulfato de APAP es mediada principalmente por MRP2 y en menor grado por proteínas de resistencia al cáncer de mama (BCRP/ABCG2) (Zamek-Gliszczyński et al., 2005).

La parte remanente de la dosis que no se conjuga directamente con grupos hidrofílicos, es metabolizada por el citocromo P-450 (CYP-450) generando un metabolito reactivo, N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI). Aunque un gran número de enzimas P450 pueden metabolizar APAP, la isoenzima más relevante es CYP2E1, especialmente en humanos. Además del CYP2E1, las isoformas del CYP450 que participan en el metabolismo del APAP son: CYP1A2, CYP3A4 y CYP2A6 (Gonzalez, 2005; Abdelmegeed et al., 2010).

El metabolito reactivo formado (NAPQI) reacciona con el glutatión reducido (GSH) espontáneamente o catalizado por la transferasa de glutatión (GST) para formar un aducto NAPQI-GSH, el cual es principalmente excretado en la bilis por MRP2, disminuyendo así la posibilidad de lesionar a la célula. Después de una dosis tóxica de APAP, el contenido total de GSH hepático puede disminuir hasta en un 90% afectando tanto al compartimento citosólico como al compartimento mitocondrial. Como resultado de la disminución significativa del GSH intrahepático, el radical NAPQI remanente puede reaccionar con blancos alternativos, en particular con proteínas celulares principalmente mitocondriales. Las proteínas con las que el NAPQI establece aductos incluyen: la sintasa de glutamina, la glutamato deshidrogenasa, la aldehído deshidrogenasa, la N-10 formiltetrahidrofolato deshidrogenasa y la glutatión peroxidasa. Por tanto, se pensaba que la unión covalente del

NAPQI con las proteínas celulares era la causa de muerte celular por necrosis (James et al., 2003).

En años recientes, se describió que la unión covalente del radical NAPQI con proteínas celulares en general o la modificación selectiva de una o más enzimas importantes no parece ser la causa directa de la necrosis celular hepática inducida con APAP, ya que solo es un evento inicial importante en la toxicidad, el cual necesita ser amplificado y propagado para causar la muerte celular (Jaeschke et al. 2003; Jaeschke y Bajt, 2005).

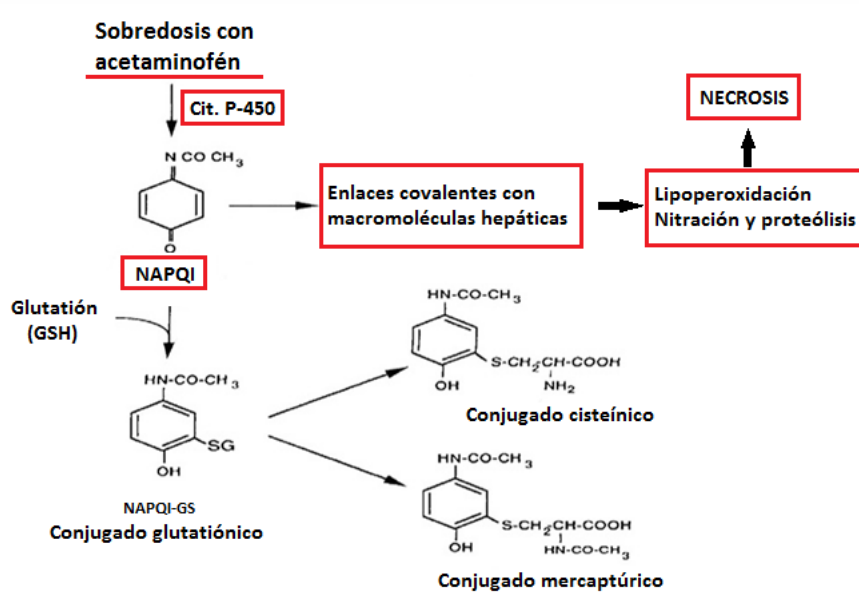


Figura 6. Destoxificación del NAPQI con glutatión reducido (GSH) y toxicidad inducida por sobredosis con acetaminofén (APAP). (Modificado de Katzung, 2005).

2.1.3.2 Disfunción mitocondrial y propagación del daño celular en hepatocitos

Se ha postulado que en el daño hepático agudo por intoxicaciones con Acetaminofén los blancos celulares primarios son proteínas mitocondriales con las cuales el metabolito activo NAPQI forma uniones covalentes, provocando una pérdida subsecuente de la actividad o función mitocondrial, inhibición de la cadena respiratoria con disminución de los niveles de ATP y muerte celular por necrosis (Figura 7) (Jaeschke et al. 2003).

Además de lo anterior, se ha descrito que cuando los niveles de GSH hepático se empiezan a recuperar después de la depleción inicial causada por el NAPQI, las concentraciones hepáticas del glutatión oxidado (GSSG, disulfuro de glutatión), un marcador de formación de ROS intracelulares, aumentan de manera importante. Interesantemente, este incremento de GSSG no ha sido detectado en bilis, sugiriendo que el GSSG se formó en un compartimento intracelular que no permite su liberación, p. ej. la mitocondria. De hecho, se ha cuantificado GSSG en mitocondrias aisladas de animales intoxicados con APAP y sus concentraciones fueron extremadamente altas, concluyendo que el GSSG se formó en dicho compartimento intracelular, el cual no permitió su liberación a la bilis y confirmando que el APAP induce estrés oxidativo mitocondrial (Jaeschke, 1990).

Además, el anión superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico para formar peroxinitrito, una potente especie oxidante y nitrante. Tinciones inmunohistoquímicas contra aductos de nitrotirosina en células bajo proceso necrótico provee evidencia de la formación de peroxinitrito después de la sobredosis con APAP. En fracciones subcelulares se demostró que el peroxinitrito es predominantemente generado en la mitocondria teniendo como principal productor de óxido nítrico a la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), siendo consistente con la formación del anión superóxido por la cadena transportadora de electrones en estos orgánulos celulares (James et al. 2003).

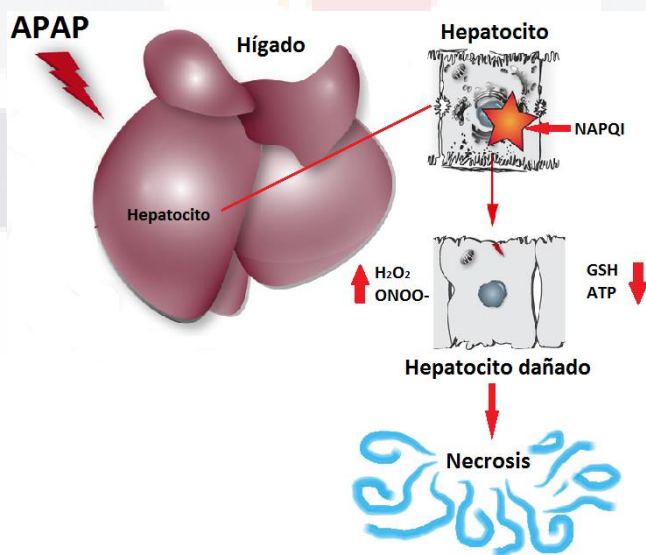


Figura 7. Mecanismo de daño celular hepático por intoxicaciones con APAP. *NAPQI*, *N*-acetil-*p*-benzoquinonaimina; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; $ONOO^-$, peroxinitrito; *GSH*, glutatión reducido; *ATP*, adenosin trifosfato. Modificado de Szabo & Csak, 2012.

Es bien sabido que el estrés oxidativo causado por ROS y RNS, así como el incremento en los niveles de Ca^{2+} inducen la permeabilidad de la membrana mitocondrial (MPT, *por sus siglas en inglés*), en muchos tipos de células incluyendo los hepatocitos. La MPT es caracterizada por edema mitocondrial, desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la formación de poros en la membrana interna mitocondrial. Las consecuencias de la MPT generan un desajuste del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), inhibición de la síntesis de ATP y, finalmente, la muerte celular por necrosis. La MPT es dependiente de la presencia de Ca^{2+} citosólico. Después de que la sobredosis con APAP disminuye los niveles de GSH en la mitocondria, induce la formación de peroxinitrito en la misma, y causa una acumulación de Ca^{2+} por inhibición de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} - Mg^{2+} (Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPasa) (Kim et al., 2003).

Recientes investigaciones hipotetizan que las ROS y los productos de las reacciones de Fenton pueden ser importantes en la inducción de la MPT y la muerte celular por necrosis *in vitro*. Además de la MPT, el peroxinitrito puede causar un amplio número de efectos adversos en la mitocondria. También se ha demostrado un decaimiento del ADN mitocondrial (mtADN) durante la hepatotoxicidad con APAP (Cover et al., 2005).

La liberación del Ca^{2+} mitocondrial, junto con la inhibición de la Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática, conlleva a un incremento de los niveles de Ca^{2+} citosólico suficiente para activar proteasas dependientes de Ca^{2+} como las calpainas, además de la activación de endonucleasas dependientes de Ca^{2+} . Estas enzimas pueden lisar proteínas estructurales dentro de la célula y contribuyen a la muerte celular por necrosis, además, al liberarse estas enzimas de una célula necrótica pueden afectar a las células vecinas y expandir el daño en el hígado. El daño al ADN y la lesión celular se ha prevenido con el uso de inhibidores generales de endonucleasas, lo que sugiere que la fragmentación del ADN mediada por estas enzimas es un evento crítico e importante en esta fisiopatología. La endonucleasa más estudiada es el factor de fragmentación del ADN 40 (DFF40), la cual es activada a través del bloqueo de su inhibidor (DFF45/ICAD) por la caspasa-3. En el hígado, la caspasa-3 es mayormente activada por el citocromo c que se libera de la mitocondria y la activación de la caspasa-9 por el apoptosoma. Además, el tratamiento con bloqueadores de canales de

Ca²⁺ inhibe la acumulación nuclear de Ca²⁺, disminuyendo la fragmentación del ADN y el daño hepático (Yacovlev et al., 2000; Nagata et al., 2003).

El miembro de la familia de proteínas pro-apoptóticas Bcl-2 (Bax) reside en el citosol pero puede translocarse a la mitocondria y formar poros en su membrana externa ya sea sola o en combinación con otras proteínas Bcl-2 (Bad o Bid). La formación de estos poros, junto con la formación de poros en la membrana interna, puede liberar proteínas desde el espacio intermembranal de la mitocondria por cambios en la permeabilidad de la membrana. El factor de inducción de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G son proteínas que han sido implicadas en la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear del ADN, respectivamente. Además, la translocación de Bax a la mitocondria inducida por APAP puede liberar rápidamente proteínas intermembranales, p.ej. endonucleasa G, AIF, el segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria (Smac), y el citocromo c. Las endonucleasas G y AIF se translocan al núcleo y generan daño al ADN, el cual se correlaciona con la muerte celular por necrosis. Por lo tanto, la endonucleasa G y el AIF pueden ser los mediadores o conectores entre la formación de poros mediada por Bax en la membrana externa mitocondrial y la fragmentación del ADN nuclear (Bajt et al., 2007; Jaeschke and Bajt, 2005).

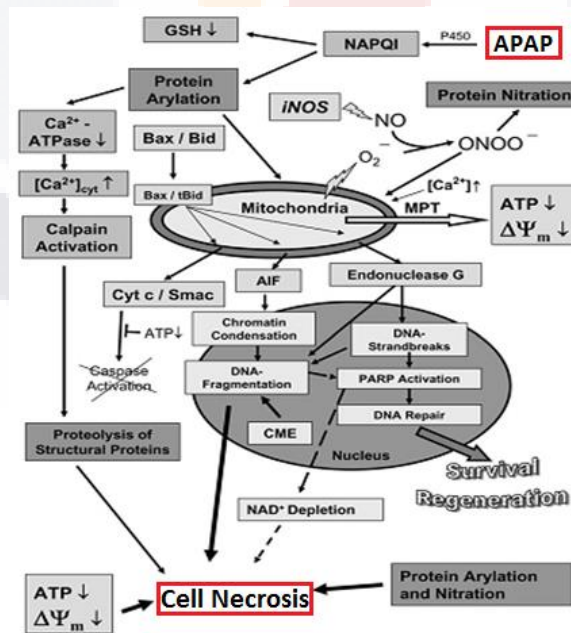


Figura 7. Mecanismo de daño al interior de los hepatocitos inducido con acetaminofén (APAP). Tomado de Jaeschke (2005).

2.1.4 Epidemiología de la toxicidad por Acetaminofén

El primer caso de hepatotoxicidad por acetaminofén fue reportado en Inglaterra en el año 1966. El acetaminofén es el fármaco más investigado en los centros de intoxicación de Estados Unidos, en donde más de 25 billones de dosis son usadas anualmente y más de 200 millones de prescripciones que contienen acetaminofén, usualmente en combinación con un opioide, son dispensados al año. También, acetaminofén es la sustancia más comúnmente utilizada para suicidios en el Reino Unido.

En Inglaterra, país asociado con una elevada incidencia de insuficiencia hepática y un gran número de muertes por año debidas a sobredosis con AINE's y acetaminofén, se legisló (1998) la disminución de la cantidad de comprimidos por venta y la inclusión de advertencias sobre la toxicidad en el envase. Esta medida disminuyó la morbi-mortalidad (20%), así como el número de trasplantes hepáticos relacionados con la ingesta de APAP (50%) (Lee, 2008; Clark et al., 2012).

En un estudio sobre el uso de medicamentos en EUA, se encontró que más del 80% de personas adultas usan por lo menos un fármaco de venta libre o de prescripción cada semana, y que el 25% utiliza al menos cinco. Los analgésicos OTC acetaminofén, ibuprofeno y ácido acetilsalicílico son los medicamentos más frecuentemente usados, consumiéndolos aproximadamente del 17-23% de la población cada semana (Krenzelok & Royal, 2012; Fendrick et al., 2008).

En el reporte anual de la Asociación Americana de Centros de Control de Intoxicaciones del año 2011, se reportó que en Estados Unidos los analgésicos ocupan el primer lugar dentro de la categoría de sustancias más frecuentemente implicadas en la exposición humana y en la categoría de sustancias con mayor tasa de aumento de exposición. Este reporte presenta 1,995 muertes de las cuales 1,689 fueron provocadas por fármacos analgésicos destacando el Acetaminofén (93.54%), el Ácido Acetilsalicílico (4.83%) y el Ibuprofeno (1.61%) (Bronstein et al., 2012).

Entre 2001 y 2011 se reportó que 2,981 personas recibieron trasplante hepático por hepatitis fulminante a nivel mundial; de los cuales 1,948 fueron pacientes trasplantados en

América, siendo la intoxicación con acetaminofén una de las etiologías más frecuentes de dicha patología (Moreno, 2013).

Un estudio sobre las intoxicaciones más frecuentes en el Servicio de Urgencias Pediátricas del Hospital General “La Raza”, incluyó a 993 pacientes intoxicados que correspondieron al 0.5% de la consulta del servicio. El 71% fue por intoxicaciones agudas y el pico etario fue de uno a dos años (33.8%). El 60.5% fue debido a exposiciones accidentales y el 14.6% suicidas. La principal vía de contacto fue gastrointestinal (81.2%) y el acetaminofén uno de los xenobióticos usados con más frecuencia (Fernández-Barocio, 2013).

2.2 Fitocaracterización de *Opuntia streptacantha* Lemaire y *Opuntia robusta* Wendland

2.2.1 El género *Opuntia*, origen y taxonomía

Dentro de las cactáceas, el género *Opuntia* es el más diverso y ampliamente distribuido en América con entre 191-215 especies, según la autoridad taxonómica que se consulte. Se consideran 93 especies de *Opuntia* silvestres en México, casi el 50% del total de las especies conocidas de *Opuntia* en el Continente Americano, de las cuales 62 (66.7%) son endémicas. Este género, así como toda la Familia Cactaceae, es originario de América, la ausencia de especies nativas fuera de este continente refleja un origen reciente de la familia (Andreson, 2001; Scheinvar, 2011).

Las *Opuntia* se distribuyen en diferentes tipos de vegetación, pero cuando se asocian con diferentes especies del mismo género, en un área determinada forman el llamado matorral crasicaule mejor conocido como “nopalera”. Este tipo particular de vegetación predomina en el desierto del estado de Chihuahua y en la cuenca del río Balsas. Existen otros tipos de nopaleras creciendo como cercas vivas, en huertos familiares y en plantaciones comerciales. Aún no se cuenta con datos precisos que sustenten la región de origen del género *Opuntia*, sin embargo, México es un importante centro de diversificación de este género (Bravo, 1987).

La taxonomía de las *Opuntia* es complicada, debido a que la mayoría de los sistemas de clasificación contienen errores en conceptos de género y especie, generando mucha

sinonimia; además, su origen reciente les permite estar en evolución activa y por lo tanto de diferenciación. Asimismo, la variación interespecífica puede deberse no sólo a cambios genéticos sino también a las diferencias en las condiciones ambientales, las cuales afectan la talla, coloración de la flor, longitud de espinas, etc. dando lugar a confusiones taxonómicas (Andreson, 2001).

En la Altiplanicie Meridional de México, correspondiente a los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, San Luis Potosí, Zacatecas y parte de los estados de Jalisco, Michoacán y Querétaro, se encuentra la mayor riqueza de variantes silvestres (35%) y cultivadas de *Opuntia* (144 variedades). Estos estados productores de tuna y xoconostle, pueden agruparse en dos grandes regiones: Región Centro-Norte que comprende los Estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro y Jalisco y la Región Centro-Sur Estado de México, Tlaxcala, Hidalgo y Puebla (Scheinvar, 2011).

2.2.2 Evaluaciones previas de la capacidad antioxidante de los frutos de *Opuntia streptacantha* Lemaire y *Opuntia robusta* Wendland.

Durante décadas, en el estado de Aguascalientes y zonas aledañas el nopal y la tuna han sido amplia y tradicionalmente consumidos con fines de alimentación y por las propiedades terapéuticas que les son atribuidas desde la antigüedad. En los últimos años, ha crecido el consumo de estos productos debido a la reciente información que se ha generado sobre los efectos benéficos que esto conlleva en personas con enfermedades crónico-degenerativas, como el cáncer, y patologías generadas por factores medioambientales. Muchas de estas propiedades terapéuticas son atribuidas a la presencia de compuestos bioactivos de tipo fenólico, pigmentos y metabolitos vegetales presentes en las diferentes variedades de cactáceas y sus frutos (Stintzing et al., 2005).

Específicamente, en Aguascalientes abundan diferentes especies del género *Opuntia* dentro de las cuales destacan *Opuntia streptacantha* Lemaire y *Opuntia robusta* Wendland, por su amplia presencia en diferentes puntos a lo largo y ancho del estado. Los frutos de estas dos especies, tuna cardona (*O. streptacantha*) y tuna tapona (*O. robusta*), son comestibles y su

consumo es limitado debido a que solo se pueden obtener en el periodo correspondiente del mes de junio al mes de octubre.

Es importante resaltar que a pesar de que este tipo de vegetación es ampliamente adaptable a diversos tipos de clima, la variación en el mismo puede determinar la presencia y concentración de compuestos bioactivos presentes en las plantas y en consecuencia de sus frutos. Por tanto, y a pesar de su amplio uso, existen muy pocos reportes que indiquen la composición y propiedades nutraceuticas de estos dos tipos de tuna.

En 2011, Yahia & Mondragon-Jacobo analizaron 10 tipos diferentes de tunas obtenidas de campos experimentales del INIFAP en San Luis de la Paz, Guanajuato, incluyendo a las especies *Opuntia streptacantha* y *Opuntia robusta*. Se determinaron el contenido de pigmentos presentes en las muestras como las betalaínas (betacianinas, betaxantinas y contenido total), clorofilas (a, b y contenido total) y carotenoides totales; también determinaron el contenido de algunos importantes componentes antioxidantes como vitamina C (ácido ascórbico, ácido dihidro-ascórbico y contenido total), tocoferoles (α , δ y totales), β -carotenos y el contenido total de compuestos fenólicos. Asimismo, evaluaron la capacidad antioxidante de todas las tunas por los métodos FRAP y DPPH. Se encontró que la tuna taponera es la especie con mayor contenido de pigmentos como betalaínas y carotenoides; también de ácido ascórbico y compuestos fenólicos. De las 10 especies estudiadas, la tuna cardona fue la tercera con mayor contenido de compuestos nutricionales y bioactivos. La capacidad antioxidante de ambas tunas fue elevada en el ensayo con FRAP, destacando la tuna taponera como la de mayor actividad antioxidante, sin embargo, para el ensayo con DPPH los resultados no mostraron diferencias significativas respecto de otras especies con menor contenido de pigmentos y compuestos fenólicos.

2.2.3 *Opuntia streptacantha* Lemaire

N.V.: “tuna cardona”; “nopal cardón”, “nopal hartón”, “cenizo”, “chaveño”.

Arborescente, muy ramosa, hasta de 5 m de altura. Tronco bien definido hasta de 45 cm de diámetro. *Artículos* obovados hasta orbiculares, de 25-30 cm de longitud y de 14-18 cm de anchura, color verde oscuro. *Aréolas* pequeñas de 1-2 mm de largo, cercanas entre sí para este grupo. *Espinas* numerosas de 3-7, extendidas, en ocasiones algunas de ellas algo

adpresas, blancas; glóquidas color café rojizo, muy cortas. *Flores* de 6-9 cm de ancho, amarillas hasta anaranjadas; sépalos rojizos; filamentos verdosos o rojizos; lóbulos del estigma 8 a 12, verdes. *Fruto* globoso, de 4-5cm de longitud por 3.5-5cm de diámetro, rojo obscuro o a veces amarillento, tanto por fuera como por dentro.

Distribución: *Opuntia streptacantha* es uno de los nopales arbóreos característicos de la zona árida del Altiplano, así se encuentra en los Estados de Hidalgo, Querétaro, Guanajuato, San Luis Potosí, Aguascalientes y Zacatecas; por el sur llega hasta el Valle de México, cultivadas o en estados silvestre; se ha visto en algunos pueblos de Puebla y Oaxaca (Figura 12). Crece con preferencia en las laderas de los cerros, abanicos aluviales y en llanuras bien drenadas formando parte de la vegetación del matorral crasicaule, caracterizado por la abundancia de diferentes especies del género *Opuntia*, como el “duraznillo” *O. leucotricha*, “nopal de Castilla” *O. megacantha*, la “cuija” *O. cantabrigiensis*, el “nopal tapón” *O. robusta* y el “cardenche” *O. imbricata*.

Desde el punto de vista económico, este nopal es importante pues sus frutos y artículos son comestibles y forrajeros. Existen numerosos híbridos, así como variedades y formas hortícolas (Anderson, 2001; Bravo, 1978).



Figura 8. Imagen ilustrativa de *Opuntia streptacantha* Lemaire (nopal cardón) en estado silvestre (izquierda) y de una penca o cladodio con su fruto (derecha).



Figura 9. Imagen del fruto de *Opuntia streptacantha* (tuna cardona).

Tabla 1. Clasificación científica de *Opuntia streptacantha* (nopal cardón). Modificado de (Anderson, 2001; Bravo, 1978).

Reino	<u><i>Plantae</i></u>
División	<u><i>Magnoliophyta</i></u>
Clase	<u><i>Magnoliopsida</i></u>
Orden	<u><i>Caryophyllales</i></u>
Familia	<u><i>Cactaceae</i></u>
Subfamilia	<u><i>Opuntioideae</i></u>
Género	<u><i>Opuntia</i></u>
Especie	<u><i>Streptacantha</i></u>
Nombre	<u><i>Opuntia streptacantha</i> Lemaire</u>

2.2.4 *Opuntia robusta* Wendland

N.V. “tuna tapona”, “nopal tapón”, “bartolona”, “nopal camueso”.

Arbustiva, muy ramosa, no muy alta, de 1 a 3m. *Tronco* más o menos bien definido. *Artículos* orbiculares o algo oblongos, de 25 a 40cm de longitud o más; muy robustos, color verde azulado claro. *Aréolas* grandes, distantes, con glóquidas cafés. *Espinas* vigorosas, 2 a 12, como de 5cm de longitud, morenas o amarillentas en la base y blancas hacia la extremidad. *Flores* grandes, amarillas de 5 a 7cm de ancho, lóbulos del estigma verdes. *Fruto* globoso o elíptico, al principio más o menos tuberculado, de 6 a 9cm de longitud, purpurino o con tinte verdoso. Se han encontrado ejemplares con flores unisexuadas.

Distribución: Zona árida de los Estados del Centro, Aguascalientes, Zacatecas, Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí, Guanajuato y Michoacán (Figura 12).

Estas plantas se caracterizan por sus grandes artículos orbiculares azulados y sus espinas vigorosas, blanco amarillentas. Sus frutos son comestibles (Anderson, 2001; Bravo, 1978).



Figura 10. Imagen de un cladodio de *Opuntia robusta* Wendland (nopal tapón) en estado silvestre con diversos brotes frutales (tuna taponas).

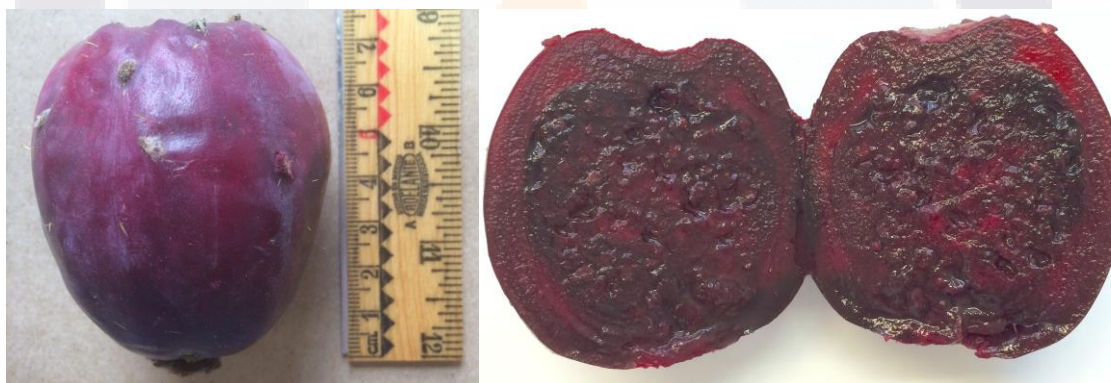


Figura 11. Imagen del fruto maduro de *Opuntia robusta* Wendland (tuna taponas).

Tabla 2. Clasificación científica de *Opuntia robusta* (nopal tapón). Tomado de Anderson (2001) y Bravo (1978).

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Caryophyllales</i>
Familia	<i>Cactaceae</i>
Subfamilia	<i>Opuntioideae</i>
Género	<i>Opuntia</i>
Especie	<i>Robusta</i>
Nombre	<i>Opuntia robusta</i> Wendland



Figura 12. Mapa de la República Mexicana en el que se indica con color verde la principal zona de producción y distribución de las especies *Opuntia streptacantha* y *Opuntia robusta* (Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí, Michoacán, Hidalgo, Querétaro y Guanajuato) y con color azul los estados en los que se encuentran en menor proporción (Puebla, Oaxaca, Edo. de México y Tlaxcala).

3 JUSTIFICACIÓN

El consumo frecuente de acetaminofén continúa siendo una importante causa de falla hepática aguda alrededor del mundo debido a las actuales tendencias de autoconsumo o automedicación con fármacos de venta libre u *over-the-counter* (OTC, *por sus siglas en inglés*), superada solamente por etiologías infecciosas. Es también la causa más común de muerte en EUA tras exposiciones tóxicas relacionadas con analgésicos. Una numerosa cantidad de pacientes con sobredosis intencionales y no intencionales son admitidos al departamento de emergencias hospitalarias. Se estima que en los EUA el costo del tratamiento para las personas con sobredosis de acetaminofén asciende a 86.9 millones de dólares por año. Sin embargo, en más de 30 años de investigaciones no se ha podido definir claramente el mecanismo exacto de toxicidad con acetaminofén. APAP es uno de los analgésicos-antipiréticos de mayor uso clínico y domiciliario debido a su libre comercialización, su alta efectividad y su bajo costo, lo cual hace más fácil que sea uno de los principales agentes causantes de sobredosis accidentales e intencionales (Ward et al., 2012; Bronstein et al., 2012).

La literatura actual implica al N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI), como el principal metabolito responsable de la hepatotoxicidad del acetaminofén. Al haber una intoxicación con acetaminofén, la ruta metabólica normal se sobrecarga, entonces se produce una gran

cantidad de NAPQI, causando hepatotoxicidad. La hepatotoxicidad generada por el incremento del radical NAPQI se da por la vía de la oxidación de lípidos y proteínas de membrana que causan en consecuencia una disfunción mitocondrial. Un tratamiento ya bien conocido para disminuir los efectos tóxicos causados por las sobredosis con acetaminofén es la N-acetilcisteína (NAC). El problema en realidad es la falta de familiaridad por parte del equipo médico y de enfermería para realizar un diagnóstico y tratamiento oportuno que en consecuencia ayude a restaurar los niveles de glutatión y prevengan el daño hepático, además, en el caso particular de acetaminofén, se debe interrogar al paciente sobre el consumo crónico de alcohol, el ayuno prolongado y el consumo de otros fármacos inductores del citocromo-P450, lo que incluso puede provocar el retraso en el diagnóstico asociándose a un incremento en la mortalidad de un 15%, comparada con una tasa mucho menor en aquellos pacientes con un diagnóstico e inicio de tratamiento precoz y enérgico (Mancipe, Fernández & Fernández, 2010; Jaeschke et al., 2003).

En la actualidad existe una tendencia en retomar el uso de plantas o sub-productos medicinales tradicionales como una alternativa para prevenir y tratar diversas enfermedades que representan un problema de salud pública a nivel mundial como las intoxicaciones medicamentosas causadas por el consumo desmedido de analgésicos, por ejemplo. Por ello, en el presente trabajo se propone el consumo profiláctico de jugo de dos diferentes tipos de tuna, *Opuntia streptacantha* y *Opuntia robusta* (tuna cardona y tuna taponá), que se encuentran en abundancia en el estado de Aguascalientes y zonas aledañas, para evitar o disminuir el daño oxidativo a nivel hepático causado por una intoxicación aguda con acetaminofén en ratas.

La justificación de esta propuesta se respalda en investigaciones recientes que han demostrado que este tipo de tunas específicamente, además de la presencia de compuestos fenólicos antioxidantes como los flavonoides, también, contienen de manera importante un pigmento betaláínico que les otorga a ambas su coloración morada-purpúrea y a los cuales se les han atribuido diversos efectos bio-terapéuticos como antioxidantes, anti-tumorales, inhibidores de la lipoperoxidación, la hemólisis oxidativa y como antiinflamatorios (Azeredo, 2009).

4 HIPOTESIS

El contenido total de compuestos antioxidantes presentes en los extractos liofilizados de los frutos de las especies *Opuntia streptacantha* y *Opuntia robusta* (tuna cardona y tuna tapona), tiene la capacidad de disminuir significativamente el daño hepático causado por la intoxicación aguda con acetaminofén en ratas macho de la cepa albina Wistar.

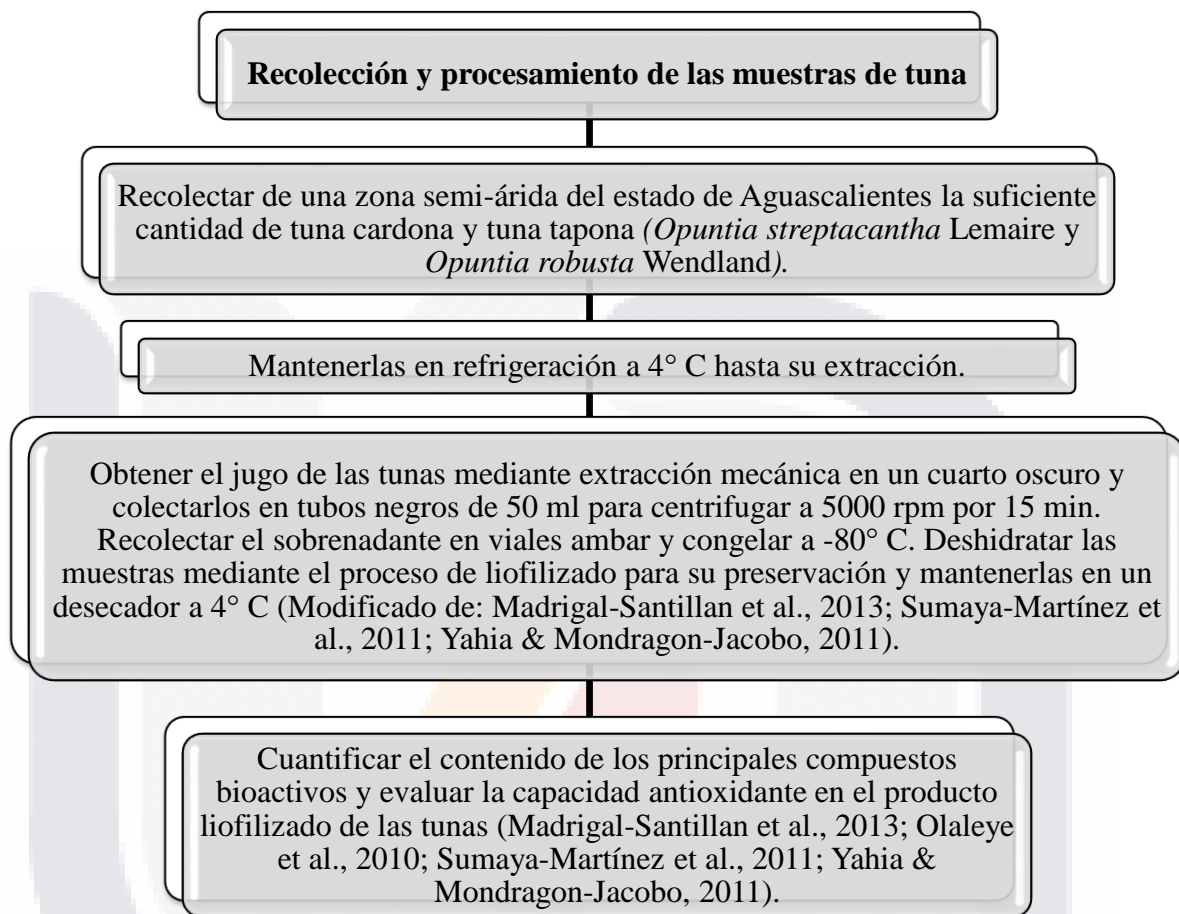
5 OBJETIVO GENERAL

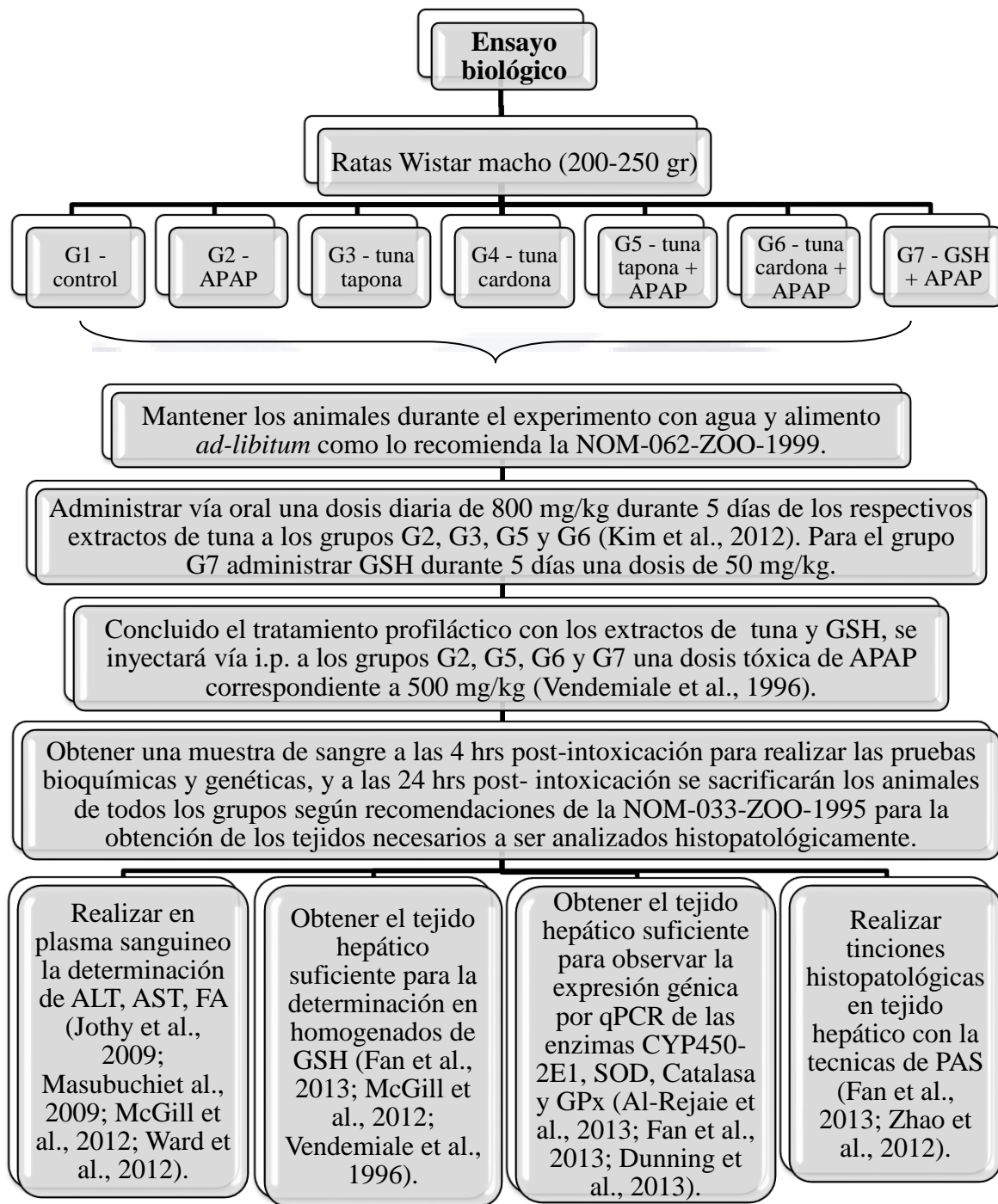
Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos liofilizados del fruto de las especies *Opuntia streptacantha* y *Opuntia robusta* (tuna cardona y tuna tapona) en la hepatotoxicidad producida con acetaminofén.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener extractos hidrosolubles de tuna cardona y tuna tapona.
- Obtener productos liofilizados de los extractos de tuna para su conservación y fácil dosificación.
- Analizar los extractos de tuna cardona y tuna tapona para obtener una caracterización química de los principales compuestos bioactivos presentes.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de tuna.
- Establecer el daño hepático con una sobredosis de APAP en ratas.
- Evaluar la capacidad hepatoprotectora de los extractos de tuna cardona y tuna tapona ante el daño inducido con APAP en ratas.
- Cuantificar la expresión génica relativa de diferentes enzimas involucradas en el metabolismo y el efecto antioxidante a nivel hepático.

6 DISEÑO EXPERIMENTAL





Abreviaturas: APAP – acetaminofén; i.p. – intraperitoneal; ALT – alanin aminotransferasa; AST – aspartato aminotransferasa; FA – fosfatasa alcalina; GSH – glutatión reducido, qPCR – reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, CYP450-2E1 – citocromo P-450 isoforma 2E1; SOD – superóxido dismutasa; GPx – glutatión peroxidasa; PAS – ácido peryódico de Schiff.

7 MATERIAL Y METODOS

7.1 Recolección de los frutos y método de extracción

Los frutos maduros de las especies *Opuntia robusta* y *Opuntia streptacantha* fueron colectados de una región semi-árida en el municipio de el Llano a 26.7 km de la capital del estado de Aguascalientes, México en las coordenadas 21°46'55.86"N, 102° 6'16.08"O, a 1994 metros sobre el nivel del mar. Las frutas fueron peladas para posteriormente obtener el jugo de cada una de ellas mediante un extractor de jugos BRAUN J500 (Braun GmbH, Germany). El jugo de cada especie de fruta fue mezclado por separado y depositado en tubos oscuros de 50 ml para centrifugarlos a 5 rpm durante 15 min a 4° C. Después de esto fueron filtrados con papel filtro Whatman 40 (8µm tamaño de poro), depositados en alícuotas de 50 ml en frascos ambar de 100ml, se almacenaron a -80° C y fueron liofilizados en un liofilizador Labconco FreeZone 18 Liter Console Freeze Dry System (Labconco Corp., Kansas City, MO, USA) para su conservación. [modificado de: Madrigal-Santillan et al., 2013; Sumaya-Martínez et al., 2011].

7.2 Caracterización de los extractos

El jugo de cada especie de fruta fue clarificado a 12,000 g (11,237 rpm) por 15 min a 15° C y fue usado para determinar los principales compuestos bioactivos presentes en los extractos, así como su capacidad antioxidante por varios métodos.

7.2.1 Determinación de flavonoides

La determinación de flavonoides totales se realizó conforme a lo descrito por Zhishen et al., 1999, con algunas modificaciones. El fundamento del presente análisis se basó en la formación de complejos de color amarillo resultantes de la combinación de AlCl₃ (cloruro de aluminio) con el grupo ceto del C4 o bien, con el C3 o C5 del grupo ortodihidroxil de los anillos A o B de los flavonoides presentes en las muestras.

La metodología consistió en realizar por triplicado, en una placa de 96 pozos, la mezcla de 50 µl de las muestras, previamente diluidas 1:2 con agua destilada, con 100 µl de agua destilada, 10 µl de una solución de NaNO₂ (15%) y posterior agitación. Las muestras se

dejaron reposar durante 6 min a temperatura ambiente para después agregarse 15 µl de una solución de AlCl₃ (10%), se agitaron y se dejaron reposar nuevamente 6 min a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 200 µl de una solución de NaOH (4%) a cada pozo y se agitaron. Al mismo tiempo, se realizó una curva estándar con quercetina como referencia a concentraciones desde 0-100 µg/ml y se les aplico el mismo método. La absorbancia de las muestras y de la curva estándar fue medida a 410nm en un lector de microplacas Power Wave XS (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) y procesadas con el software Gen 5.0.

La concentración de flavonoides presentes en las muestras de los extractos de tuna tapona y de tuna cardona se determinó por triplicado, mediante la ecuación de la recta obtenida de la curva estándar hecha con diferentes concentraciones de quercetina, un flavonoide hidrosoluble (Figura 13).

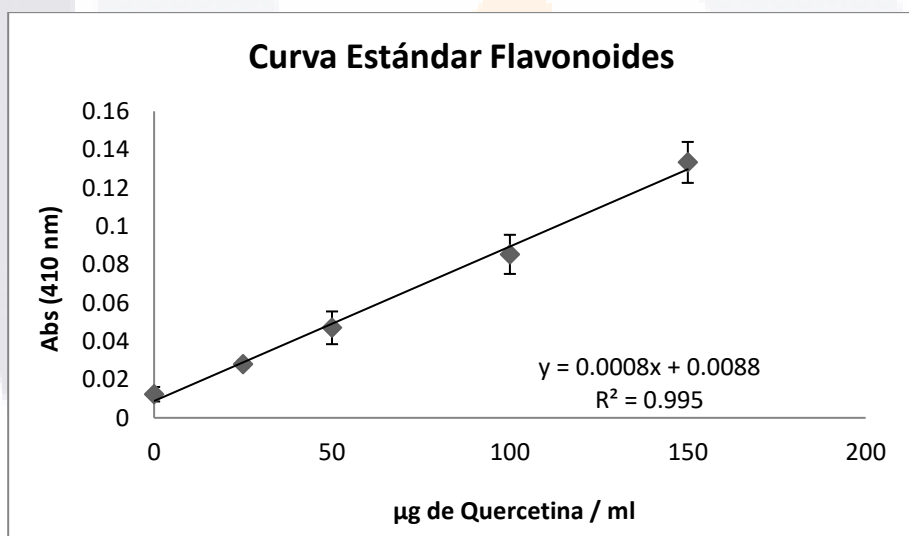


Figura 13. Curva estándar realizada con quercetina a concentraciones de 0-150 µg/ml para cuantificar flavonoides totales en las muestras de tuna. Cada punto representa el promedio de tres mediciones y su desviación estándar. Se muestra la ecuación de la recta y el valor R-cuadrado.

7.2.2 Determinación de betalaínas

Las betalaínas son un grupo de pigmentos naturales asociados principalmente con plantas o frutos. La estructura química de estos compuestos es derivada del ácido betalámico y, dependiendo de los componentes unidos a su estructura principal pueden ser clasificadas

como betacianinas o betaxantinas. La determinación de las mismas se realizó de acuerdo a lo descrito por Stintzing et al., 2005 con ligeras modificaciones. Las muestras fueron diluidas 1:10 con agua destilada y posteriormente se colocaron por triplicado en una placa de 96 pozos para posteriormente obtener sus valores de absorción en un lector de microplacas Power Wave XS (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) y procesadas con el software Gen 5.0. el contenido de betalainas totales fue calculado con la siguiente ecuación:

$$BT \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] = \left[\frac{A * FD * PM * 1000}{\epsilon * l} \right]$$

en donde:

A: absorbancia de la muestra

FD: factor de dilución

PM: peso molecular

ε: coeficiente de extinción molar

l: longitud de lectura de la celda

Para la cuantificación de betacianinas y betaxantinas, fueron aplicados los pesos moleculares y los coeficientes de extinción molar de betanina (PM= 550 g/mol; ε= 60000 L/(mol cm) en agua; λ= 538nm) e indicaxantina (PM= 308 g/mol; ε= 48000 L/(mol cm) en agua; λ= 480nm).

7.2.3 Determinación de ácido ascórbico

El ácido ascórbico es un compuesto orgánico ampliamente conocido por sus propiedades antioxidantes. Para la determinación del mismo se utilizó el método colorimétrico empleado por Dürüst et al., 1997 con algunas modificaciones. Éste consistió en preparar diferentes soluciones como DCPI (2,6'diclorofenolindofenol sal disódica) a 24 mg/L de agua desionizada, ácido oxálico al 0.4% en agua desionizada, buffer de acetatos (3 gr de acetato de sodio, 7 ml de agua desionizada y 10 ml de ácido acético glacial), y una solución stock de ácido ascórbico de 100 mg/L en ácido oxálico 0.4%. Una vez preparadas las soluciones de trabajo, se procedió a colocar por triplicado en tubos eppendorf 100 µl de

cada muestra previamente diluidas 1:5 con ácido oxálico al 0.4%, 100 µl de buffer de acetatos y 800 µl de DCPI. El mismo procedimiento fue aplicado para la curva estándar realizada con diferentes concentraciones de ácido ascórbico de 0-100 mg/L. Los tubos preparados fueron mezclados por agitación y las soluciones fueron depositadas en una placa de 96 pozos para ser medidas a 520nm en un lector de microplacas Power Wave XS (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) y procesadas con el software Gen 5.0. Para la cuantificación de ácido ascórbico en los extractos de frutos de las dos especies de tuna, se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones de ácido ascórbico para calcular su concentración en los extractos (Figura 14).

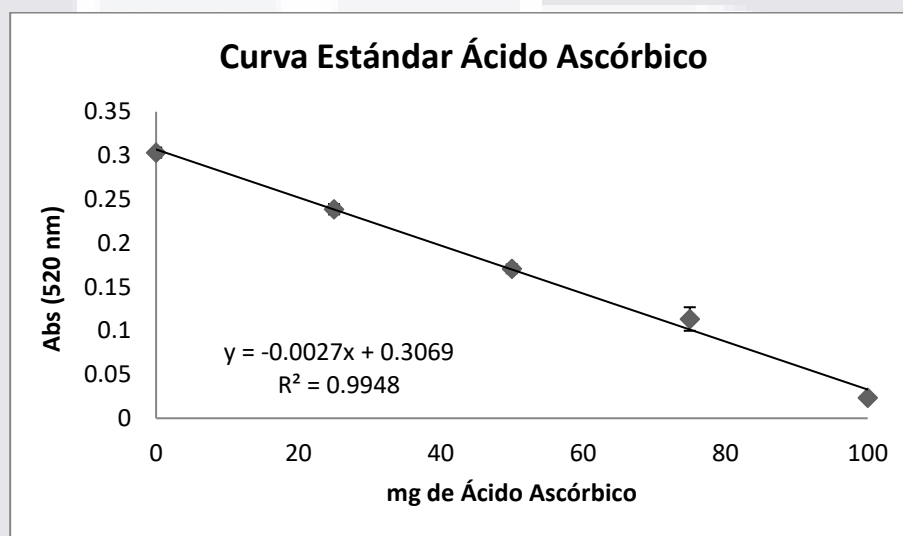


Figura 14. Curva estándar realizada con ácido ascórbico para la cuantificación del mismo en los extractos de tuna tapona y tuna cardona. Se muestra la ecuación de la recta y el valor R-cuadrado. Cada punto representa el promedio de tres mediciones y su desviación estándar.

7.2.4 Determinación de compuestos fenólicos totales

La cuantificación de compuestos fenólicos o polifenólicos totales se realizó empleando un método colorimétrico con el reactivo Folin-Ciocalteu como lo describe Stintzing et al., 2005. El reactivo Folin-Ciocalteu es una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, la cual es reducida a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica. Esta reducción ocurre bajo condiciones alcalinas mediante la presencia de bicarbonato de sodio. La coloración que se generó de la mezcla del reactivo con las

muestras fue medida a 765nm y reflejó la cantidad total de compuestos fenólicos presentes en las muestras y se expresaron como equivalentes de ácido gálico.

La metodología consistió en mezclar 100 µl de las muestras, o de las soluciones de la curva estándar, se agregaron 500 µl del reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:10 en agua destilada y 400 µl de una solución de carbonato de sodio (NaCO₃) al 7.5%. Las muestras se agitaron y se dejaron reposar en la oscuridad por 30 min. Transcurrido el tiempo las muestras fueron depositadas en una placa de 96 pozos para ser medidas en un lector de microplacas Power Wave XS (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) y procesadas con el software Gen 5.0 a 765nm. La concentración de fenólicos totales presentes en las muestras fue calculada a partir de la ecuación de la recta obtenida de la curva estándar que fue de 0-400 mg equivalentes de ácido gálico/L (Georgé et al., 2005) (Figura 15).

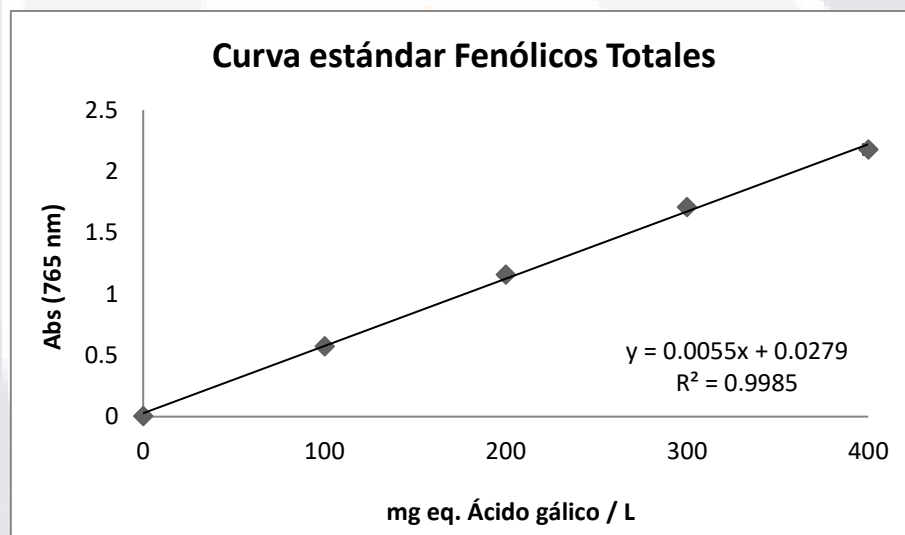


Figura 15. Curva estándar del ácido gálico para la cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos en las muestras de tunas tapona y cardona. Cada punto representa el promedio de tres mediciones y su desviación estándar. Se muestra la ecuación de la recta y el valor R-cuadrado.

7.3 Capacidad antioxidante de los extractos

7.3.1 ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)

Existen diferentes ensayos que han sido empleados para medir de la capacidad antioxidante total de fluidos corporales, extractos de frutas y compuestos puros. El ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS^{•+}, *por sus siglas en inglés*) es un radical

monocatiónico generado por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio y es reducido en presencia de antioxidantes donadores de protones (H⁺). La determinación de la capacidad antioxidante de los extractos usando el catión ABTS^{•+} como agente oxidante fue realizada siguiendo la metodología descrita por Re et al., 1999, con algunas modificaciones. El radical ABTS^{•+} se obtuvo de la mezcla entre ABTS (7mM) y persulfato de potasio (2.45mM) incubados a 4° C por 16 hr protegidos de la luz. Una vez formado el radical fue diluido en etanol 1:15 v/v. las muestras de tuna fueron diluidas 1:5 v/v. Se preparó una curva estándar con ácido ascórbico desde 5-30 mg/100ml. Se añadieron por triplicado para cada muestra 10 µl de las mismas a 490 µl de la dilución del radical ABTS^{•+}. La absorbancia fue medida después de 7 min a 754nm en un lector de microplacas Power Wave XS (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) y procesadas con el software Gen 5.0. Los resultados se expresaron como mg de ácido ascórbico / 100 ml. Para ello, se realizó una curva estándar con ácido ascórbico como antioxidante de referencia para estabilizar el radical catiónico ABTS^{•+} y calcular la ecuación de la gráfica lineal (Figura 16). Con esta recta estándar obtuvimos los valores de la capacidad antioxidante de los extractos de las dos especies de tuna.

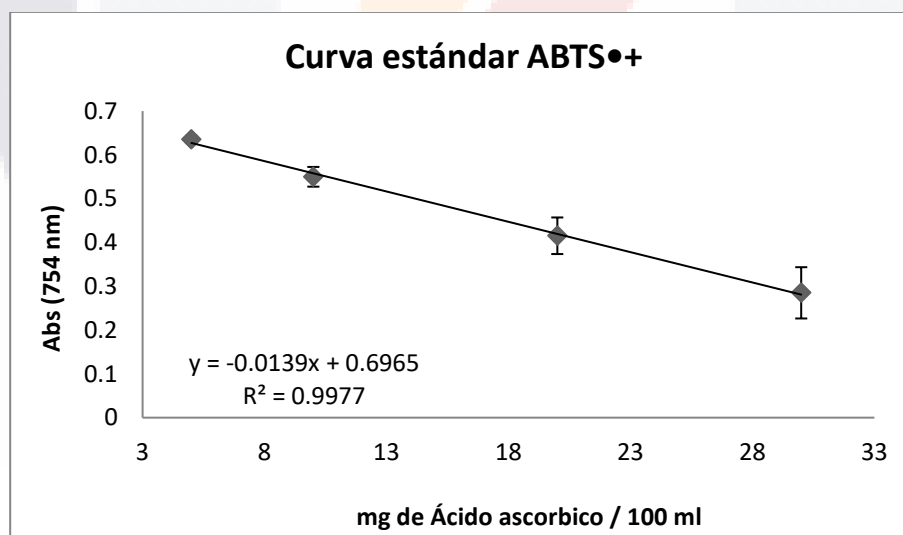


Figura 16. Curva estándar con ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico) para determinar la capacidad antioxidante de los extractos de tuna tapona y tuna cardona. Cada punto representa el promedio de tres mediciones y su desviación estándar. Se muestra la ecuación de la recta.

7.3.2 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)

Mediante este método se evalúa la actividad antioxidante de una muestra o compuesto dada su capacidad para reducir el hierro (III) a hierro (II). El ensayo de FRAP (Poder antioxidante de reducción férrica) se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes presentes en las muestras de donar electrones para reducir especies oxidantes, en este caso hierro (III) a hierro (II). La metodología empleada en la presente tesis fue la descrita por Hinneburg et al., 2006. Para el desarrollo del presente método se utilizaron alícuotas de 100 µl de cada extracto y se adicionaron a 250 µl de buffer de fosfatos (0.6M, pH 6.6) y 250 µl de hexacianoferrato de potasio [K₃Fe (CN)₆] al 1%. La mezcla se incubo durante 30 min a 50° C, después se añadieron 250 µl de ácido tricloroacético al 10% y las muestras se centrifugaron durante 10 min. Se tomó una alícuota de 250 µl del sobrenadante y se mezcló con 250 µl de agua destilada y 50 µl de cloruro férrico al 0.1%. Se tomaron las lecturas de la absorbancia de las muestras a 700nm con un lector de microplacas Power Wave XS (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) y procesadas con el software Gen 5.0. La capacidad para reducir el hierro (III) se reportó como mg de ácido ascórbico / 100 ml. Empleando el mismo método se realizó una curva estándar con ácido ascórbico como compuesto de referencia para obtener la ecuación de la recta (Figura 17). Con ella se calculó la capacidad de los extractos de los frutos de tuna tapona y tuna cardona para reducir el Fe⁺³ a Fe⁺².

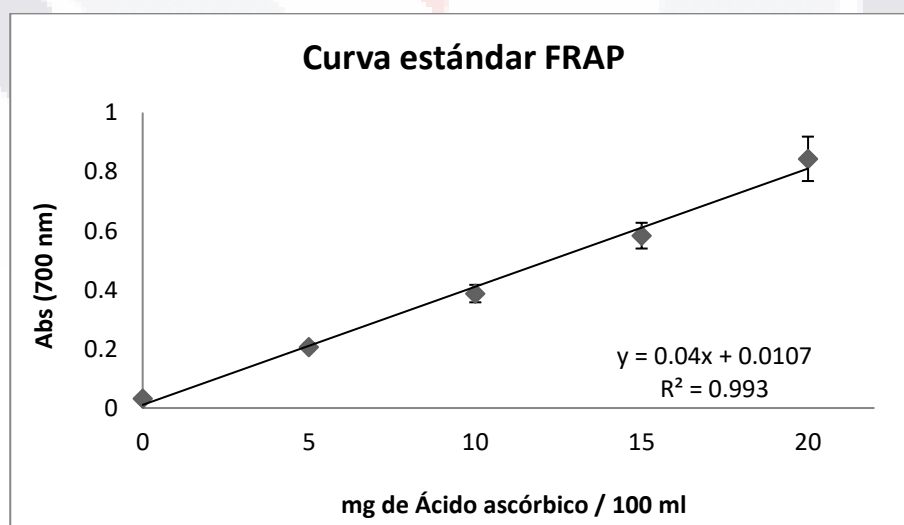


Figura 17. Curva estándar con ácido ascórbico para determinar la capacidad antioxidante de las muestras de

tuna tapona y tuna cardona por el método FRAP. Cada punto representa el valor promedio de tres mediciones con su desviación estándar, se muestra la ecuación de la recta y el valor R-cuadrado.

7.3.3 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

El método DPPH ofrece un primer enfoque para evaluar la capacidad antioxidante de algún compuesto, un extracto o cualquier otra fuente biológica. La metodología para la determinación de la capacidad antioxidante de las frutas del género *Opuntia ssp.* con la técnica del radical libre DPPH• fue realizada según lo describen Morales & Jiménez-Pérez, 2001; con algunas modificaciones. El radical libre DPPH• es un reactivo estable en etanol y con picos máximos de absorción de 417-420nm. Se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de Trolox® que iban desde 0-300 µmol/L y se obtuvo la ecuación del gráfico (Figura 18) y así obtener los resultados de la capacidad antioxidante de las muestras analizadas que fueron reportados como µmol equivalentes de Trolox® / L. Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) es una molécula análoga de la vitamina E, soluble en agua y con fuerte actividad antirradicálica. La técnica consistió en preparar una solución de 7.4mg de DPPH• / 100 ml de etanol. También, se prepararon diluciones 1:10 de las muestras de tuna. Para la obtención de la capacidad antioxidante de los extractos se adicionaron por triplicado en una placa de 96 pozos 50 µl de la muestra, 250 µl de la solución de DPPH• y se dejaron reposar durante 1 hr protegidos de la luz y a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron leídas a 418nm en un lector de microplacas Power Wave XS (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) y procesadas con el software Gen 5.0.

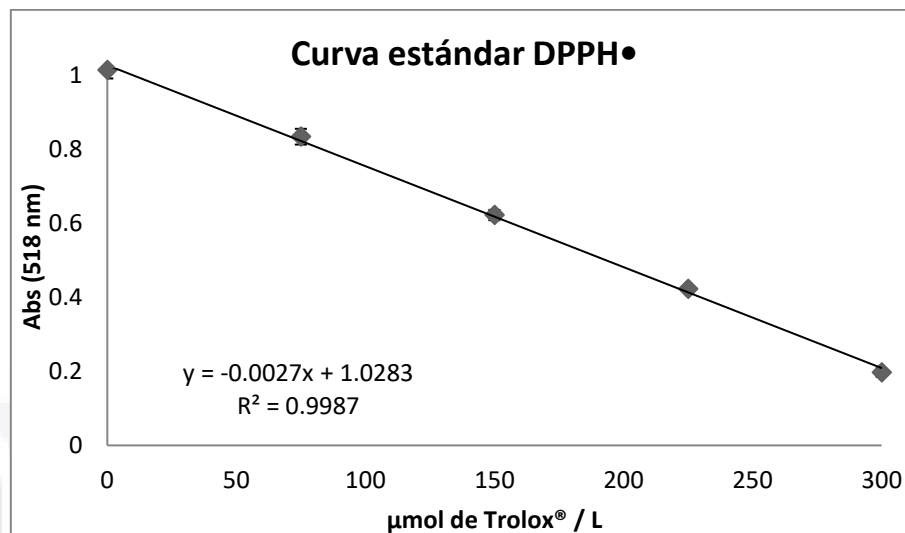


Figura 18. Curva estándar con Trolox® para determinar la capacidad antioxidante de la tuna tapona y tuna cardona por el método DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Cada punto representa el promedio de tres mediciones y su desviación estándar. Se presenta la ecuación de la recta y el valor de R-cuadrado.

7.3.4 Actividad quelante

La actividad quelante refiere a la capacidad de un compuesto para formar complejos con iones metálicos. El presente análisis se realizó siguiendo la metodología descrita por Gulcin et al., 2003, donde se buscó determinar la actividad quelante de los compuestos presentes en los extractos de tuna al hacerlos reaccionar con el ion ferroso (Fe^{2+}) como referencia. Posteriormente la cantidad de ion ferroso que no fue quelado se hizo reaccionar con FerroZina™ generando un color, el cual fue medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 562nm con un lector de microplacas Power Wave XS (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) y procesadas con el software Gen 5.0.

Se colocaron por triplicado 50 μl de las muestras, 25 μl de una solución de cloruro ferroso tetrahidratado (2mM) y 225 μl de metanol; la mezcla se agito y se dejó en reposo por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 200 μl de FerroZina™ (5mM), se volvió a agitar y luego se dejó en reposo a temperatura ambiente por 10 min. Se realizó una curva estándar con EDTA como compuesto de referencia con concentraciones de 2×10^{-4} – 1×10^{-3} mol/L. los resultados fueron reportados como mol equivalente de EDTA/L para

generar la ecuación del gráfico lineal (Figura 19) que nos permitiera calcular la actividad quelante en las muestras de tunas a ser analizadas.

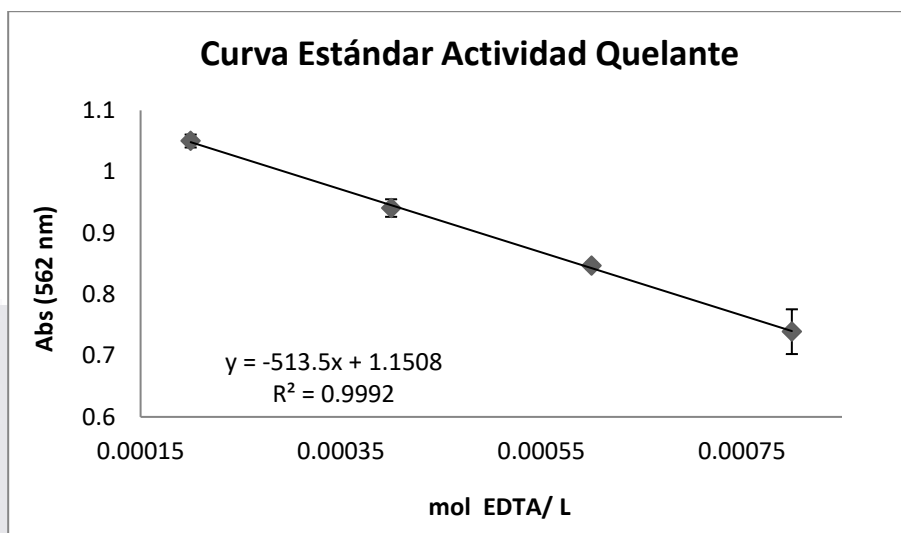


Figura 19. Curva estándar con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para determinar la capacidad de quelación de las muestras de tuna tapona y cardona. Cada punto representa el promedio de tres mediciones con su desviación estándar. Se muestra la ecuación de la recta y el valor R-cuadrado del gráfico linearizado.

7.3.5 Capacidad de absorción de radicales del oxígeno (ORAC)

El ensayo ORAC está basado en la capacidad de oxidación de una sonda fluorescente, comúnmente fluoresceína, por parte de radicales libres contenidos en una solución de AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamida) disulfuro) resultando en una pérdida de la intensidad de la sonda a lo largo del tiempo. La metodología utilizada para ésta determinación fue la descrita por Huang, 2002 con algunas modificaciones, y consistió en preparar una solución de APPH diluida en buffer de fosfatos (pH 7.4) para tener una concentración final de 75mM, una solución stock de fluoresceína 4 μ M disuelta en buffer de fosfatos pH 7.4 y diluida 1:500 en el mismo buffer antes de ser usada en esta determinación. También se preparó una curva estándar con Trolox® con concentraciones de 0, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 μ M (Figura 20) y se obtuvo un espectro que muestra el decremento de la fluorescencia con el paso del tiempo (Figura 21), en donde a mayor concentración fue mayor el tiempo de retención de la fluorescencia indicando una mayor capacidad antioxidante o de absorción de radicales del oxígeno. Se depositaron por

triplicado en una placa de 96 pozos 25 μ l de las muestras previamente diluidas 1:600 en buffer de fosfatos pH 7.4, o de las diferentes concentraciones de la curva estándar, o de buffer de fosfatos pH 7.4 para los blancos, y 150 μ l de la solución diluida de trabajo de fluoresceína sódica en todos los pozos. La placa se incubo protegida de la luz a 37° C por 30 min. Se colocó la cantidad suficiente de AAPH en el inyector del lector de microplacas Synergy H4 Hybrid Multi-Mode (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) y se inició la reacción adicionando 25 μ l de APPH en cada pozo para un volumen final de 200 μ l. La fluorescencia fue monitoreada cinéticamente y se tomaron los datos cada minuto durante 120 min. Los resultados fueron reportados como μ M equivalentes de Trolox®.

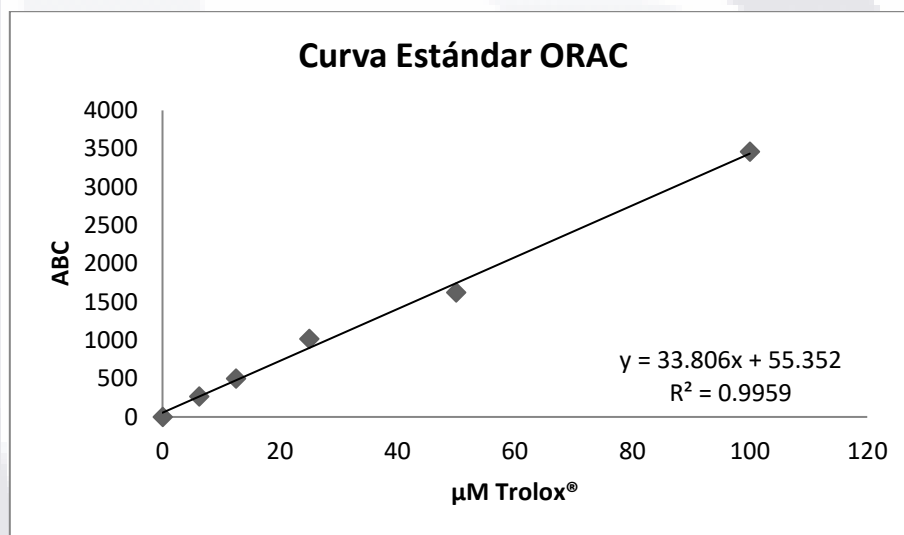


Figura 20. Curva estándar con Trolox® para determinar la Capacidad de Absorción de Radicales del Oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés,) en las muestras de tunas tapona y cardona, mediante la obtención de la ecuación de la recta. Cada muestra se analizó por triplicado y se obtuvo el promedio representado por cada punto del gráfico.

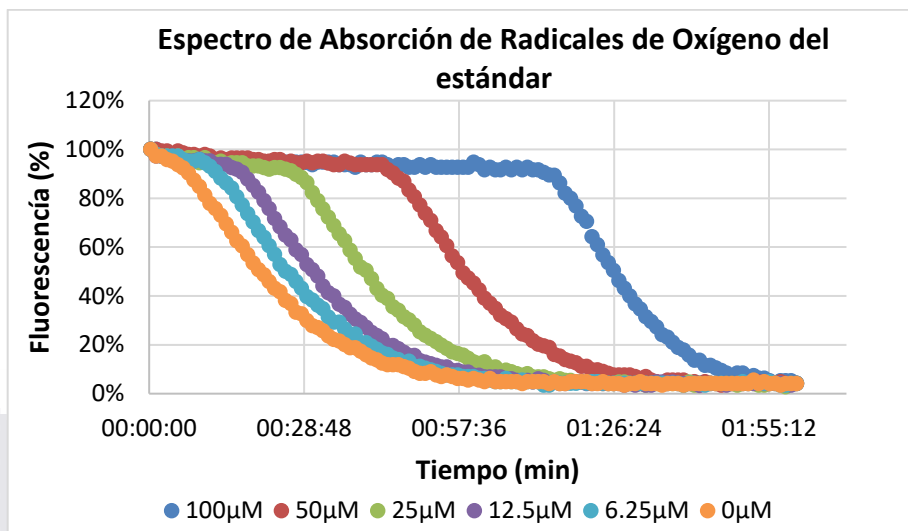


Figura 21. Decaimiento del porcentaje de fluorescencia equivalente a la capacidad de absorción de radicales del oxígeno en las diferentes concentraciones del estándar empleadas para la curva de calibración.

7.4 Ensayo biológico

En el ensayo se incluyeron 84 ratas macho de la cepa albina Wistar obtenidas del bioterio del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Los animales con un peso entre 250-300 gr fueron divididos en 7 grupos de 12 ratas cada uno (8 para las pruebas bioquímicas y 4 para histopatología). Durante el experimento todos los animales fueron mantenidos con agua y alimento *ad libitum* en un cuarto a 25° C con un ciclo de 12 hrs luz/oscuridad. Algunos de ellos fueron tratados profilácticamente con dosis orales de 800 mg/kg de cada extracto o 50 mg/kg de glutatión reducido (GSH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) vía intraperitoneal (i.p.) durante 5 días previos a recibir una dosis tóxica única de 500 mg/kg i.p. de acetaminofén (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los grupos fueron nombrados de la siguiente forma: Grupo control sin ningún tratamiento (G1), grupo control positivo o acetaminofén (APAP) (G2), grupo que recibió profilácticamente Tuna Cardona (G3), grupo que recibió profilácticamente Tuna tapona (G4), grupos que recibieron extractos de Tuna profilácticamente y fueron intoxicados con acetaminofén (G5 y G6), y grupo que recibió GSH previamente a ser intoxicado con APAP (G7). Los animales fueron sacrificados siguiendo las recomendaciones de la NOM-033-ZOO-1995.

7.4.1 Pruebas bioquímicas

Muestras de sangre e hígado fueron colectados después de 4 hrs post-intoxicación para realizar las pruebas bioquímicas de los principales marcadores de lesión celular a nivel hepático y evaluar el efecto de los diferentes tratamientos. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 10 min para obtener el suero y realizar las determinaciones enzimáticas. Para las determinaciones bioquímicas en suero sanguíneo se utilizó un espectrofotómetro Varian UV visible Modelo DMS80.

7.4.1.1 Alanina aminotransferasa (ALT)

La alanina aminotrasferasa (ALT) inicialmente llamada transaminasa glutámico pirúvica (GPT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra ensayada.

La determinación de ALT en suero sanguíneo de los diferentes grupos se realizó conforme a lo descrito en el protocolo dado en el kit del fabricante (SPINREACT, Girona, España). El ensayo espectrofotométrico se realizó con una mezcla de 1 ml de la solución de trabajo y 100 μ l de la muestra de trabajo (suero), incubándose por 1 minuto a temperatura ambiente. El espectrofotómetro se ajustó a cero con agua destilada y las absorbancias se midieron a una longitud de onda de 340 nm al inicio y cada minuto durante 3 minutos. Se promedió el incremento de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$). El cálculo de la concentración de ALT en la muestra se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$U/L \text{ de ALT} = \Delta A/\text{min} \times 1750$$

El fundamento del método, significado clínico, preparación y estabilidad de los reactivos, conservación de la muestra y factores de conversión de temperatura se presentan en la hoja técnica del ensayo (ver anexo A).

7.4.1.2 Aspartato aminotransferasa (AST)

La aspartato aminotransferasa (AST) inicialmente llamada transaminasa glutamato oxaloacética (GOT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra ensayada.

La determinación de ALT en suero sanguíneo de los diferentes grupos se realizó conforme a lo descrito en el protocolo dado en el kit del fabricante (SPINREACT, Girona, España). Para este ensayo se mezclaron 1 ml de la solución de trabajo y 100 μ l de la muestra (suero), incubándose a temperatura ambiente durante 1 minuto y midiendo la absorbancia a 340 nm al inicio y cada minuto durante 3 minutos. El espectrofotómetro se ajustó a cero con agua destilada. Se promedió el incremento de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$) y el cálculo de la concentración de AST en la muestra se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$U/L \text{ de AST} = \Delta A/\text{min} \times 1750$$

El fundamento del método, significado clínico, preparación y estabilidad de los reactivos, conservación de la muestra y factores de conversión de temperatura se presentan en la hoja técnica del ensayo (ver anexo B).

7.4.1.3 Fosfatasa alcalina (FA)

La fosfatasa alcalina (FA) cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato (pNPP) a pH 10,4 liberando p-nitrofenol y fosfato. La velocidad de formación del p-nitrofenol, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en la muestra ensayada.

Para este ensayo se mezclaron 1 ml de la solución de trabajo y 100 μ l de la muestra (suero), incubándose a temperatura ambiente durante 1 minuto y midiendo la absorbancia a 405 nm al inicio y cada minuto durante 3 minutos. El espectrofotómetro se ajustó a cero con agua

destilada. Se promedió el incremento de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$) y el cálculo de la concentración de FA en la muestra se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$U/L \text{ de FA} = \Delta A/\text{min} \times 3300$$

El fundamento del método, significado clínico, preparación y estabilidad de los reactivos, conservación de la muestra y factores de conversión de temperatura se presentan en la hoja técnica del ensayo (ver anexo C).

7.4.1.4 Glutación reducido (GSH)

El método para la cuantificación de glutación reducido en las muestras hepáticas homogenizadas de todos los grupos experimentales fue realizado como lo describen Hissin & Hilf, 1976; utilizando *o*-ftaldehído (OPT) como reactivo fluorescente. Para esta determinación se mezclaron 250 mg de la muestra de tejido hepático, 3.75 ml de buffer de fosfatos pH 8 y 1 ml de ácido metafosfórico al 25%. La mezcla se homogenizó y centrifugó a 5000 rpm por 30 min a 4° C. Después, se mezcló 0.5 ml del sobrenadante con 4.5 ml de buffer de fosfatos pH 8, se tomaron 100 μl de dicha mezcla y se agregaron a otro tubo que contenía 1.8 ml de buffer de fosfatos pH 8, se mezclaron y finalmente se agregó 100 μl de OPT 0.1%. La mezcla se dejó reposar por 15 min y se midió la fluorescencia de las muestras en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer modelo LS 50 B a 420nm con una excitación de 350nm. El cálculo de la concentración de GSH en las muestras se realizó utilizando la siguiente formula:

$$\mu\text{g/g de GSH} = L \text{ de la muestra} \times 2.25$$

dónde:

L: luminiscencia emitida por la muestra

2.25: factor obtenido del estándar

7.4.1.5 Malondialdehído (MDA)

Malondialdehído es un producto de la peroxidación de lípidos causada por el estrés oxidativo generado de la presencia o sobreproducción de radicales libres en las células. La

determinación de MDA se realizó en muestras homogenizadas de tejido hepático de los grupos experimentales como lo describe Kim et al., 20014, con algunas modificaciones. El ensayo consistió en homogenizar 100 mg de tejido hepático en 1 ml de buffer de fosfatos pH 7.4. Posteriormente se mezclaron en tubos plásticos 1.5 ml de ácido fosfórico (H₃PO₄) al 1% en ácido clorhídrico (HCl) 0.1N, 0.5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 6% y 200 µl de la muestra homogenizada. Todos los tubos fueron calentados a ebullición en baño maría durante 45 min. Posteriormente, se dejaron reposar las muestras a temperatura ambiente, se agregaron 2 ml de n-butanol y se agitaron. Las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 10 min. Se preparó el espectrofotómetro a 530nm y fue ajustado a cero con n-butanol como blanco. Se tomó la lectura de las muestras y se realizó el cálculo de la concentración de MDA mediante la siguiente formula:

$$nmoles/100mg \text{ de MDA} = \text{Abs de la muestra} \times 1100$$

en donde:

Abs: *absorbancia de la muestra*

1100: *factor obtenido del estándar*

7.4.2 Expresión génica relativa

Con el fin de observar cambios en la expresión génica de la principal enzima responsable de la producción del radical libre NAPQI por el metabolismo de APAP, y también, en las principales enzimas del sistema de defensa antioxidante, se realizó un análisis cuantitativo mediante la técnica de qPCR. Los resultados obtenidos fueron presentados como veces de inducción respecto del grupo control (fold induction vs control) y representan los valores calculados de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

7.4.2.1 Extracción de mARN

El método de extracción de ARN de las diferentes muestras de tejido hepático obtenido de todos los grupos experimentales fue realizado según los descrito en el protocolo de

extracción de ARN del reactivo TRIzol® de la casa comercial Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) (ver anexo D).

50 mg de tejido hepático de cada rata fueron homogenizados con 1 ml del TRIzol® para posteriormente proceder a la fase de separación y obtención del ARN adicionando 0.2 ml de cloroformo. Las muestras fueron mezcladas vigorosamente y centrifugadas a 12000 g por 15 min a 4° C. Después se removió hacia otro tubo nuevo, libre de ARNasas, la fase acuosa de la muestra para continuar con el aislamiento. El ARN separado fue precipitado con la adición de 0.5 ml de isopropanol al 100%, se incubó la muestra por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente fue centrifugada nuevamente a 10000 g por 10 min a 4° C para formar una pastilla de ARN en el fondo del tubo. El sobrenadante fue removido por decantación y enseguida se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 75% a -20° C. La muestra fue agitada brevemente y después fue centrifugada a 7500 g por 5 min a 4° C. Nuevamente el sobrenadante fue removido del tubo evitando dejar secar por completo la pastilla de ARN. Para finalizar con el aislamiento, la pastilla de ARN se disolvió en 100µl de agua estéril (libre de ARNasas) y almacenada a -80° C hasta su posterior uso.

7.4.2.2 Síntesis de cADN

Se utilizó 1µl de cada una de las muestras de obtenidas de mARN de todos los grupos experimentales para medir su concentración utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Posteriormente se agregó un volumen correspondiente a 2.5 µg de cada muestra de ARN en tubos para PCR de 0.2 ml y se ajustaron a un volumen de 37.25 µl con agua estéril. Se prepararon dos controles negativos, uno con agua (Control Agua) y otro sin la enzima (RT). Se realizó el cálculo de los volúmenes necesarios para la preparación de una mezcla que contiene todos los elementos necesarios para la síntesis de cADN (10x RT buffer (500 mM Tris-HCl (pH 8.3); 500 mM KCl; 30 mM MgCl₂; 50 mM DTT), 10 mM dNTP mix (Sigma DNTP-100A), Random nonamers (0.5 µg/µl) (Sigma R7647), ARNasa out (40 u/µl) (Invitrogen 10777-019) y la enzima M-MLV RT (Sigma M1302)), como se muestra en la siguiente tabla:

	RT-PCR muestra	RT-PCR mezcla
mARN	2.5µg	N=número de muestras + controles
10x RT buffer	5 µl	(N+2)*5
10 mM dNTP mix	5 µl	(N+2)*5
Random nonamers 0.5 µg/µl	1 µl	(N+2)*1
ARNse out 40u/µl	0.75 µl	(N+2)*0.75
M-MLV RT	1 µl	(N+2)*1
ARN + agua	37.25 µl	
Total	50 µl	12.75 µl por muestra

Se realizó la mezcla de los componentes sin la enzima. Se agregaron 12.75 µl de la mezcla (sin la enzima) al control negativo RT. Finalmente se agregó la enzima al resto de la mezcla y se agregaron 12.75 µl a cada uno de los tubos restantes, se taparon, se mezclaron con agitación y se centrifugaron brevemente para colectar nuevamente el contenido en el fondo del tubo. Todos los tubos fueron colocados en un termociclador para PCR Bio-Rad modelo T100™ (Bio-Rad Laboratories Inc., Foster City, CA, USA) y fueron programados los siguientes ciclos de amplificación:

- 25° C por 10 min (alineación de los primers al templado de ARN)
- 30° C por 60 min (transcripción inversa de una cadena de ARN en cADN)
- 95° C por 5 min (desnaturalización de la enzima M-MLV RT)
- 15° C por ∞

El producto de la reacción se almacenó a -20° C hasta su posterior uso.

7.4.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa-cuantitativa (q-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una en biología molecular para amplificar una o varias copias de una pieza de ADN a través de varias órdenes de magnitud, generando miles o millones de copias de una secuencia específica de ADN.

Una vez obtenido el cADN de cada muestra de interés, éste fue diluido 1:20 con agua estéril. Posteriormente, se preparó una mezcla de reacción para RT-qPCR que contenía: buffer de reacción 2x (dNTPs, ADN polimerasa HotGoldStar, MgCl₂ (5mM), estabilizadores y referencia pasiva ROX) (Eurogentec, Seraing, Bélgica), sonda fluorogénica (5µM) (Eurogentec, Seraing, Bélgica), primers (sentido y antisentido) (50µM)

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), agua estéril. Las sondas fluorogénicas y los oligonucleótidos utilizados para realizar este análisis se encuentra en el Anexo E.

El esquema de trabajo se realizó siguiendo lo indicado en la siguiente tabla:

	Volumen de reacción por muestra (µl)
cADN (muestra)	4
Sonda fluorogénica	0.8
Primer (sentido)	0.36
Primer (antisentido)	0.36
Buffer de reacción 2x	10
Agua estéril	4.8
Volumen total	20
Volumen de la mezcla de reacción por pozo	16

Se agregaron 4 µl de cada una de las muestras de cADN por duplicado en una placa de 96 pozos para después ser complementadas con 16 µl de la mezcla de reacción previamente realizada haciendo un volumen final de 20 µl. La placa de 96 pozos fue cubierta con un adhesivo óptico y fijada por compresión. La placa se centrifugo para precipitar el contenido al fondo del pozo. El análisis de qPCR en tiempo real se realizó en un equipo 7900 HT Fast Real time PCR System de Applied biosystems (Foster City, CA, USA). Se obtuvieron los valores C_t de cada muestra de interés para cada gen estudiado. Los valores obtenidos de las mismas muestras fueron normalizados usando como gen constitutivo endógeno como 18S (ARN ribosomal 18S). El método comparativo C_t también es conocido como método $2^{-[\Delta\Delta C_t]}$:

$$[\Delta\Delta C_t] = [\Delta C_t] \text{ muestra} - [\Delta C_t] \text{ referencia}$$

en donde:

$[\Delta C_t] \text{ muestra}$ es el valor de cualquier muestra normalizada con el gen constitutivo endógeno y,

$[\Delta C_t] \text{ referencia}$ es el valor de las muestras control también normalizadas con el gen constitutivo endógeno.

Los resultados fueron reportados como veces de inducción del valor $2^{-[\Delta\Delta C_t]}$ obtenido de las muestras de interés con respecto a los valores obtenidos de las muestras control.

7.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los datos obtenidos se realizó mediante el software GraphPad Prism 5.

Se utilizó la prueba T-student para la comparación de los valores promedio obtenidos en la caracterización de los principales compuestos bioactivos, así como de la actividad antioxidante de las dos especies de tuna con un nivel de confianza del 99%.

Para los resultados obtenidos de las pruebas diferentes pruebas bioquímicas, así como de expresión génica se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y se compararon los promedios de los diferentes grupos experimentales con una prueba de múltiple comparación de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

7.6 Histopatología

Después de 24 hrs de la intoxicación con acetaminofén los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico y perfundidos con una solución de lavado que contenía cloruro de sodio al 0.9%, heparina al 0.5% y procaina al 0.1%. El tejido hepático de los animales de todos los grupos experimentales fue fijado *in situ* con formalina neutra (10%), posteriormente los tejidos fueron deshidratados en un procesador de tejidos (histoquinete) Leica modelo TP1020 y se formaron bloques del tejido embebido en parafina para realizar cortes de 5 μm de grosor en un micrótomos Leica modelo RM2125RT. Los tejidos fueron desparafinizados, hidratados y recuperados en portaobjetos para su posterior tinción.

7.6.1 Ácido peryódico de Schiff (PAS)

Las laminillas con el tejido hepático recuperado de los animales de los diferentes grupos experimentales fueron teñidas con ácido peryódico de Schiff (PAS) (Sigma 395B) para observar la morfología estructural de los hepatocitos y la presencia de glucógeno citoplasmático siguiendo la metodología descrita en el inserto de la casa comercial (Anexo F). Las imágenes de las laminillas fueron capturadas en un microscopio Carl Zeiss modelo Axioscope 40 y procesadas con el software Image-Pro Plus.

8 RESULTADOS

8.1 Cuantificación de compuestos bioactivos

8.1.1 Flavonoides

Como se observa en la figura 22, se demostró que el extracto obtenido del fruto de *Opuntia robusta* Wendland posee mayor concentración de pigmentos del tipo flavonoide hasta más de tres veces por encima de lo obtenido para el extracto del fruto de *Opuntia streptacantha* Lemaire (89.19 ± 2.84 y 54.48 ± 0.93 $\mu\text{g eq. quercetina/ml}$, respectivamente). Esto sugiere que la tuna tapona tiene mayor capacidad antioxidante que la tuna cardona y, por consecuencia, mejor efecto hepatoprotector en la intoxicación con acetaminofén producida en los animales de estudio.

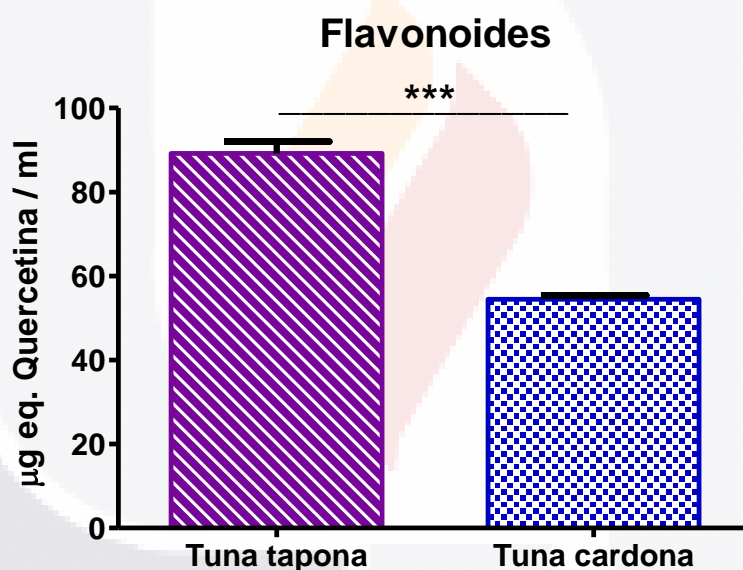


Figura 22. Contenido total de compuestos flavonoides presentes en la tuna tapona y tuna cardona. Las barras representan el valor promedio de tres mediciones realizadas para cada especie y su desviación estándar. *** $p < 0.0001$.

8.1.2 Betalainas

En las dos especies de tuna que se analizaron en este trabajo, las betacianinas que brindan una coloración rojo-violácea, fueron más abundantes que las betaxantinas con 333 ± 11.46 mg eq. Betacianinas/L y 134 ± 4.83 mg eq. Betaxantinas/L para la tuna tapona; y con 87.23

± 1.54 mg eq. Betacianinas/L y 36.46 ± 1.06 mg eq. Betaxantinas/L para la tuna cardona. Particularmente, la especie tuna tapona (*Opuntia robusta* Wendland) fue la que presentó mayor concentración de betalaínas totales respecto de la tuna cardona (*Opuntia streptacantha* Lemaire) con 467 ± 16.29 y 124 ± 2.60 mg eq. Betalaínas totales/L respectivamente (Figura 23).

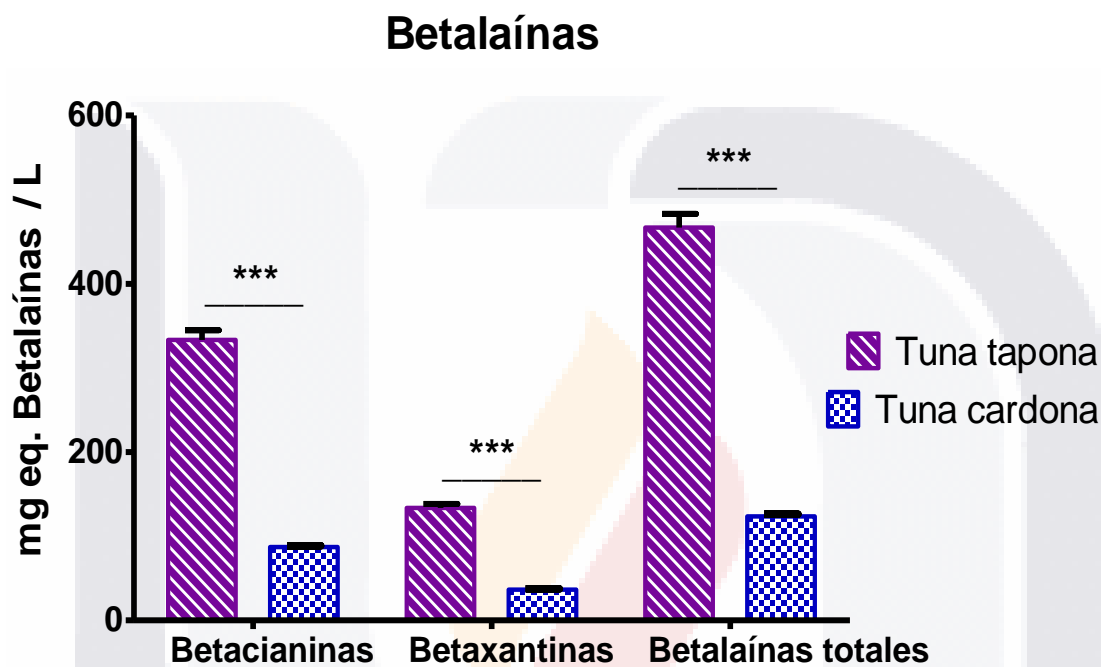


Figura 23. Contenido de pigmentos betalaínicos (betacianinas, betaxantinas y total) en las muestras de tuna analizadas en el presente estudio. Las barras indican la media de cada muestra analizada por triplicado con su respectiva desviación estándar. *** $p < 0.0001$.

8.1.3 Ácido ascórbico

Los resultados obtenidos para la tuna tapona fueron de 329 ± 28.46 mg eq. ácido ascórbico/L de extracto, mientras que para la tuna cardona los valores fueron de 65.86 ± 12.33 mg eq. ácido ascórbico/L de extracto. Estos valores son el promedio de tres mediciones para cada especie de tuna (Figura 24).

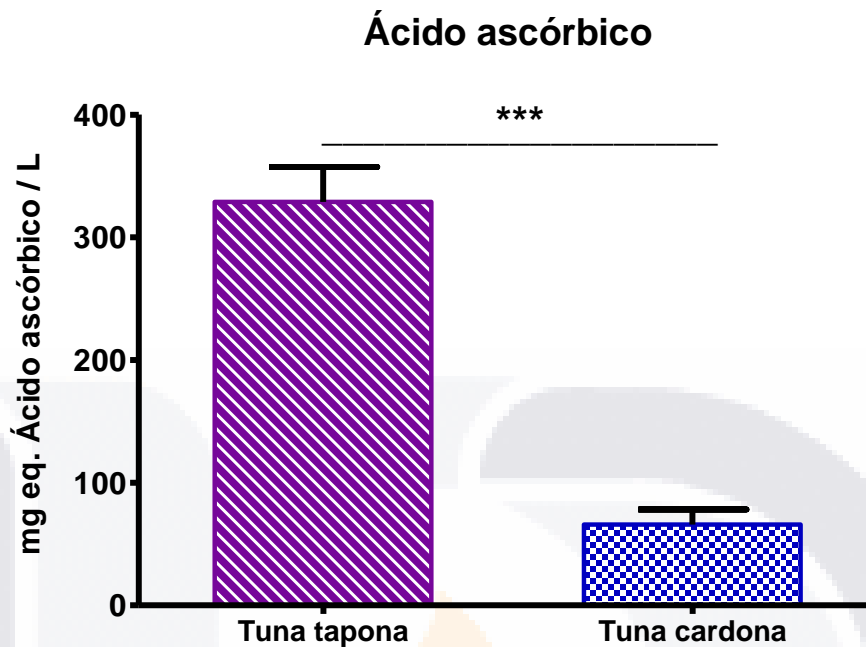


Figura 24. Contenido de ácido ascórbico presente en las muestras analizadas de tuna tapona y tuna cardona. Cada barra representa el valor promedio obtenido de tres mediciones para cada especie de tuna con su respectiva desviación estándar. *** $p < 0.0001$.

8.1.4 Compuestos fenólicos totales

Después de medir la absorbancia por triplicado en ambas especies de tuna (tapona y cardona), los resultados obtenidos demostraron que los extractos del fruto de *Opuntia robusta* Wendland tienen mayor cantidad de compuestos fenólicos totales (573.72 ± 24.99 mg eq. ácido gálico/L) que los extractos del fruto de *Opuntia streptacantha* Lemaire (343.12 ± 9.72 mg eq. ácido gálico/L), como se observa en la figura 25. Por tanto, en base a los resultados de varios proyectos de investigación que muestran que a mayor contenido total de compuestos fenólicos mayor efecto antioxidante, en el presente trabajo se espera que los extractos de tuna tapona sean más efectivos que los de tuna cardona para contrarrestar el estrés oxidativo celular hepático inducido con una sobredosis de acetaminofén en ratas.

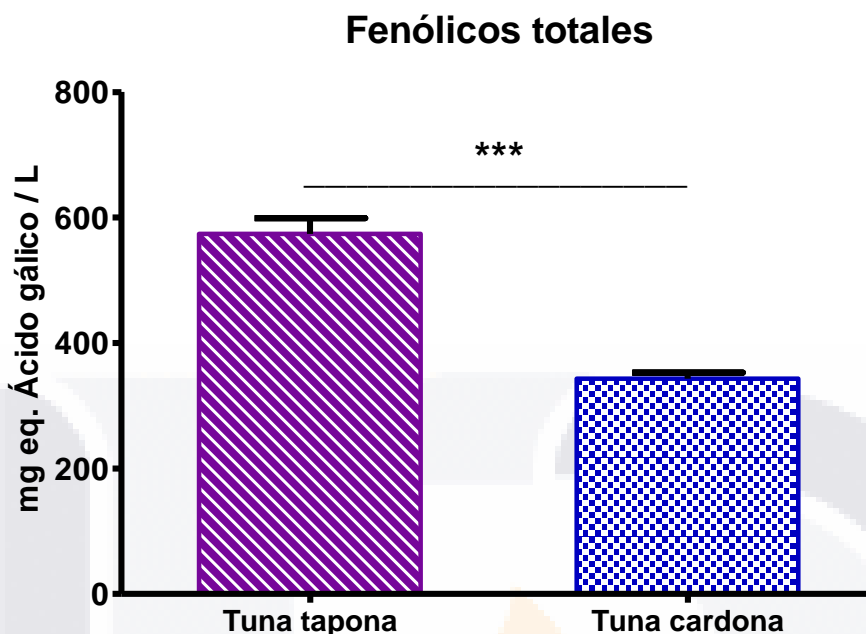


Figura 25. Compuestos fenólicos totales presentes en los extractos de tuna tapona y tuna cardona. Cada barra representa el valor promedio de tres mediciones con su desviación estándar. *** p<0.0001.

8.2 Capacidad antioxidante de los extractos

8.2.1 Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)

Para comprobar los resultados obtenidos en las determinaciones de los principales compuestos bioactivos de las dos especies de tuna (tapona y cardona), en donde siempre se encontró mayor contenido de estos compuestos en los extractos de frutos de *Opuntia robusta* Wendland respecto a los extractos de frutos de *Opuntia streptacantha* Lemaire, se realizaron diferentes pruebas cuantitativas para determinar la capacidad antioxidante de las sustancias bioactivas presentes en dichos extractos.

En la primera prueba se utilizó el método ABTS, donde el valor promedio obtenido de tres mediciones del extracto liofilizado de tuna tapona fue de 92.62 ± 5.53 mg eq. ácido ascórbico/100 ml de extracto, y de 61.69 ± 3.07 mg eq. ácido ascórbico/100 ml para la tuna cardona (Figura 26). Con esto se comprobó la mayor actividad de la tuna tapona para neutralizar o estabilizar radicales libres respecto de la tuna cardona.

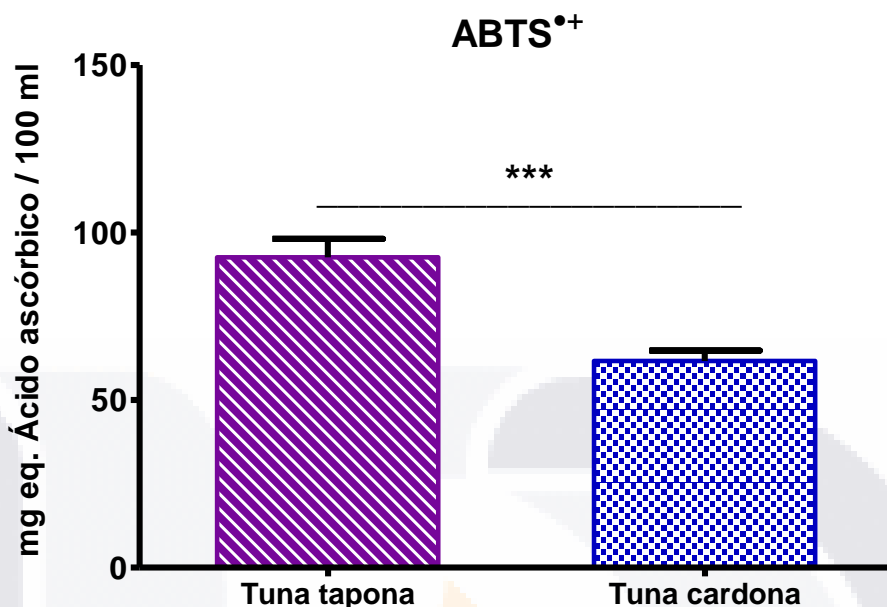


Figura 26. Capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico de los extractos de tuna tapona y tuna cardona por el método ABTS^{•+}. Las barras representan el promedio de tres muestras analizadas para cada tuna y su desviación estándar. *** p<0.0001.

8.2.2 Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)

Otro método cuantitativo usado para determinar la capacidad antioxidante de las muestras liofilizadas de las dos especies de tuna (tapona y cardona) fue el Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP, por sus siglas en inglés). El principio de la reacción se basa en la reducción del hierro férrico (Fe⁺³) a la forma ferrosa (Fe⁺²) en medio ácido. La capacidad para reducir al hierro es considerada un índice del poder antioxidante de las muestras.

El resultado obtenido mediante este método para la tuna tapona fue de 73.24 ± 2.96 mg eq. ácido ascórbico / 100 ml de extracto, mientras que para la tuna cardona fue de 28.85 ± 1.95 mg eq. ácido ascórbico / 100 ml de extracto (Figura 27). Estos resultados confirman nuevamente la superioridad del extracto del fruto de *Opuntia robusta* Wendland para reducir y neutralizar compuestos altamente reactivos respecto del fruto de *Opuntia streptacantha* Lemaire.

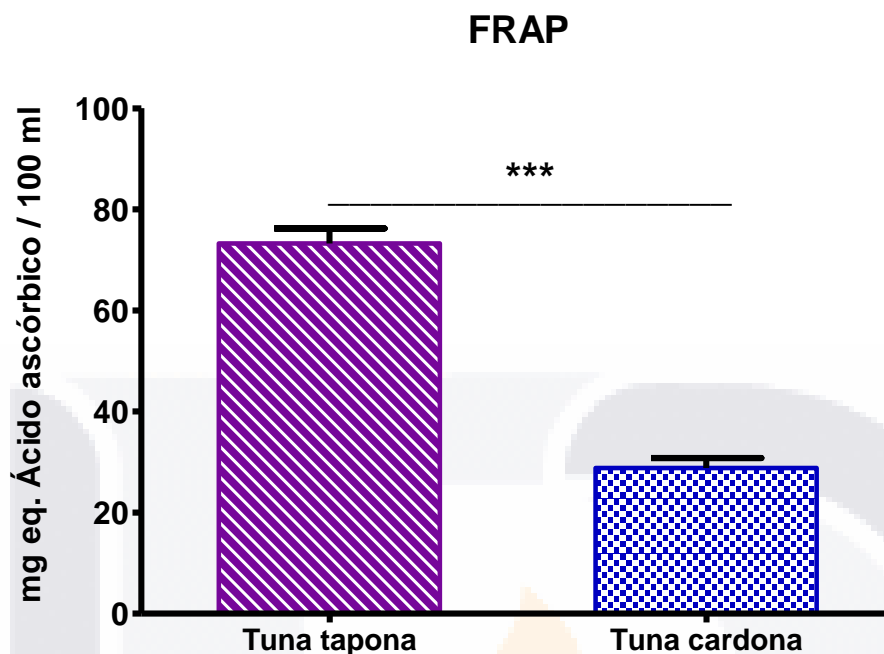


Figura 27. Capacidad antioxidante de las tunas tapona y cardona medida por el método FRAP (Poder Antioxidante de Reducción Férrica). Las barras representan el valor promedio de tres mediciones para cada tuna y su desviación estándar. *** $p < 0.0001$.

8.2.3 Método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Otra metodología validada, y una de las más empleadas para determinar la capacidad antioxidante de productos naturales o suplementos alimenticios, fue el ensayo colorimétrico para cuantificar la capacidad de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) en un medio orgánico. El fundamento de este método desarrollado por Brand-Williams et al (1995) consiste en que el radical DPPH• tiene un electrón desapareado y presenta una coloración violeta; al entrar en contacto con un agente reductor se genera la forma reducida del radical DPPH•, con la consecuente pérdida del color violeta hasta un amarillo pálido y, por ende, la disminución en la absorbancia, siendo este decremento proporcional a la actividad antioxidante de la muestra.

Los resultados obtenidos con este ensayo fueron claros: el extracto de frutos de la tuna tapona tuvo obtuvo la mayor actividad antioxidante ya que se identificaron niveles de 5770

$\pm 337 \mu\text{mol eq. Trolox}^\circ/\text{L}$, mientras que para la tuna cardona se obtuvo un promedio de $1313 \pm 94 \mu\text{mol eq. Trolox}^\circ/\text{L}$ (Figura 28).

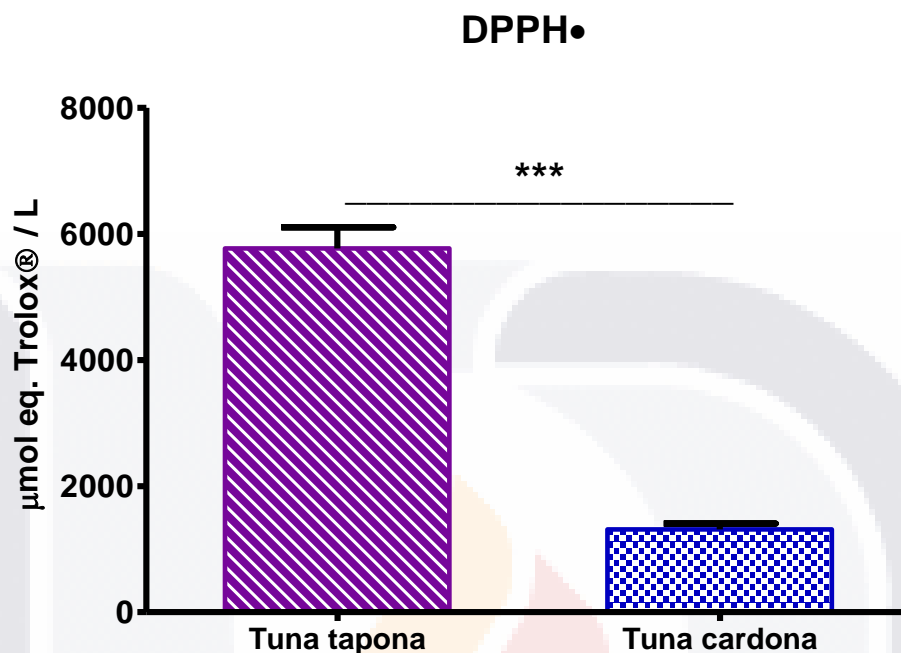


Figura 28. Valores de la tuna tapona y tuna cardona equivalentes a la capacidad antioxidante del Trolox[®] por el método DPPH[•]. Cada barra representa el promedio de tres mediciones \pm desviación estándar. *** $p < 0.0001$.

8.2.4 Actividad quelante

Para determinar la capacidad quelante de los extractos de los frutos de tunas tapona y cardona se utilizó un método colorimétrico basado en la reacción del agente quelante de referencia o la muestra en cuestión con el ion ferroso (Fe^{+2}). Posteriormente, el ion ferroso que no fue quelado o atrapado reacciona con la ferrozina generando un color, el cual se mide espectrofotométricamente para determinar la capacidad de quelación.

Los resultados obtenidos para la capacidad de quelación de los extractos de tuna tapona (*Opuntia robusta* Wendland) y tuna cardona (*Opuntia streptacantha* Lemaire) fueron de $3.6 \times 10^{-3} \pm 9 \times 10^{-4}$ y de $6 \times 10^{-3} \pm 7.8 \times 10^{-4}$ mol eq. EDTA/L de extracto, respectivamente (Figura 29).

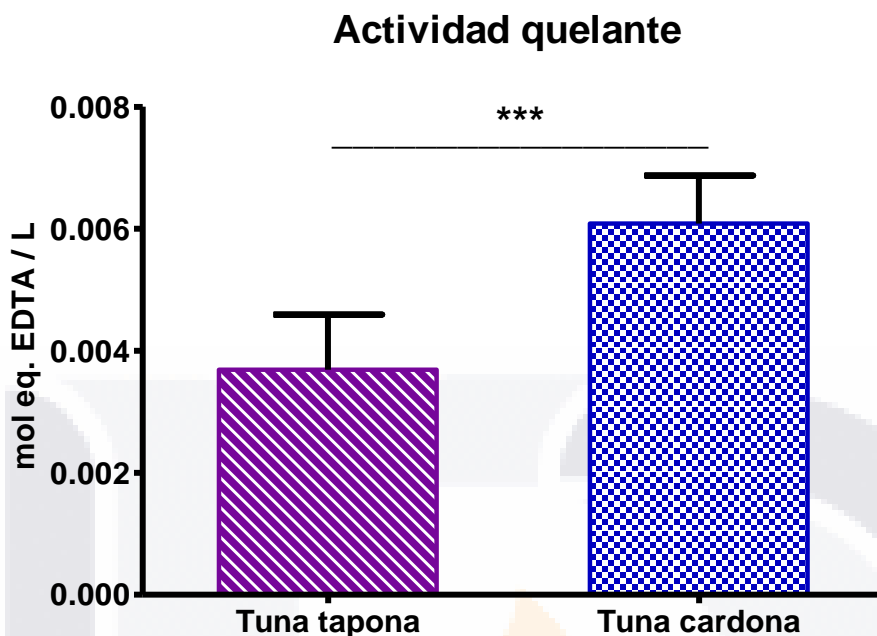


Figura 29. Capacidad quelante de la tuna tapona y tuna cardona equivalente a mol de EDTA / L. Cada barra representa el valor promedio de tres mediciones \pm desviación estándar. *** p=0.0006.

8.2.5 Capacidad de Absorción de Radicales del Oxígeno (ORAC)

También se realizó un ensayo fluorométrico para determinar la Capacidad de Absorción de Radicales del Oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés). ORAC es un método analítico para determinar el potencial antioxidante de una amplia gama de sustancias o compuestos que se encuentran en productos nutraceuticos, farmaceuticos y en los alimentos. Este método emplea fluoresceína como marcador para monitorear la actividad antioxidante de los compuestos al entrar en contacto con un generador de radicales peroxilo como lo es el APPH (2,2'-azobis-2-metil propionamidina dicloruro).

Una vez que se pusieron en contacto los extractos de frutos de las dos especies de tuna con el AAPH se obtuvo el espectro (Figura 30) que indica la capacidad antioxidante de las muestras y se calculó el área bajo la curva del mismo, para determinar la concentración en μM equivalentes a Trolox® presentes en los extractos de *Opuntia robusta* Wendland y *Opuntia streptacantha* Lemaire. Los resultados obtenidos indican una mayor capacidad

antioxidante del extracto de tuna tapona con $41784 \pm 1891 \mu\text{M eq. Trolox}^\circledR$ respecto de la tuna cardona en la que se obtuvieron $31426 \pm 437 \mu\text{M eq. Trolox}^\circledR$ (Figura 31).

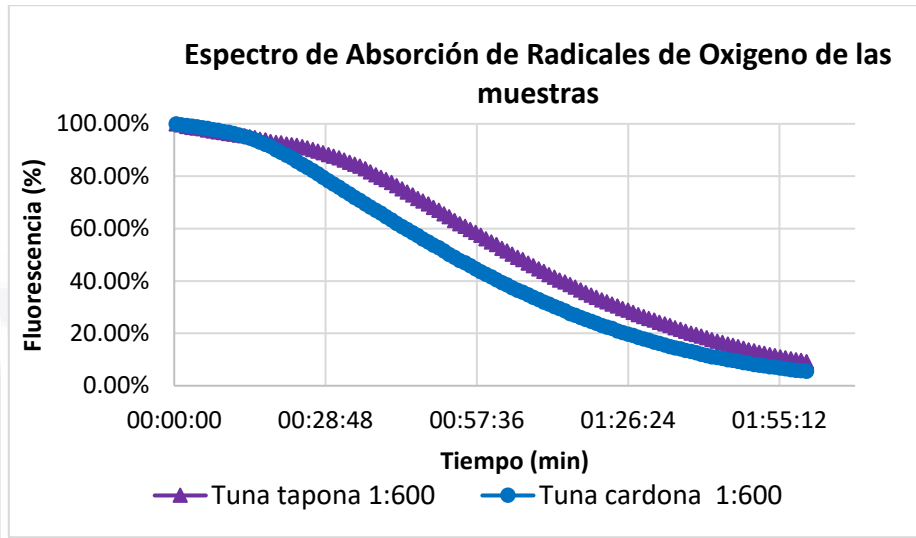


Figura 30. Capacidad de absorción de radicales del oxígeno de la tuna tapona (azul) y tuna cardona (rojo) diluidas 1:600 del extracto original, lo que indica una fuerte capacidad antioxidante para ambas especies. Dicha capacidad se determinó por la técnica fluorométrica ORAC.

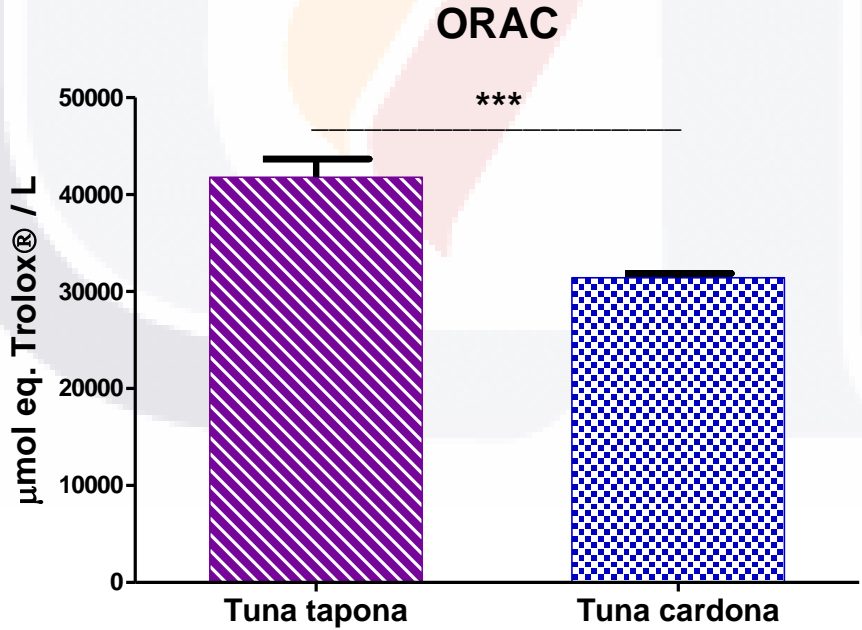


Figura 31. Gráfico que indica la cantidad en μM equivalente a Trolox[®] del extracto de tuna tapona y tuna cardona obtenidos mediante la técnica fluorométrica ORAC. Existe mayor concentración de antioxidantes totales en el extracto de tuna tapona respecto del extracto de tuna cardona. *** $p < 0.0001$.

En la Tabla 3 se muestran de manera resumida los valores obtenidos de los principales compuestos bioactivos presentes en los extractos de tuna que fueron analizados. De igual manera, en la Tabla 4 se presentan los resultados de los diferentes ensayos realizados para determinar la capacidad antioxidante de las muestras de frutos de tuna taponada y tuna cardona.

Tabla 3. Cantidad obtenida en las determinaciones espectrofotométricas de los principales compuestos antioxidantes presentes en las dos especies de tuna. El análisis estadístico muestra diferencias significativas entre ambas muestras en todos los ensayos realizados.

	Flavonoides (µg eq. quercetina/ml)	Betalainas totales (mg eq. betalainas/L)	Fenólicos totales (mg eq. ácido gálico/L)	Ácido Ascórbico (mg eq. ácido ascórbico/L)
Tuna taponada	89.19 ± 2.84*	466.93 ± 16.29*	573.73 ± 24.99*	328.83 ± 28.46*
Tuna cardona	54.48 ± 0.93	123.7 ± 2.60	343.12 ± 9.72	65.86 ± 12.33

Los valores son el promedio de tres mediciones para cada especie de tuna ± desviación estándar.

* $p < 0.0001$ con respecto a los valores de tuna cardona.

Tabla 4. Determinación cuantitativa de la capacidad antioxidante de las dos especies de tuna analizadas mediante diferentes metodologías. Se obtuvieron valores estadísticamente diferentes entre ambas especies de tuna en todos los ensayos.

	ABTS (mg eq. ácido ascórbico / 100 ml)	FRAP (mg eq. ácido ascórbico / 100 ml)	DPPH (µmol eq. Trolox®/L)	Actividad Quelante (mol eq. EDTA/L)	ORAC (µM eq. Trolox®)
Tuna taponada	92.63 ± 5.53*	73.24 ± 2.96*	5770.12 ± 337.09*	0.0037 ± 9x10 ⁻⁴	41784 ± 1891*
Tuna cardona	61.69 ± 3.07	28.83 ± 1.95	1313.46 ± 94.01	0.006 ± 7.8x10 ^{-4#}	31426 ± 437

Los valores son el promedio de tres mediciones para cada especie de tuna ± desviación estándar.

* $p < 0.0001$ con respecto a los valores de tuna cardona.

$p = 0.0006$ con respecto a los valores de tuna taponada.

8.3 Estandarización del modelo de intoxicación con acetaminofén (APAP)

La dosis tóxica más baja de acetaminofén reportada en ratas Wistar machos es de 500 mg/kg, vía intraperitoneal (Vendemiale et al., 1996). Se ha demostrado que a dicha dosis los valores de enzimas hepáticas y algunos marcadores de estrés oxidativo celular son alterados significativamente dentro de las primeras 4-6 horas. Por ello, se realizó un experimento utilizando esta dosis y se evaluaron marcadores bioquímicos de daño hepático como alanina aminotransferasa (ALT), enzima localizada principalmente en el tejido hepático y que el incremento de sus valores en sangre indican un cambio en la permeabilidad de las membranas de los hepatocitos y necrosis celular; glutatión reducido (GSH), principal antioxidante endógeno no enzimático, la disminución de su concentración indica la presencia de agentes oxidantes causantes de estrés oxidativo celular; y el malondialdehído (MDA) que es el producto de la degradación de los fosfolípidos de las membranas celulares a causa de su oxidación con radicales libres (lipoperoxidación).

Los resultados obtenidos de los niveles de ALT en suero sanguíneo de los diferentes grupos fueron significativamente diferentes respecto del grupo control ($29.57 \text{ U/L} \pm 3.11 \text{ EEM}$), ya que para el grupo con 4 horas de intoxicación (APAP 4h) se obtuvieron valores de $59.36 \text{ U/L} \pm 2.44$, para el grupo con 5 horas de intoxicación (APAP 5h) de $66.36 \text{ U/L} \pm 9.80$ y para el grupo con 6 horas de intoxicación (APAP 6h) de $62.11 \text{ U/L} \pm 7.88 \text{ EEM}$, como se muestra en la Figura 32.

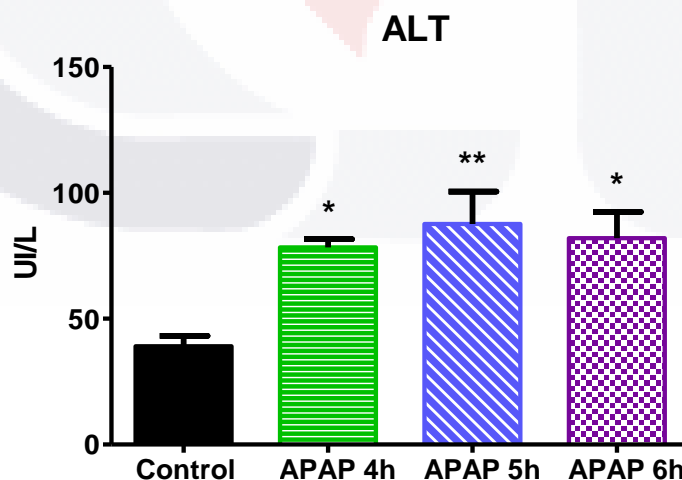


Figura 32. Valores en suero sanguíneo de ALT (alanina aminotransferasa) de ratas Wistar machos. Se observan incrementos estadísticamente significativos para los grupos APAP con 4h de intoxicación, APAP 5h

de intoxicación y APAP 6h de intoxicación respecto del grupo control. Cada valor representa el promedio de 4 muestras \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Además, los niveles de GSH en el tejido hepático disminuyeron considerablemente por efecto del estrés oxidativo generado del metabolismo de acetaminofén, mediado por oxidasas del citocromo P-450. Se obtuvieron valores para el grupo control de 1337 μg de GSH/g de tejido \pm 65.67 EEM, mientras que todos los grupos intoxicados presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo control: 550 \pm 33.50 para el grupo APAP 4h, 532 \pm 26.65 para el grupo APAP 5h, y de 832 \pm 47.73 μg de GSH/g \pm EEM (Figura 33).

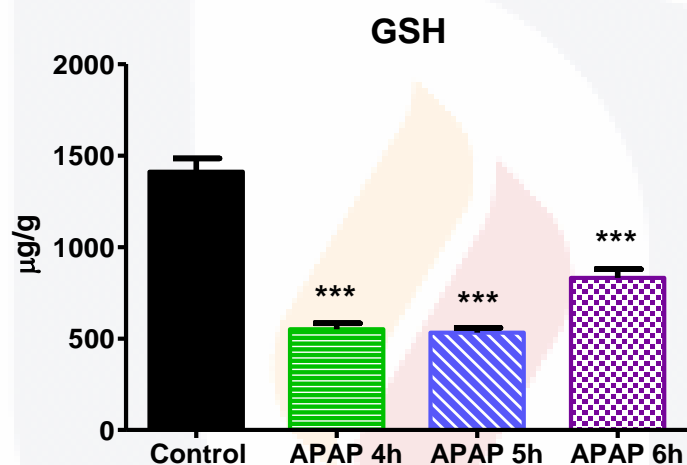


Figura 33. Concentraciones de GSH (glutación reducido) en homogenizados hepáticos de ratas Wistar machos, a diferentes tiempos post-intoxicación con acetaminofén (APAP). Se observan diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos intoxicados con respecto del grupo control. Cada valor representa el promedio de 4 muestras \pm error estándar de la media. *** $p < 0.0001$.

Respecto a la cuantificación de MDA en el tejido hepático, la Figura 34 muestra que a las 4 horas post-intoxicación con APAP hubo un incremento significativo en los niveles de MDA (62.94 nmoles/100mg \pm 4.05 EEM) respecto del grupo control (46.77 nmoles/100mg \pm 3.22 EEM), sin embargo, no se presentaron cambios significativos a las 5 o 6 horas (53.41 \pm 2.03; 49.08 \pm 3.22 nmoles/100mg \pm EEM, respectivamente).

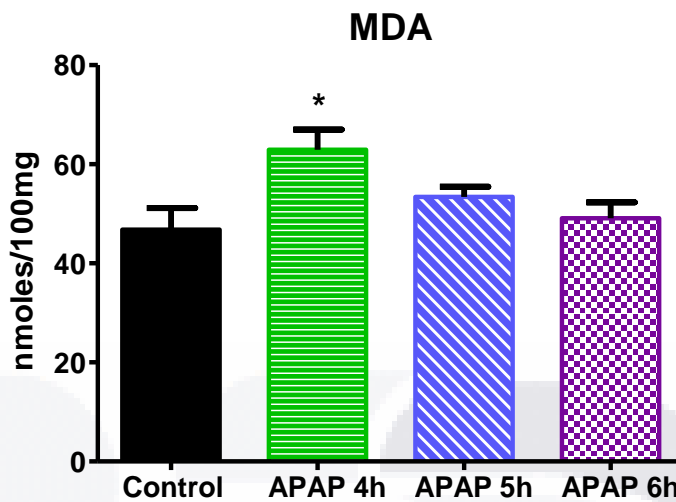


Figura 34. Concentraciones de malondialdehído (MDA) en homogenizados de tejido hepático de ratas Wistar machos a diferentes tiempos post-intoxicación con APAP. Se observó diferencia estadísticamente significativa después de 4h de intoxicación. Cada valor representa el promedio de 4 muestras \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$.

8.4 Ensayo biológico

8.4.1 Determinación de los marcadores bioquímicos de daño hepático

Como se indicó en el diseño experimental, la caracterización bioquímica para determinar la actividad antioxidante y hepatoprotectora de los dos extractos de tuna analizados en esta investigación, modelo *in vivo* de hepatotoxicidad por APAP, se basó en la cuantificación de varios marcadores enzimáticos y no enzimáticos de daño hepático, como: alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FA), glutatión reducido (GSH) y malondialdehído (MDA).

8.4.1.1 Alanina aminotransferasa (ALT)

Con relación a los valores de ALT en el suero sanguíneo del grupo control ($37.96 \text{ U/L} \pm 0.66 \text{ EEM}$): a) los animales intoxicados con APAP presentaron un aumento significativo ($82.44 \text{ U/L} \pm 8.82 \text{ EEM}$), b) los grupos tratados solamente con los extractos de tuna tapona y cardona no presentaron aumentos significativos de ALT (37.33 ± 3.83 y $39.9 \pm 3.31 \text{ U/L} \pm \text{EEM}$, respectivamente), lo que implica que el consumo de estos frutos no altera la

función hepática y c) el grupo tratado profilácticamente con GSH + APAP mostró un incremento significativo ($69.77 \text{ U/L} \pm 5.51 \text{ EEM}$). Los resultados más relevantes fueron los valores séricos de ALT de los grupos tratados profilácticamente con tuna tapona ($41.95 \text{ U/L} \pm 3.32 \text{ EEM}$) y tuna cardona ($58.14 \text{ U/L} \pm 6.10 \text{ EEM}$) previos a la intoxicación con APAP, ya que los extractos de las tunas mantuvieron niveles de ALT significativamente bajos respecto del grupo intoxicado con APAP, sugiriendo un posible efecto hepatoprotector por parte de dichos frutos. Sin embargo, este efecto no fue observado en el grupo GSH + APAP (Figura 35).

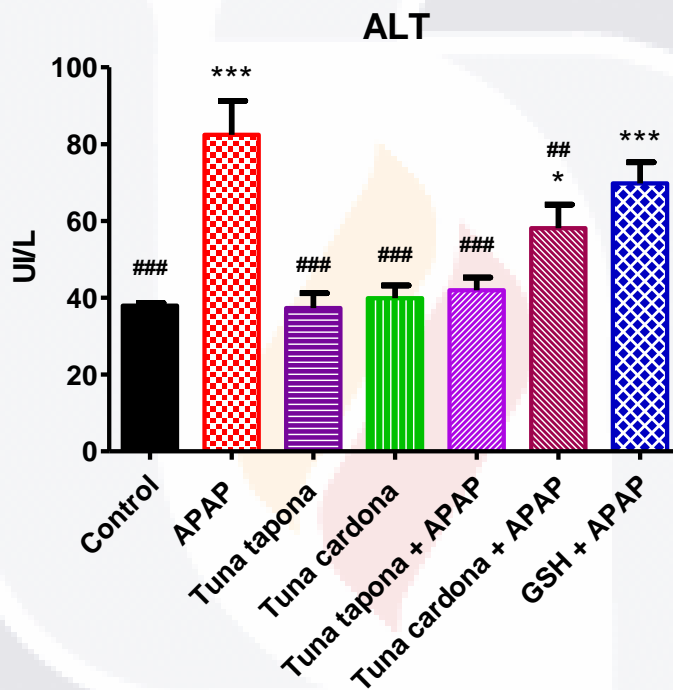


Figura 35. Valores séricos de alanina aminotransferasa (ALT) en los grupos estudiados. Con relación al control, el valor medio del grupo APAP aumentó significativamente, pero los extractos de tunas no produjeron cambios en los valores de esta enzima. Respecto al grupo APAP, los animales tratados con tuna + APAP tuvieron valores significativamente menores, aunque este efecto no se observó en el grupo GSH + APAP. Cada barra representa el promedio de 6 muestras \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ con respecto al grupo control; ## $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ con respecto al grupo APAP.

8.4.1.2 Aspartato aminotransferasa (AST)

En la determinación sérica de la enzima AST se observó el mismo patrón de comportamiento que el de ALT para todos los grupos experimentales. Respecto del valor

medio del grupo control ($79.48 \text{ U/L} \pm 4.25 \text{ EEM}$): a) la actividad sérica de AST aumentó significativamente en el grupo intoxicado con APAP ($319.76 \text{ U/L} \pm 48.03 \text{ EEM}$) y b) los extractos de las tunas taponada y cardona no modificaron la actividad de esta enzima ($75.22 \text{ U/L} \pm 2.76$ y $84.5 \text{ U/L} \pm 5.83 \text{ EEM}$, respectivamente). Sin embargo, con relación al valor medio del grupo APAP, el tratamiento profiláctico con los extractos de tuna taponada y tuna cardona, previo a la intoxicación con APAP, disminuyó significativamente los valores de AST (129 ± 10.35 y $151 \pm 33.33 \text{ U/L} \pm \text{EEM}$, respectivamente). Este efecto no fue observado en los animales tratados profilácticamente con GSH, previo a la intoxicación con APAP ($289 \text{ U/L} \pm 42.17 \text{ EEM}$), ya que no se redujo la liberación de la AST al torrente sanguíneo (Figura 36).

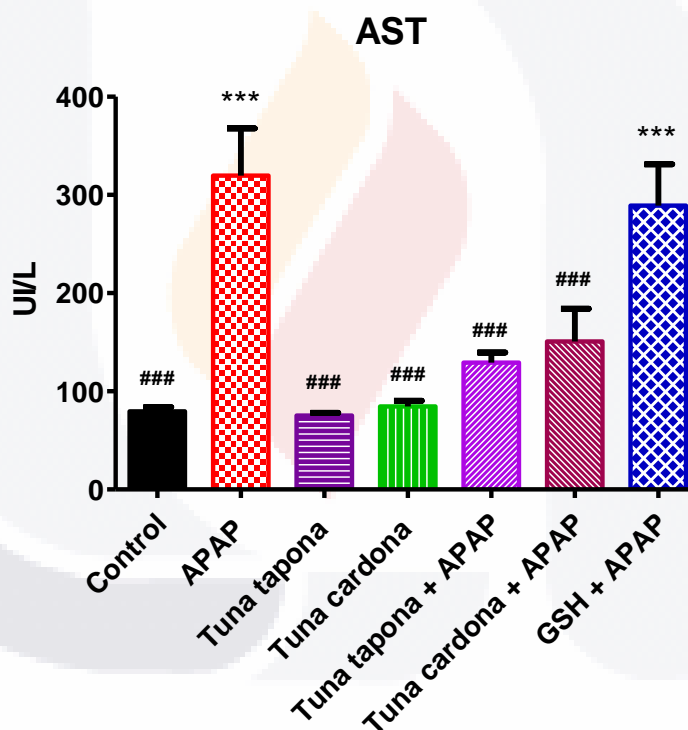


Figura 36. Valores séricos de la aspartato aminotransferasa (AST) en los grupos estudiados. Respecto al grupo control, el valor medio del grupo APAP aumentó significativamente, sin embargo, los extractos de las tunas no modificaron los valores de esta enzima. Con relación al grupo APAP, los valores de AST disminuyeron de manera significativa en los grupos tratados con los extractos de tunas + APAP; este efecto no se observó en el grupo GSH + APAP. Cada barra representa el promedio de 6 muestras \pm error estándar de la media. *** $p < 0.001$ con respecto al grupo control; ### $p < 0.001$ con respecto al grupo APAP.

8.4.1.3 Fosfatasa alcalina (FA)

Aunque su función no es del todo conocida, la Fosfatasa alcalina (FA) es una enzima que aumenta sus valores séricos hasta diez veces respecto del valor normal en procesos patológicos hepáticos, dependiendo de la magnitud del daño sobre la capacidad excretora del hígado.

En este contexto, respecto al valor medio del grupo control ($319 \text{ U/L} \pm 15.4 \text{ EEM}$), la actividad sérica de la FA presentó el siguiente comportamiento: a) sus niveles aumentaron significativamente en el grupo intoxicado con APAP ($512 \text{ U/L} \pm 36.65 \text{ EEM}$) y b) los grupos tratados con tuna tapona ($285 \text{ U/L} \pm 36.21$) y tuna cardona ($251 \text{ U/L} \pm 35.17$) no presentaron cambios significativos. Además, el tratamiento profiláctico con el extracto de tuna tapona y con GSH tuvo la capacidad de revertir el daño hepático producido por acetaminofén, ya que con relación al valor medio del grupo APAP, los niveles séricos de FA disminuyeron de manera significativa en los grupos tuna tapona + APAP ($246 \text{ U/L} \pm 11.18$) y GSH + APAP ($309 \text{ U/L} \pm 15.45$); sin embargo, este fenómeno no se observó en el grupo tuna cardona + APAP ($459 \text{ U/L} \pm 28.59 \text{ EEM}$) (Figura 37).

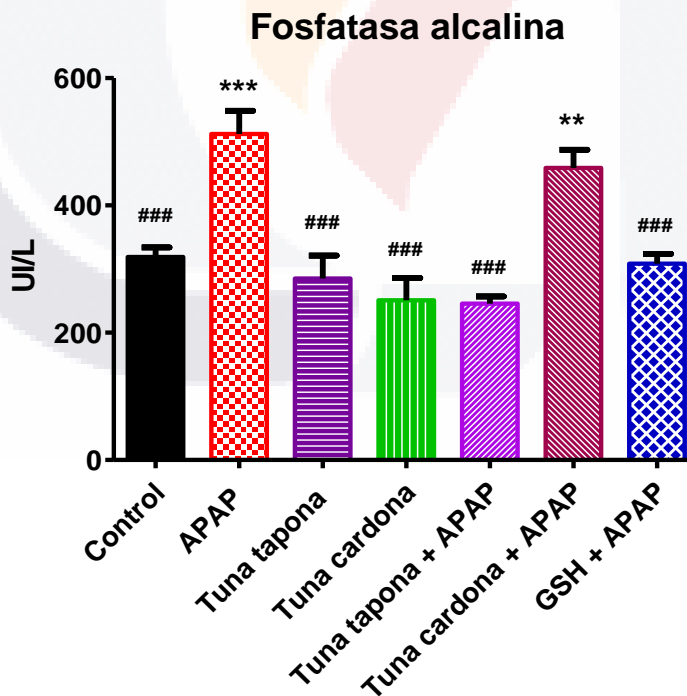


Figura 37. Valores séricos de FA en los grupos de ratas estudiados. Los niveles de FA aumentaron

significativamente en el grupo APAP respecto del grupo control. Los extractos de tuna no indujeron cambios en los niveles de esta enzima. El tratamiento profiláctico con tuna tapona y GSH redujo los niveles de FA respecto del grupo APAP, pero este efecto no se observó con la tuna cardona. Cada barra representa el promedio de 6 muestras \pm error estándar de la media. **p<0.05, ***p<0.01 respecto del grupo control; ###p<0.001 respecto del grupo APAP.

8.4.1.4 Glutación reducido (GSH)

El glutatión reducido (GSH) es el principal antioxidante endógeno no enzimático de defensa contra el estrés oxidativo celular. Por ello, es uno de los principales indicadores de daño hepático, puesto que la más amplia reserva de este compuesto se encuentra precisamente en este órgano.

De esta manera, al evaluar la concentración de GSH en el tejido hepático de los animales estudiados, se observó que en el grupo APAP los niveles de GSH ($198 \mu\text{g/g} \pm 4.15 \text{ EEM}$) disminuyeron significativamente respecto al grupo control ($1797 \mu\text{g/g} \pm 27.97 \text{ EEM}$). El uso profiláctico de tuna tapona, tuna cardona y GSH + APAP ($1377 \mu\text{g/g} \pm 119$, $625 \mu\text{g/g} \pm 43.50$ y $668 \mu\text{g/g} \pm 46.23 \text{ EEM}$, respectivamente) mostraron un efecto protector al lograr mantener reservas significativas de GSH en el hígado, respecto del grupo APAP. Los valores medios para los grupos tuna tapona ($1694 \mu\text{g/g} \pm 41.57 \text{ EEM}$) y tuna cardona ($1652 \mu\text{g/g} \pm 40.96 \text{ EEM}$) no fueron alterados respecto de los valores controles y presentaron diferencias significativas respecto del grupo APAP (Figura 38).

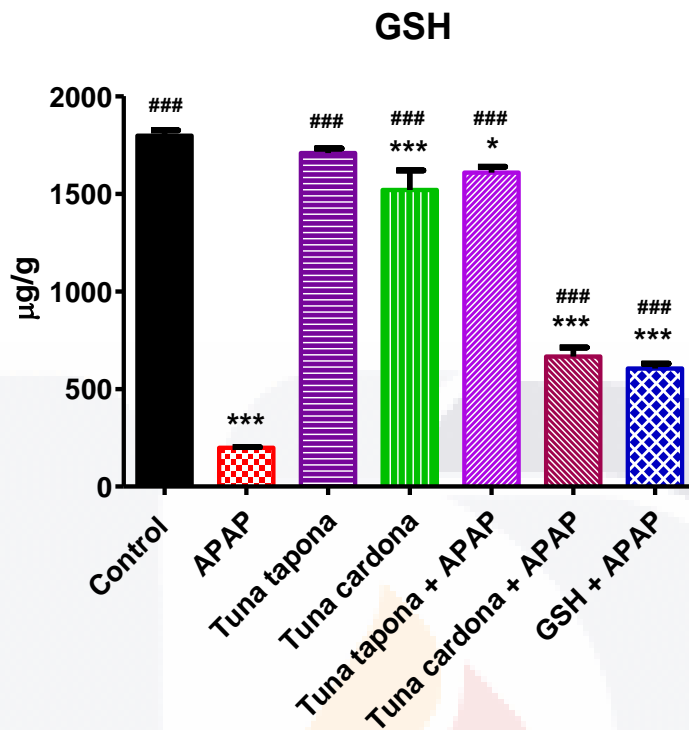


Figura 38. Concentraciones de GSH en el hígado de ratas Wistar machos de los grupos estudiados. Se observaron diferencias significativas en todos los grupos respecto del grupo intoxicado con APAP. La administración de extractos de tuna no indujo estrés oxidativo y ayudó a mantener la reserva de GSH hepática después de la intoxicación aguda con APAP. Cada barra representa el promedio de 6 muestras \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ respecto del grupo control; ### $p < 0.001$ respecto del grupo APAP.

8.4.1.5 Malondialdehido (MDA)

Como se mencionó anteriormente, el daño oxidativo inducido por APAP sobre las membranas lipídicas de los hepatocitos fue medido mediante la cuantificación de MDA en el tejido hepático.

Los resultados obtenidos de este ensayo mostraron que respecto al valor medio del grupo control (44.75 ± 1.78 nmoles/100 mg de tejido): a) el grupo tratado con APAP aumentó de manera significativa (64.67 ± 2.16 nmoles/100 mg) los niveles de MDA y b) los valores medios de los grupos tuna tapona (53.41 ± 2.02 nmoles/100 mg) y tuna cardona (46.48 ± 2.08 nmoles/100 mg) tuvieron leves incrementos no significativos. Asimismo, con relación al grupo APAP, los grupos tuna tapona + APAP (56.44 ± 2.88 nmoles/100 mg) y tuna

cardona + APAP (62.36 ± 2.17 nmoles/100 mg) no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, el tratamiento profiláctico con GSH protegió a las membranas de los hepatocitos contra el daño oxidativo producido por el acetaminofén, ya que los niveles hepáticos de MDA disminuyeron significativamente en el grupo GSH + APAP (44.61 ± 2.35 nmoles/100 mg) con respecto a los valores obtenidos en el grupo APAP (64.67 ± 2.16 nmoles/100 mg) (Figura 39).

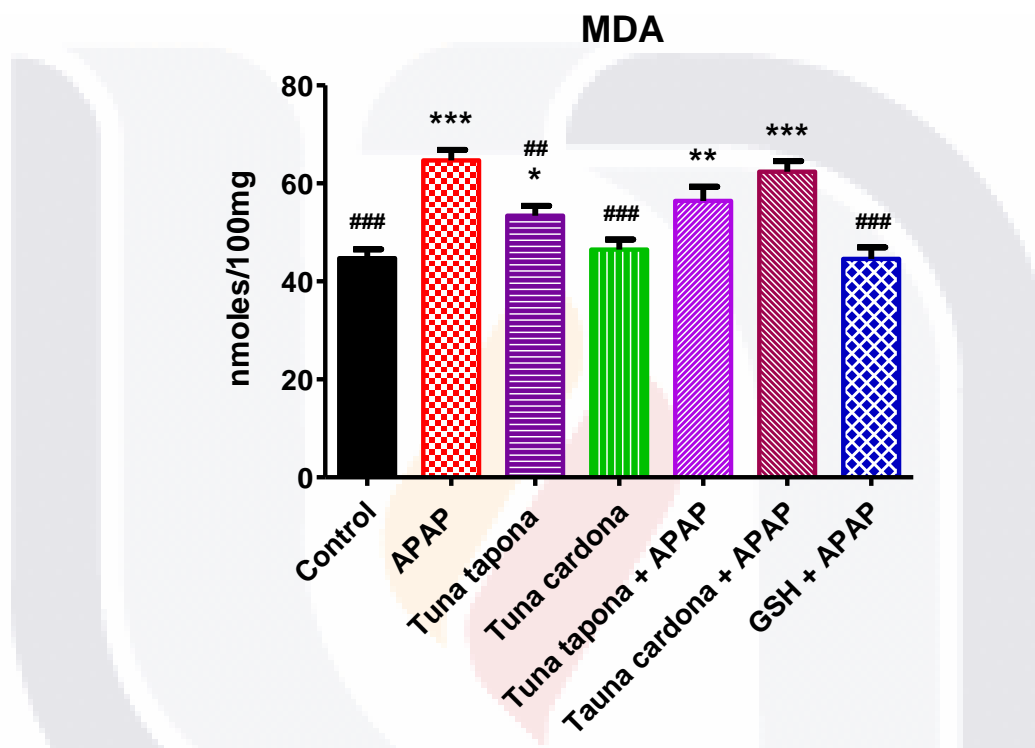


Figura 39. Concentraciones hepáticas de MDA en los animales estudiados. Respecto al valor medio del grupo APAP, los grupos tuna tapona + APAP y tuna cardona + APAP presentaron valores semejantes. Sin embargo, el tratamiento con GSH disminuyó significativamente el daño oxidativo producido por el APAP. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto del grupo control; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ respecto del grupo APAP.

La Tabla 5 resume los valores obtenidos de todas las determinaciones bioquímicas de los principales marcadores de daño hepático en los diferentes grupos experimentales, con su respectivo análisis estadístico. En ella se muestra que los extractos de tuna protegen contra el daño hepático inducido con acetaminofén por estrés oxidativo celular.

Tabla 5. Valores promedio de los marcadores bioquímicos de daño hepático en los grupos de ratas Wistar machos que fueron estudiados. En general, el tratamiento con los extractos de las tunas taponada y cardona disminuyó la magnitud del daño producido por el APAP en el hígado.

Grupo	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	FA (IU/L)	GSH (µg/g)	MDA (nmoles/100mg)
Control	37.96±0.7 [#]	79.48±4.3 [#]	319±15.4 [#]	1797±28 [#]	44.75±1.8 [#]
APAP	82.44±8.8 [*]	320±48 [*]	512±36.7 [*]	198±4.2 [*]	64.67±2.2 [*]
<i>Tuna taponada</i>	37.33±3.8 [#]	75.22±2.8 [#]	285±36.2 [#]	1709±23.1 [#]	53.41±2.0 ^{*#}
<i>Tuna cardona</i>	39.90±3.3 [#]	84.50±5.8 [#]	251±35.2 [#]	1519±101 ^{*#}	46.48±2.1 [#]
<i>Tuna taponada</i> + APAP	41.95±3.3 [#]	129±10.4 [#]	246±11.2 [#]	1608±30.6 ^{*#}	56.44±2.9 [*]
<i>Tuna cardona</i> + APAP	58.14±6.1 ^{*#}	151±33.3 [#]	459±28.6 [*]	666±47.1 ^{*#}	62.36±2.2 [*]
GSH + APAP	69.77±5.5 [*]	289±42.2 [*]	309±15.5 [#]	604±25.8 ^{*#}	44.61±2.4 ^{*#}

Valores promedio de 6 muestras ± error estándar de la media.

* $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

$p < 0.05$ con respecto al grupo APAP.

8.4.2 Expresión génica relativa

8.4.2.1 Citocromo P-450 isoforma 2E1 (CYP2E1)

Cuando se saturan las principales rutas metabólicas hepáticas por sobredosis con acetaminofén, entran en acción las oxidasas del citocromo P-450, específicamente la isoforma 2E1 (CYP2E1), como una de las más importantes. Esta enzima metaboliza cantidades importantes de acetaminofén generando un radical libre altamente tóxico para los componentes celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, se sabe también que esta enzima participa en el metabolismo de flavonoides.

Los resultados obtenidos del ensayo de expresión génica relativa para la CYP2E1 mostraron que en el grupo APAP aumentó significativamente su expresión, con respecto al grupo control. De igual forma, el tratamiento profiláctico con los extractos de tuna indujo la sobreexpresión de dicha enzima con respecto al grupo control, aunque solamente fue significativa para el grupo que recibió tuna taponada. La administración profiláctica de los extractos de tuna previa a la intoxicación con APAP redujo los niveles de expresión de dicha enzima, pero nuevamente solo fue significativa para el grupo tuna cardona + APAP (Figura 40).

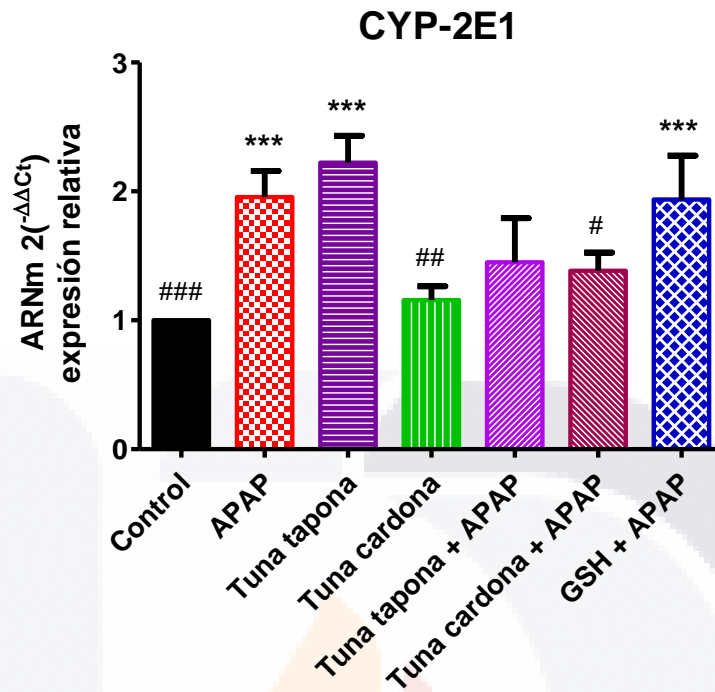


Figura 40. Expresión génica relativa de la enzima CYP2E1 en hepatocitos de los diferentes grupos experimentales. El grupo APAP aumentó significativamente la expresión respecto del grupo control. Los extractos de tunas usados profilácticamente también incrementaron los valores de dicha enzima debido a la presencia de flavonoides en los mismos. Los extractos usados antes de la intoxicación con APAP redujeron la sobreexpresión de CYP2E1. El grupo GSH + APAP no mostró cambios respecto del grupo APAP. Cada barra representa el promedio de 4 muestras analizadas por duplicado \pm desviación estándar. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ respecto del grupo APAP; *** $p < 0.001$ respecto del grupo control.

8.4.2.2 Manganeso-Superóxido dismutasa (Mn-SOD)

La superóxido dismutasa dependiente de manganeso o superóxido dismutasa 2 (SOD2) mitocondrial se encuentra codificada en el ADN y su función como dismutasa es completamente activada en la mitocondria para detoxificar la sobreproducción del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), cuando la cadena respiratoria mitocondrial sufre algún desequilibrio y tiene que ser sobreexpresada. Los resultados obtenidos muestran que el grupo APAP incrementó la sobreexpresión de esta enzima respecto del grupo control. Los extractos de tuna no indujeron cambio alguno respecto del grupo control. En los grupos tuna tapona + APAP y tuna cardona + APAP hubo una disminución significativa de los niveles de

expresión génica relativa de Mn-SOD respecto del grupo APAP. El grupo GSH + APAP no presentó cambios respecto del grupo APAP (Figura 41).

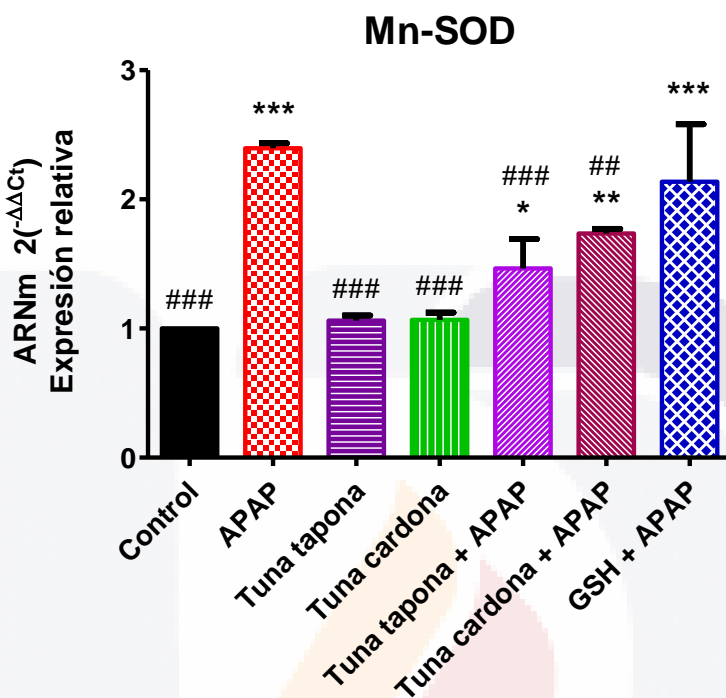


Figura 41. Expresión génica relativa de la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD) en tejido hepático de rata. En el grupo APAP hubo sobreexpresión significativa de la enzima respecto del grupo control. Los extractos de tuna no produjeron cambios en la expresión de la Mn-SOD. Los grupos que recibieron dosis profilácticas de los extractos antes de la intoxicación con APAP redujeron significativamente la expresión de la Mn-SOD respecto del grupo APAP. El grupo GSH + APAP no mostró diferencias significativas respecto del grupo APAP, pero sí con relación al control. Cada barra representa el promedio de 4 muestras analizadas por duplicado \pm desviación estándar. ### p <0.01, #### p <0.001 respecto del grupo APAP; * p <0.05, ** p <0.001, *** p <0.001 respecto del grupo control.

8.4.2.3 Cobre/Zinc-Superóxido dismutasa (Cu/Zn- SOD)

La superóxido dismutasa dependiente de cobre/zinc o superóxido dismutasa 1 (SOD1) se encuentra principalmente en el citosol de células eucariotas y es necesaria para mantener la vida en condiciones aeróbicas. Esta enzima parece ser la principal línea de defensa contra los radicales libres derivados del oxígeno y puede ser rápidamente inducida bajo condiciones de estrés oxidativo celular.

Los resultados del análisis de expresión relativa para la SOD1 mostraron un incremento significativo en el grupo APAP, respecto del grupo control. Los extractos de tuna usados profilácticamente no provocaron sobreexpresión de la enzima en las células hepáticas. Tuna tapona + APAP demostró protección a los hepatocitos al disminuir significativamente la expresión de SOD1 respecto del grupo APAP. Los grupos tuna cardona + APAP y GSH + APAP no mostraron el mismo efecto protector, pues hubo una sobreexpresión significativa de la enzima respecto del grupo control (Figura 42).

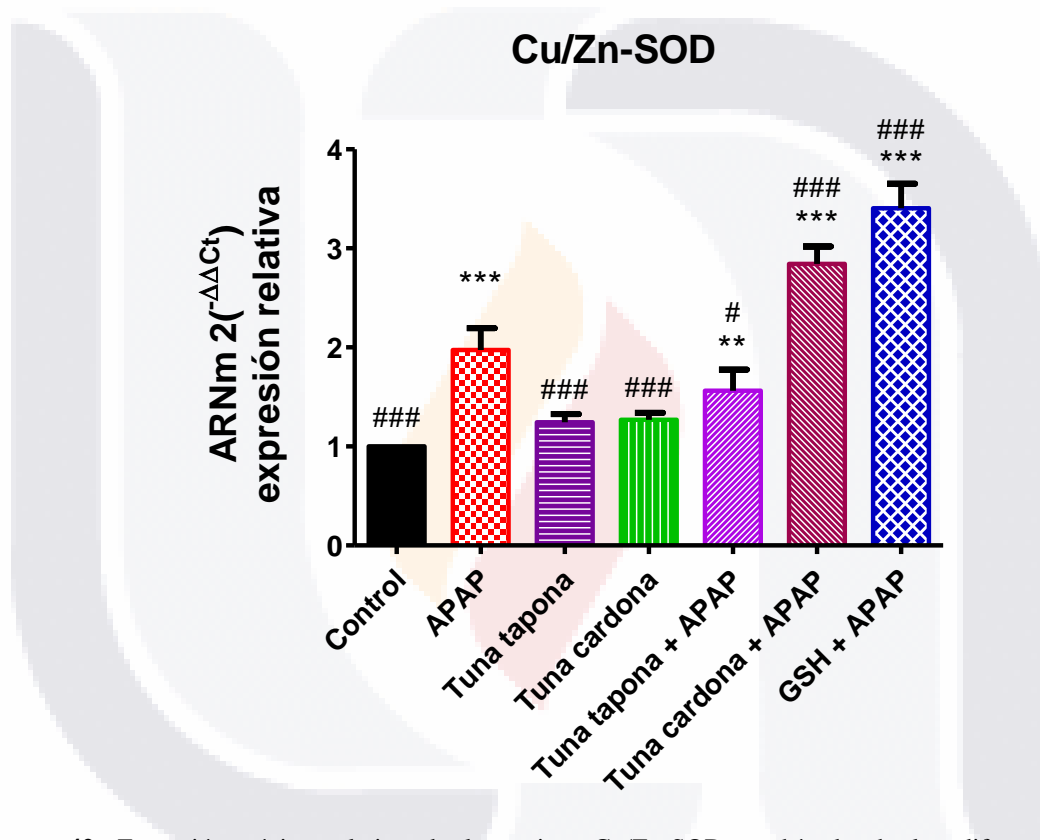


Figura 42. Expresión génica relativa de la enzima Cu/Zn-SOD en hígado de los diferentes grupos experimentales. APAP produjo la sobreexpresión génica significativa de la enzima respecto del grupo control. Los extractos de tuna no indujeron cambios significativos en la expresión de la enzima respecto al control. El grupo tuna tapona + APAP disminuyó significativamente la expresión de Cu/Zn-SOD respecto del grupo APAP. Los tratamientos profilácticos con tuna cardona y GSH previos a la intoxicación con APAP no redujeron los niveles de expresión génica de la enzima, sino que, por el contrario, los aumentaron. Cada barra representa el promedio de 4 muestras analizadas por duplicado \pm desviación estándar. ### p <0.001 respecto del grupo APAP; ** p <0.001, *** p <0.001 respecto del grupo control.

8.4.2.4 Glutación peroxidasa (GPx)

La peroxidasa de glutatión (GPx) es una enzima dependiente de selenio y juega un rol importante en la detoxificación reductiva de peróxidos en las células que utiliza al glutatión como fuente de reducción. La GPx es una enzima importante que se encuentra en el citoplasma y la mitocondria de todos los tipos de células. En este ensayo, la expresión hepática de la GPx disminuyó significativamente en el grupo APAP, respecto del grupo control; además, el tratamiento cotidiano con los extractos de tunas no generó cambios significativos en la expresión de esta enzima. Los grupos de ratas que recibieron dosis profilácticas de estos extractos y de GSH, antes de la intoxicación con APAP, mostraron incrementos significativos en los niveles de la expresión relativa de la GPx respecto del grupo APAP (Figura 43).

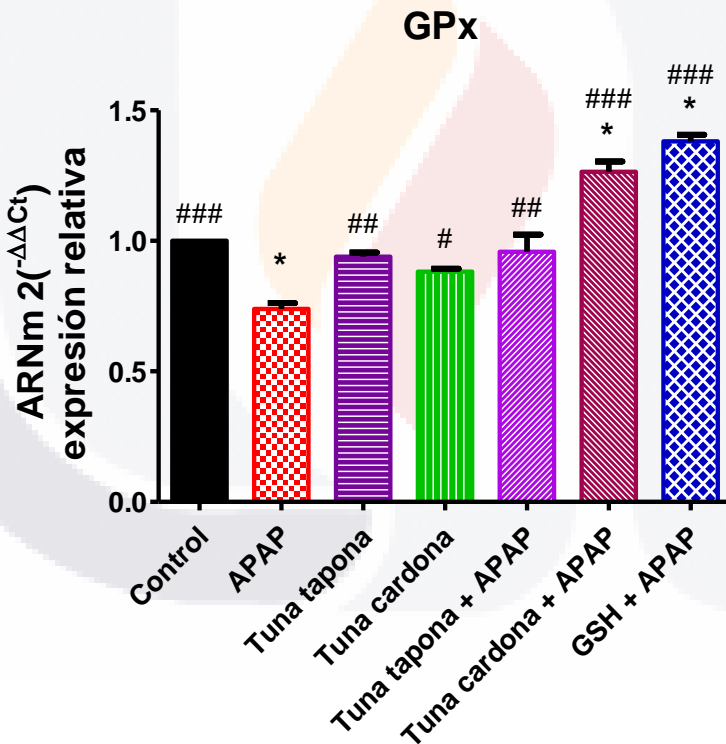


Figura 43. Niveles de inducción de la expresión génica relativa de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) en tejido hepático de ratas Wistar. Respecto al control, la expresión génica de esta enzima disminuyó significativamente en el grupo APAP, mientras que los extractos de los frutos de tunas no produjeron cambios significativos. Con relación al grupo APAP, los tratamientos profilácticos con los extractos de tunas y de GSH, previos a la intoxicación con APAP, aumentaron significativamente la expresión de la GPx. Cada barra

representa el promedio de 4 muestras analizadas por duplicado \pm desviación estándar. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ respecto del grupo APAP; * $p < 0.05$ respecto del grupo control.

8.4.2.5 Catalasa (CAT)

La catalasa es una enzima ubicada principalmente en los peroxisomas de las células hepáticas de los mamíferos; una de sus principales funciones, cuando existen niveles altos de H_2O_2 , es catalizar la descomposición de este peróxido en agua y O_2 para proteger a los orgánulos celulares y tejidos del daño oxidativo.

Los resultados obtenidos de este ensayo mostraron una disminución significativa en la expresión génica relativa de la CAT en el grupo APAP, con respecto al grupo control. El tratamiento con tuna tapona aumentó significativamente la expresión de este gen respecto del grupo control, caso contrario para el grupo tratado con tuna cardona. Es importante señalar que el tratamiento profiláctico con los dos extractos de tunas normalizó los niveles de expresión génica de CAT en los grupos que fueron intoxicados con APAP, y fueron significativamente diferentes a los valores obtenidos del grupo intoxicado con APAP solamente. Asimismo, el grupo que recibió profilácticamente GSH logró incrementar significativamente los niveles de catalasa respecto del grupo control y del grupo APAP, mostrando con ello un efecto protector (Figura 44).

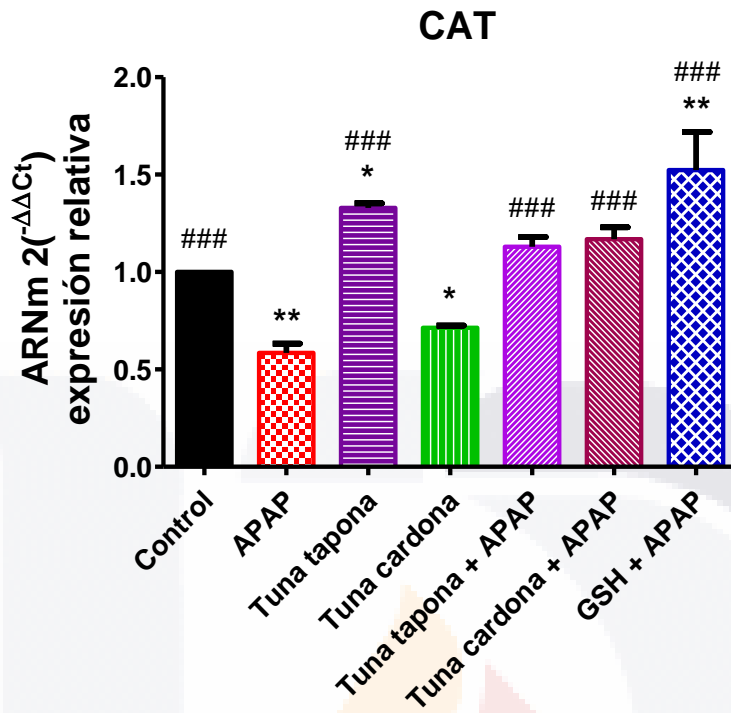


Figura 44. Expresión génica relativa del mRNA de catalasa (CAT) en hígado de ratas Wistar de los grupos estudiados. Respecto del grupo control, el tratamiento con APAP y con el extracto de tuna cardona disminuyeron significativamente la expresión de la CAT, mientras que el extracto de tuna tapona incrementó la expresión de esta enzima. Con relación al grupo APAP, ambos extractos de tuna (tuna + APAP) aumentaron significativamente la expresión de la enzima hasta niveles semejantes al grupo control. La expresión de CAT en el grupo GSH + APAP fue significativamente mayor a la del grupo control y a la del grupo APAP. Cada barra representa el promedio de 4 muestras analizadas por duplicado \pm desviación estándar. ### $p < 0.001$ respecto del grupo APAP; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ respecto del grupo control.

8.4.3 Histopatología

Después del procesamiento de las muestras de tejido hepático para obtener las laminillas teñidas con la técnica de PAS, se realizó el análisis histopatológico para cada muestra de cada grupo experimental tomando en cuenta la morfología de los hepatocitos, la presencia de infiltrado inflamatorio en las áreas circundantes a los vasos sanguíneos o de rastros de muerte celular en las diferentes zonas de los acinos hepáticos, principalmente en el área centrolobulillar (zona III) donde se sabe existe una mayor expresión de las isoenzimas del citocromo P-450.

8.4.3.1 Ácido peryódico de Schiff (PAS)

Los resultados obtenidos del análisis histopatológico de las muestras de tejido hepático obtenidas del grupo APAP (acetaminofén) arrojaron una cantidad importante de células hepáticas (hepatocitos) vacuolizadas principalmente en el área central del lobulillo hepático (centrolobulillar) o zona III del acino hepático (Figura 45, B). Además, hubo una considerable pérdida de glucógeno citoplasmático en los hepatocitos de la zona III, mientras que en los hepatocitos de las zonas I y II hubo una menor pérdida del mismo (Figura 45, C). También se observaron células con núcleos comprimidos y cromatina condensada (picnosis) y se identificaron restos celulares con las características de necrosis de muerte celular por necrosis (Figura 45, D). En la figura 45, A; se pueden observar los hepatocitos cercanos al área centrolobulillar del grupo control sin alteraciones morfológicas y con reacción positiva a la tinción con PAS.

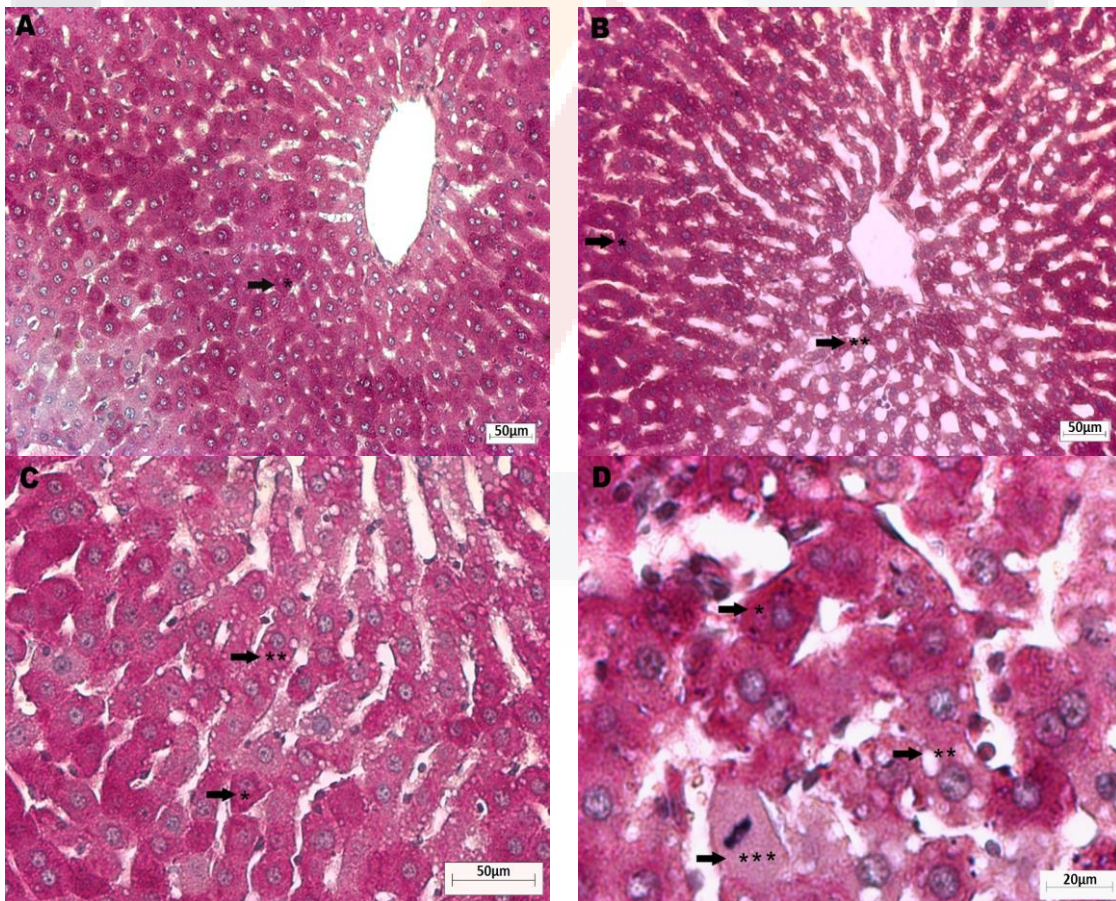


Figura 45. Imágenes histopatológicas de tejido hepático de animales de los grupos control y APAP. (A)

Control: morfología normal en todas las zonas del acino hepático con tinción PAS positiva, indicando reservas de glucógeno (flecha negra*), magnificación 100x. (B) Grupo APAP: intensa vacuolización citoplasmática de los hepatocitos cercanos a la vena central (zonas II y III, flecha negra**), magnificación 100x. (C) Tinción de PAS del grupo APAP indicando depleción del glucógeno citoplasmático y vacuolización de los hepatocitos cercanos a la vena central (flecha negra**), magnificación 200x. (D) Núcleo picnótico y necrosis focal de hepatocitos del grupo APAP (flecha negra***), magnificación 400x.

En los hepatocitos de los grupos tratados solamente con dosis profilácticas de tuna (tapona y cardona) no hubo cambios morfológicos aparentes en ninguno de los casos, además, se pudo observar una importante presencia de glucógeno citoplasmático en los hepatocitos de las zonas II y III del acino hepático indicando que el consumo cotidiano de los mismo no genera algún efecto pro-oxidante, siempre y cuando no se exceda de la dosis adecuada (Figura 46, A y B). Interesantemente, para los hepatocitos de los grupos tratados profilácticamente con los extractos de tuna e intoxicados con APAP no se observaron cambios morfológicos importantes, además, presentaron reacción positiva a la tinción con PAS indicando que la reserva de glucógeno citoplasmático no fue requerida (Figura 46, C y D). En los hepatocitos cercanos a la vena central del grupo que recibió dosis profilácticas de GSH e intoxicado con APAP se observó pérdida parcial del glucógeno citoplasmático, pero no se observaron cambios morfológicos importantes (Figura 46, E).

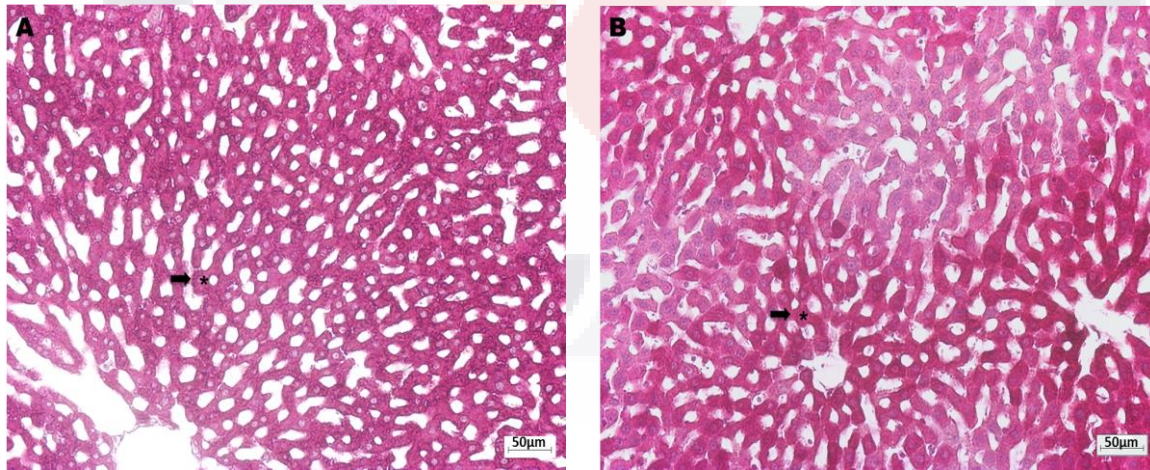


Figura 46. Continúa

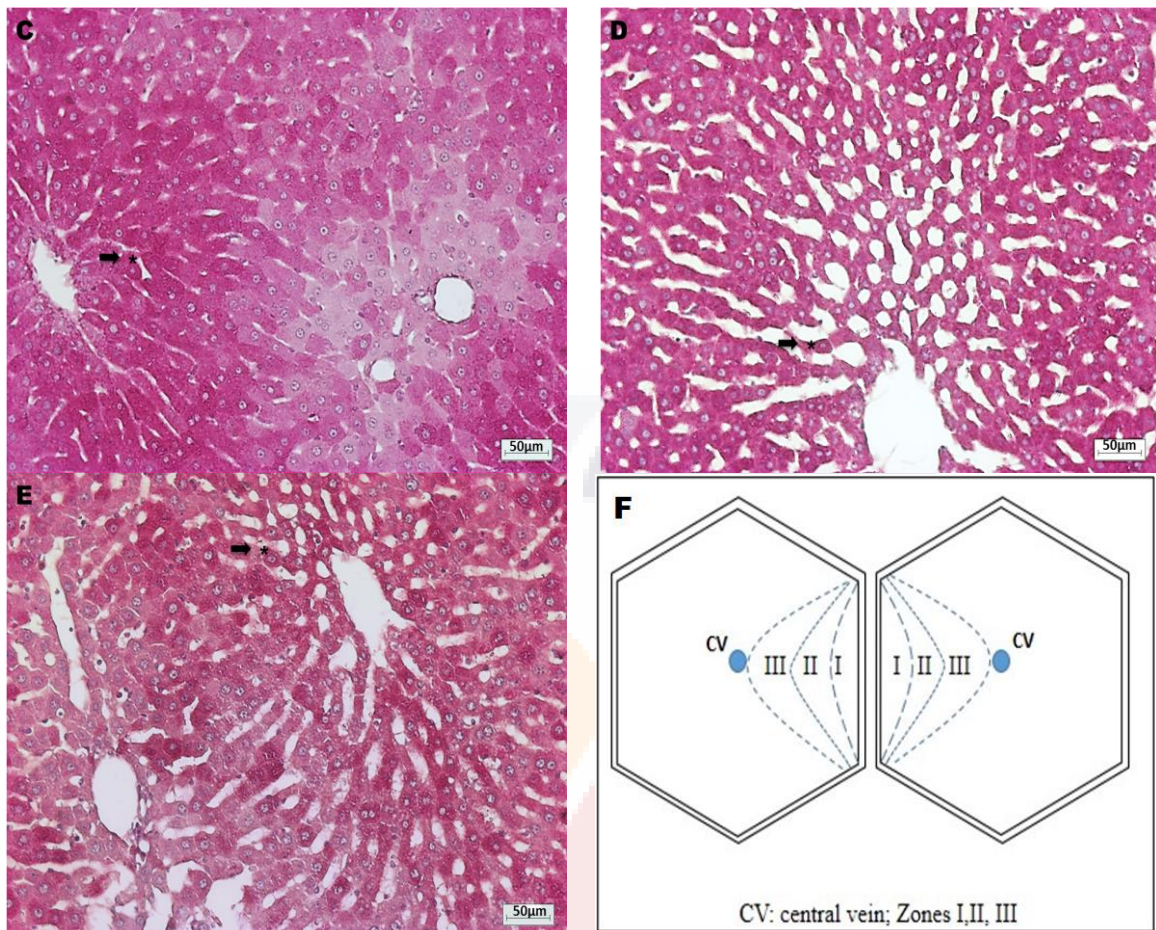


Figura 46. Imágenes histopatológicas de tejido hepático de ratas intoxicadas con APAP y tratadas profilácticamente con los extractos de tuna. (A) Grupo tratado con jugo de tuna de *Opuntia robusta* y (B) de *Opuntia streptacantha*: hepatocitos de las zonas II y III del acino hepático con morfología normal y reacción positiva a la tinción de PAS (flecha negra), magnificación 100x; (C) grupo tratado con *Opuntia robusta*+APAP; (D) grupo tratado con *Opuntia streptacantha*+APAP; y (E) grupo tratado con GSH+APAP: morfología normal y tinción positiva de hepatocitos del área pericentral (zonas II y III) (flecha negra*), magnificación 100x; (F) zonas del acino hepático.

9 DISCUSION

Los frutos de las especies del género *Opuntia* han sido disfrutados por miles de años y fueron un componente importante de la dieta humana. El origen de su consumo data de civilizaciones antiguas mesoamericanas particularmente de la cultura azteca. En la actualidad, se sigue disfrutando del consumo de dichos frutos y, además, existe evidencia científica que muestra algunas de sus propiedades nutraceuticas. Por ello, recientemente, ha surgido un gran interés de la comunidad científica por dilucidar la composición fitoquímica

de cada especie, las propiedades nutricionales y terapéuticas de los compuestos presentes en los mismos, así como de sus mecanismos de acción.

Como ya fue señalado, las especies *Opuntia streptacantha* y *Opuntia robusta* están ampliamente distribuidas en la región central de la República Mexicana, en donde son cultivadas para la producción de sus frutos. Estos son muy consumidos por los pobladores que tienen acceso a ellos y constituyen una fuente rica de compuestos nutraceuticos. Es importante mencionar que entre la población metropolitana existe poco conocimiento sobre el fruto de *Opuntia robusta* “tuna tapona” y, en consecuencia, su consumo es mucho menor que el fruto de *Opuntia streptacantha* “tuna cardona” que es más ampliamente conocida respecto de zonas rurales (Sáenz, 2013).

Los beneficios nutraceuticos de los frutos del género *Opuntia* no solo se caracterizan por su gran contenido de fibra, vitaminas y minerales, sino también por su capacidad antioxidante relacionada con la presencia de diversos compuestos fenólicos incluidos los flavonoides y una mezcla de pigmentos amarillos (betaxantinas) y rojos (betacianinas) (Galati et al., 2003). Sin embargo, las concentraciones de estos compuestos antioxidantes en los frutos del género *Opuntia* son generalmente muy variables ya que, como sucede para cualquier producto o subproducto de origen natural, depende de la especie, de los factores físico-químicos y medioambientales del lugar donde se encuentren, e incluso de su nivel de madurez (Díaz Medina, 2007; Coria Cayupán, 2011).

Los flavonoides son pigmentos de origen natural ampliamente distribuidos en las plantas, flores y frutos. Son los mayores componentes funcionales de muchas preparaciones herbales para usos médicos. La ingesta diaria de flavonoides en una dieta normal, especialmente en frutas y vegetales, es de 1-2 g por día (Havsteen, 2002). En la actualidad, se sabe que los compuestos fenólicos de tipo flavonoide poseen propiedades nutraceuticas, como antioxidantes y anti-inflamatorios, destacando el flavonol quercetina como el compuesto que estructuralmente posee la mejor actividad antioxidante, ya que presenta diversos grupos oxhidrilo (-OH) en posiciones *meta* y *para*; además, es el compuesto más abundante en frutas, vegetales y bebidas, cuyas propiedades han sido relacionadas con la

prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cáncer, por ejemplo (Russo et al., 2012). En consecuencia, el uso de flavonoides puros en la actualidad ha ido en incremento para el tratamiento de algunas enfermedades, debido a su capacidad para inhibir enzimas específicas, estimular algunas hormonas y neurotransmisores, reducir la lipoperoxidación como antioxidantes (van Acker et al., 2006; Frémot et al., 1998) y como hepatoprotectores (Wu et al., 2016).

Las betalainas son pigmentos naturales presentes en plantas del orden *Caryophyllales*. La estructura química de estos compuestos se deriva del ácido betalámico y, dependiendo de los componentes unidos a su cadena principal, se pueden generar betacianinas y betaxantinas. Es bien sabido que el estrés oxidativo genera cambios bioquímicos que contribuyen al desarrollo de muchas enfermedades crónico-degenerativas como cáncer y cardiopatías (Azeredo, 2009). Hay evidencias derivadas de trabajos de investigación que demuestran que las betalaínas tienen actividad antioxidante y reducen la peroxidación lipídica, ya que en su estructura cuentan con una fracción fenólica y un grupo amino cíclico a los cuales se les atribuye dicha propiedad reductora (Stintzing et al., 2005; y, Livrea y Tesoriere, 2013).

En este trabajo de investigación se realizaron por separado extracciones del jugo de los frutos de ambas especies de *Opuntia*, provenientes de diferentes plantas de la misma especie y de la misma región, protegiéndolas de la luz en todo momento. El uso del jugo de los frutos es justificado debido a que Stintzing y cols. (2005) demostraron que el jugo de los frutos de diferentes clones de la especie *Opuntia ficus-indica* y *Opuntia robusta* contiene mayor cantidad de compuestos bioactivos e incluso mayor capacidad antioxidante determinada por diferentes métodos que la pulpa de los mismos. Asimismo, se encontró una gran cantidad de compuestos bioactivos en las dos especies de tunas analizadas, principalmente compuestos betaláinicos y flavonoides. El fruto de *Opuntia robusta* presentó mayor cantidad de betalaínas totales (betacianinas “rojo-purpura” y betaxantinas “amarillos”), así como flavonoides, fenólicos totales y ácido ascórbico, con respecto al jugo extraído del fruto de *Opuntia streptacantha*, incluso la primera especie presentó una coloración mucho más intensa que la segunda.

En nuestro estudio, las cantidades obtenidas de los principales compuestos bioactivos concuerdan con las obtenidas por Sumaya-Martínez y cols. (2011), quienes realizaron una caracterización química de los principales compuestos presentes en siete especies de frutos del género *Opuntia* con diferentes coloraciones; también demostraron que los frutos con coloración rojo-purpúrea tienen mayor concentración de ácido ascórbico, compuestos fenólicos totales (incluidos los flavonoides) y betalainas totales, con respecto a los frutos de coloración amarilla. Además, es importante señalar que la quercetina fue el flavonoide más abundante en los extractos de frutos de *Opuntia robusta* y de *Opuntia streptacantha*, lo que seguramente les confiere su excelente actividad reductora (antioxidante). Esto fue demostrado por Kuti (2004) quien analizó la presencia de diferentes flavonoides, entre otros compuestos antioxidantes como carotenoides y ácido ascórbico, en cuatro diferentes especies de frutos del género *Opuntia*. Sus resultados mostraron mayor abundancia del flavonol quercetina en los cuatro frutos, con respecto a otros flavonoides analizados como canferol e isoramnetina.

Asimismo, de los diferentes análisis de la capacidad antioxidante a los que fueron sometidos los jugos de las dos especies de tuna estudiadas, se obtuvieron resultados que demuestran que el jugo del fruto de *Opuntia robusta* tiene mayor capacidad para neutralizar radicales libres (capacidad reductora) que el jugo del fruto de *Opuntia streptacantha*; esto posiblemente se deba a que los frutos de *Opuntia robusta* tienen mayor cantidad de compuestos antioxidantes en su jugo. Dichos resultados apoyan lo obtenido por Yahia y Mondragon-Jacobo (2011) quienes estudiaron la caracterización de los componentes nutricionales y la actividad antioxidante de la pulpa de diez frutos de especies del género *Opuntia*, incluidas *robusta* y *streptacantha*. Entre sus resultados describen haber encontrado mayor cantidad de compuestos nutricionales, así como de actividad antioxidante en la especie *Opuntia robusta* con respecto a *Opuntia streptacantha*.

En años recientes, varios trabajos han demostrado que el jugo extraído de diferentes especies de frutos del género *Opuntia* tiene diversas propiedades biológicas, entre ellas: anticlastogénicas (Madrigal-Santillan, 2013), anticarcinogénicas (Zou et al., 2005), antiulcerativas (Galati, et al., 2003), antilipoperoxidantes (Alimi et al., 2012) y

antioxidativas (Brahmi et al., 2011). Muchos de estos efectos han sido relacionados directamente con la presencia de compuestos quimiopreventivos como las betalaínas, los flavonoides y otros compuestos fenólicos, aunque como se mencionó anteriormente, es difícil predecir cuál de ellos aporta el mayor efecto protector (preventivo o terapéutico) pues depende de su concentración, y esto está dado por diversos factores externos, dependiendo del lugar donde se encuentren las plantas que brindan tales frutos.

También existe la posibilidad de que la mezcla de dichos compuestos en la misma planta o fruto generen un efecto sinérgico en los organismos de las personas que los consumen, ya que se ha demostrado que al aislar y probar diferentes compuestos por separado, generalmente no tienen el mismo efecto que al estar mezclados (Heber, 2004). Por ello, actualmente existe una tendencia mundial en retomar el uso de plantas, frutos y otros productos naturales para el tratamiento o prevención de diversas enfermedades agudas o crónico-degenerativas (Kuti, 2004).

Se han publicado diversos estudios que demuestran la toxicidad hepática aguda inducida con el acetaminofén en varios modelos animales. Dichos estudios emplean diferentes dosis para inducir el daño hepático. Es importante mencionar que el efecto que se buscó en nuestros animales de experimentación fue la inducción de toxicidad hepática aguda sin llegar a la muerte, con la menor dosis de acetaminofén reportada por vía intraperitoneal en ratas macho de la cepa albina Wistar. Por ello, se utilizó la dosis reportada por Vendemiale et al. (1996) de 500 mg/kg i.p., la cual fue suficiente para inducir la toxicidad hepática aguda deseada y alterar significativamente los valores de los principales marcadores de daño hepático en suero y tejido homogenizado, respecto de los valores de un grupo control. Además, fue necesario realizar una curva tiempo-respuesta utilizando la dosis de 500 mg/kg de acetaminofén en ratas macho Wistar, intraperitoneal, para determinar el tiempo exacto en donde se presentan los cambios más significativos de los principales marcadores bioquímicos de daño hepático. Se encontró que, después de 5 horas, los valores de la enzima ALT en suero sanguíneo, así como de GSH y MDA en tejido hepático homogenizado se alteran significativamente.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Bauer et al. (2000), Pang et al. (2016) y Kim et al. (2015) quienes empleando un modelo de toxicidad hepática aguda inducida con acetaminofén (vía intraperitoneal) demostraron que, de 4-8 horas post-intoxicación, varios de los principales marcadores de daño hepático como ALT, AST, LDH, GSH e incluso niveles de expresión génica relativa de algunas enzimas y reguladores bioquímicos intracelulares se alteran significativamente respecto de lo obtenido en un grupo control.

Los resultados del ensayo biológico de este estudio confirmaron lo anterior ya que los principales marcadores de daño hepático en suero sanguíneo fueron significativamente modificados por la intoxicación aguda con APAP. Existe evidencia suficiente que muestra que cuando las rutas metabólicas normales del acetaminofén (glucoruno-conjugación y sulfatación) son saturadas por una sobredosis de este fármaco, existen mecanismos compensatorios para poder eliminarlo con la actividad de otras enzimas. Tal es el caso de las oxidasas del grupo del Citocromo P-450 (CYP450), mayormente la isoforma 2E1 (CYP2E1), que ayudan a metabolizar el exceso de acetaminofén, incrementando incluso sus niveles de expresión génica, aunque la consecuencia de dicha sobre-expresión sea la sobre-producción de un metabolito altamente reactivo (NAPQI) que, posteriormente, desencadena una serie de reacciones nocivas al interior de las células. En efecto, está bien establecido que después de dosis tóxicas de APAP, la producción de NAPQI genera la formación de aductos proteicos, específicamente 3-nitrotirosina (3-NT), como consecuencia de la producción de peroxinitrito en áreas centrolobulillares hepáticas, donde el CYP2E1 es altamente expresado, lo que sugiere que la formación de 3-NT es esencial en la toxicidad inducida con APAP (Abdelmegeed et al., 2010).

Como ya fue señalado, los sistemas biológicos cuentan con un complejo sistema antioxidante (enzimático y no enzimático) para contrarrestar la toxicidad celular causada por los radicales libres u otros agentes oxidantes. El GSH es el principal antioxidante endógeno no enzimático que, en primer nivel, protege al hígado del daño producido por el radical NAPQI derivado del metabolismo del APAP. Sin embargo, se ha descrito que las enzimas del CYP450 no solamente se encuentran en el retículo endoplásmico sino también en la mitocondria, donde metabolizan una gran cantidad de sustratos y producen cantidades

significativas de radicales libres. En efecto, se sabe que en el hígado de la rata más del 40% del total del CYP2E1 celular se encuentra en la mitocondria y cuando se usa APAP como modelo de toxicidad, la localización de CYP2E1 en la mitocondria es suficiente para producir sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, depleción de GSH, incremento de la expresión Hsp70 mitocondrial, disfunción mitocondrial y citotoxicidad (Knockaert et al., 2011).

Por ello, dependiendo de la dosis de APAP y la cantidad de NAPQI producido, las reservas de GSH pueden disminuir drásticamente hasta agotarse por completo, lo que permite que dicho metabolito reactivo interactúe con los lípidos y las proteínas de todas las membranas celulares, provocando un incremento en la permeabilidad y/o ruptura membranal (necrosis) con la consecuente liberación hacia el espacio extracelular y, posteriormente, al torrente sanguíneo de varias enzimas que se encuentran en mayor cantidad en el tejido hepático como ALT, AST, FA y LDH indicando un daño severo a las células parenquimatosas (Bajt et al., 2000). Así, las determinaciones en suero o plasma sanguíneo de dichas enzimas (perfil hepático) siguen siendo el análisis de rutina más útil para el diagnóstico de enfermedades hepáticas, aunque actualmente se están evaluando otros métodos de diagnóstico más precisos empleando diferentes fragmentos de micro-ARN como biomarcadores tempranos de daño hepático (Ward, 2012).

Sin embargo, como se mencionó previamente, existe también un sistema de defensa antioxidante enzimático en el que participan diversas enzimas que se encuentran principalmente en el hígado como catalasa, glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD). Dichas enzimas tienen la capacidad de autorregulación dependiendo de las necesidades celulares. Al disminuir considerablemente el principal recurso antioxidante no enzimático (GSH), dichas enzimas juegan un papel importante en la defensa celular contra el estrés oxidativo y pueden ser genéticamente sobre-expresadas según lo requieran los hepatocitos (Conde de la Rosa et al., 2006).

Al respecto, diversos reportes han demostrado que ciertos compuestos fitoquímicos, específicamente del tipo flavonoide, tienen la capacidad de inducir la sobre-expresión del

tesis tesis tesis tesis tesis

sistema enzimático de defensa antioxidante, sin provocar estrés oxidativo celular, lo que mejora la capacidad protectora antioxidante contra los factores endógenos o exógenos que favorezcan la producción de agentes oxidantes celulares (Dani et al., 2008; Alimi et al., 2012). Por ello, la cuantificación de la expresión génica relativa de las diferentes enzimas involucradas en el metabolismo de fármacos y la defensa antioxidante puede ser de gran utilidad en el diagnóstico y pronóstico de pacientes con enfermedades hepáticas agudas e incluso crónicas, pues de esta forma se puede predecir el desarrollo de una patología.

Los resultados de este trabajo también mostraron que el consumo profiláctico de los jugos extraídos de los frutos de *Opuntia robusta* y *Opuntia streptacantha* tienen la capacidad de normalizar la expresión génica del CYP2E1, previniendo la formación de NAPQI por el metabolismo de una dosis tóxica de APAP. Además, ambos extractos normalizaron la expresión génica de las principales enzimas antioxidantes, como la catalasa y la glutatión peroxidasa, después de la intoxicación aguda con acetaminofén; por lo contrario, el daño inducido con acetaminofén solamente parece generar cambios irreversibles al interior de la célula en donde incluso la expresión génica relativa de catalasa y glutatión peroxidasa disminuyen significativamente. Esta disminución podría estar relacionada directamente con un mecanismo de daño a la estructura molecular del ADN, ya que diversos estudios han demostrado que la sobreproducción del agente oxidante NAPQI genera daño mitocondrial irreparable al desacoplar la cadena transportadora de electrones, lo que se traduce en la disminución de la producción de la energía celular necesaria (ATP), un incremento en la permeabilidad de las membranas mitocondriales y la sobreproducción de ROS. Esto impide inducir la muerte celular programada (apoptosis) y, a la vez, induce la lipoperoxidación de las principales membranas celulares favoreciendo su ruptura y la exposición de los componentes celulares hacia la matriz extracelular, fenómeno conocido como necrosis (Jaeschke et al., 2003; Jaeschke & Bajt, 2005).

El análisis histológico del hígado de los animales de experimentación mostró que los compuestos antioxidantes presentes en los dos extractos de tuna ejercieron un efecto citoprotector al disminuir el daño y los cambios morfológicos causados por el NAPQI en el área centrolobulillar de los hepatocitos; además, evitaron que se agotaran las reservas de

glucógeno citoplasmático de estas células. En consecuencia, esto puede ser interpretado como una disminución del daño mitocondrial pues la producción de ATP presumiblemente no disminuyó al ser evitado el desacople de la cadena transportadora de electrones y la consecuente sobreproducción de ROS al interior de la célula, posiblemente por el efecto sinérgico de los fitoquímicos presentes en ambos frutos.

10 CONCLUSIONES

- El jugo de los frutos de *Opuntia robusta* tuvo mayor concentración de sustancias antioxidantes (betalaínas totales, flavonoides, compuestos fenólicos totales y ácido ascórbico) que el jugo de los frutos de *Opuntia streptacantha*.
- Los frutos de *Opuntia robusta* mostraron mayor capacidad antioxidante que los frutos de *Opuntia streptacantha*.
- El APAP generó daño oxidativo agudo en el hígado de los animales de experimentación manifestado por vacuolización y necrosis de hepatocitos, aumento significativo en los niveles séricos de ALT y AST, así como disminución de los niveles de GSH respecto del grupo control.
- El APAP produjo un aumento significativo en la expresión génica de CYP2E1 y de las isoformas de la SOD, así como una subexpresión de GPx y CAT con respecto al grupo control.
- El daño bioquímico producido por el APAP en el hígado de los animales tratados con este fármaco fue revertido o disminuyó con los antioxidantes presentes en ambos extractos de tuna.
- El estudio histológico del hígado mostró que los antioxidantes presentes en los dos extractos de tuna disminuyeron el daño estructural producido por acetaminofén.
- El consumo frecuente de frutos de las plantas del genero *Opuntia* son una rica fuente de compuestos nutraceuticos que pueden ser útiles en la prevención de patologías hepáticas y de otros órganos. Además, pueden ser utilizados como suplementos alimenticios.

- Es importante señalar que el consumo en exceso de estos frutos puede generar un efecto prooxidante nocivo para el organismo.
- El acetaminofén es el analgésico prescrito con más frecuencia por los médicos y, a pesar de que su uso aparentemente es inocuo, puede producir toxicidad hepática y de otros órganos por su consumo elevado o crónico. Por ello, el autoconsumo de medicamentos de venta libre implica un gran riesgo para la salud de las personas que los consumen.

11 BIBLIOGRAFIA

- Abdelmegeed, M. A., Moon, K.-H., Chen, C., Gonzalez, F. J., & Song, B.-J. (2010). Role of cytochrome P450 2E1 in protein nitration and ubiquitin-mediated degradation during acetaminophen toxicity. *Biochemical Pharmacology*, *79*(1), 57–66. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.07.016>
- Al-Rejaie, S. S., Aleisa, A. M., Sayed-Ahmed, M. M., AL-Shabanah, O. A., Abuohashish, H. M., Ahmed, M. M., Hafez, M. M. (2013). Protective effect of rutin on the antioxidant genes expression in hypercholesterolemic male Westar rat. *BMC complementary and alternative medicine*, *13*(1), 136.
- Alimi, H., Hfaeidh, N., Bouoni, Z., Sakly, M., & Ben Rhouma, K. (2012). Protective effect of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* prickly pear juice upon ethanol-induced damages in rat erythrocytes. *Alcohol*, *46*(3), 235–243. <http://doi.org/10.1016/j.alcohol.2011.09.024>
- Alimi, H., Hfaeidh, N., Mbarki, S., Bouoni, Z., Sakly, M., & Rouma, K. B. (2012). Evaluation of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* fruit juice hepatoprotective effect upon ethanol toxicity in rats. *General Physiology and Biophysics*, *31*(3), 335–342. http://doi.org/10.4149/gpb_2012_038
- Andersen, O. M., & Markham, K. R. (2005). *Flavonoids: chemistry and biochemistry*. Boca Raton, Fla.; London: CRC.
- Anderson, E. F. (2001). *The Cactus Family*. Portland, Oregon. *Timber Press*. p:516-517, 520. ISBN: 0-88192-498-9.

- Angelova, P. R., Horrocks, M. H., Klenerman, D., Gandhi, S., Abramov, A. Y., & Shchepinov, M. S. (2015). Lipid peroxidation is essential for α -synuclein-induced cell death. *Journal of Neurochemistry*, *133*(4), 582–589. <https://doi.org/10.1111/jnc.13024>
- Arts, I. C. W., Hollman, P. C. H. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *81*: 317-325.
- Azeredo, H. M. C. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability - a review. *International Journal of Food Science & Technology*, *44*(12), 2365–2376. doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01668.
- Bajt, M. L., Lawson, J. A., Vonderfecht, S. L., Gujral, J. S., Jaeschke, H. (2000). Protection against Fas receptor-mediated apoptosis in hepatocytes and nonparenchymal cells by a Caspase-8 inhibitor in vivo: Evidence for a postmitochondrial processing of Caspase-8. *Toxicological Sciences*, *58*, 109-117.
- Bajt, M. L., Farhood, A., Lemasters, J. J., & Jaeschke, H. (2007). Mitochondrial Bax Translocation Accelerates DNA Fragmentation and Cell Necrosis in a Murine Model of Acetaminophen Hepatotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *324*(1), 8–14. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.129445>
- Ballinger, S. W. (2005). Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *38*(10), 1278–1295. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.014>
- Bauer, I., Vollmar, B., Jaeschke, H., Rensing, H., Kraemer, T., Larsen, R., Bauer, M. (2000). Transcriptional activation of heme oxygenase-1 and its functional significance in acetaminophen-induced hepatitis and hepatocellular injury in the rat. *Journal of Hepatology*, *33*, 395-406.
- Brahmi, D., Bouaziz, C., Ayed, Y., Mansour, H. B., Zourgui, L., & Bacha, H. (2011). Chemopreventive effect of cactus *Opuntia ficus indica* on oxidative stress and genotoxicity of aflatoxin B1. *Nutrition & Metabolism*, *8*(1), 1.
- Bravo, H. (1978). Las Cactáceas de México. (2ª ed.). México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Volumen 1. p:327-328, 333-334.

- Briehl, M. M. (2015). Oxygen in human health from life to death – An approach to teaching redox biology and signaling to graduate and medical students. *Redox Biology*, 5, 124–139. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.04.002>
- Bronstein, A. C., Spyker, D. A., Cantilena, L. R., Rumack, B. H., & Dart, R. C. (2012). 2011 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers National Poison Data System (NPDS): 29th Annual Report. *Clinical Toxicology*, 50(10), 911–1164. doi:10.3109/15563650.2012.746424.
- Cai, Y., & Corke, H. (1999). Amaranthus betacyanin pigments applied in model food systems. *Journal of Food Science*, 64(5), 869–873.
- Cassano, A., Conidi, C., & Drioli, E. (2010). Physico-chemical parameters of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice clarified by microfiltration and ultrafiltration processes. *Desalination*, 250(3), 1101–1104. doi:10.1016/j.desal.2009.09.117.
- Choueiri, L., Chedea, V. S., Calokerinos, A., & Kefalas, P. (2012). Antioxidant/pro-oxidant properties of model phenolic compounds. Part II: Studies on mixtures of polyphenols at different molar ratios by chemiluminescence and LC–MS. *Food Chemistry*, 133(3), 1039–1044. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.057.
- Clark, R., Fisher, J. E., Sketris, I. S., & Johnston, G. M. (2012). Population prevalence of high dose paracetamol in dispensed paracetamol/opioid prescription combinations: an observational study. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 12(1), 11.
- Conde de la Rosa, L., Schoemaker, M. H., Vrenken, T. E., Buist-Homan, M., Havinga, R., Jansen, P. L. M., & Moshage, H. (2006). Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: Involvement of JNK and ERK MAP kinases. *Journal of Hepatology*, 44(5), 918–929. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.07.034>
- Coria Cayupán, Y. S., Ochoa, M. J., & Nazareno, M. A. (2011). Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia* sp. fruits. Changes in bioactive-compound contents during ripening process. *Food Chemistry*, 126(2), 514–519. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.033>
- Cover, C. (2005). Peroxynitrite-Induced Mitochondrial and Endonuclease-Mediated Nuclear DNA Damage in Acetaminophen Hepatotoxicity. *Journal of Pharmacology*

and *Experimental Therapeutics*, 315(2), 879–887.

<https://doi.org/10.1124/jpet.105.088898>

- Crozier, A., Lean, M. E., McDonald, M. S., & Black, C. (1997). Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 590–595.
- Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446–467. doi:10.1016/j.mam.2010.09.007.
- Damien Dorman, H. J., & Hiltunen, R. (2011). Antioxidant and pro-oxidant in vitro evaluation of water-soluble food-related botanical extracts. *Food Chemistry*, 129(4), 1612–1618. doi:10.1016/j.foodchem.2011.06.017.
- Dani, C., Oliboni, L. S., Pasquali, M. A. B., Oliveira, M. R., Umezu, F. M., Salvador, M., ... Henriques, J. A. P. (2008). Intake of Purple Grape Juice as a Hepatoprotective Agent in Wistar Rats. *Journal of Medicinal Food*, 11(1), 127–132. <http://doi.org/10.1089/jmf.2007.558>
- Dhalla, N. S., Temsah, R. M., & Neticadan, T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension*, 18(6), 655–673.
- Díaz Medina, E. M., Rodríguez, E. M. R., & Romero, C. D. (2007). Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* fruits. *Food Chemistry*, 103(1), 38–45. doi:10.1016/j.foodchem.2006.06.064.
- Domínguez, Xorge. (1975). Cromatografía en papel y en capa delgada. Departamento de Química, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey; Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, *Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico*, Washington, D.C.
- Dunning, S., ur Rehman, A., Tiebosch, M. H., Hannivoort, R. A., Haijer, F. W., Woudenberg, J., Moshage, H. (2013). Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(12), 2027–2034. doi:10.1016/j.bbadis.2013.07.008

- Dürüst, N., Sümengen, D., & Dürüst, Y. (1997). Ascorbic acid and element contents of foods of Trabzon (Turkey). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), 2085–2087.
- Fan, Y., Rong, Y., Li, P., Dong, W., Zhang, D., Zhang, L., & Cui, M. (2013). Genistein protection against acetaminophen-induced liver injury via its potential impact on the activation of UDP-glucuronosyltransferase and antioxidant enzymes. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 172–181. doi:10.1016/j.fct.2013.01.003.
- Fendrick, A. M., Pan, D. E., & Johnson, G. E. (2008). OTC analgesics and drug interactions: clinical implications. *Osteopathic Medicine and Primary Care*, 2(1), 2. doi:10.1186/1750-4732-2-2.
- Fernández-Barocio, F., & Sánchez-Villegas, M. del C. S. (2013). Epidemiología de las intoxicaciones en el Servicio de Urgencias Pediátricas de un Hospital de Tercer Nivel. Reporte de cinco años. *Archivos de Medicina de Urgencia de México*, 5(1), 18–24.
- Flores, C. A., & Aranda, G. (1997). Opuntia-based ruminant feeding systems in Mexico. *Grana*, 56(150,000), 150–0.
- Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E. M., & Panayiotidis, M. I. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2), 3–22. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.11.012.
- Frémont, L., Gozzélino, M. T., Franchi, M. P., & Linard, A. (1998). Dietary flavonoids reduce lipid peroxidation in rats fed polyunsaturated or monounsaturated fat diets. *The Journal of Nutrition*, 128(9), 1495–1502.
- Galati, E. M., Mondello, M. R., Giuffrida, D., Dugo, G., Miceli, N., Pergolizzi, S., & Taviano, M. F. (2003). Chemical Characterization and Biological Effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. Fruit Juice: Antioxidant and Antiulcerogenic Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 4903–4908. <http://doi.org/10.1021/jf030123d>
- Gilca, M., Stoian, I., Atanasiu, V., Virgolici, B. (2007). The oxidative hypothesis of senescence. *Journal of Postgraduate Medicine*, 53(3): 207-213.

- Gonzalez, F. J. (2005). Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1–2), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.04.021>
- Graf, B. A., Milbury, P. E., & Blumberg, J. B. (2005). Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *Journal of Medicinal Food*, 8(3), 281–290.
- Gulcin, İ., Buyukokuroglu, M. E., & Kufrevioglu, O. I. (2003). Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 34(4), 278–281.
- Gutteridge, J. M. C. (1993). “Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence”. *Free Radical Research Communications*, 19(3), 141–158.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 59(5), 1609–1623.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., Cross C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119(6): 598–620.
- Havsteen, B. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoides. *Pharmacology & Therapeutics*, 96: 67–202.
- Heber, D., (2004). Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. *Journal of Postgraduate Medicine*, 50(2), 145.
- Hersh, E. V., Pinto, A., & Moore, P. A. (2007). Adverse drug interactions involving common prescription and over-the-counter analgesic agents. *Clinical therapeutics*, 29(11), 2477–2497.
- Hinneburg, I., Damien Dorman, H. J., & Hiltunen, R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 97(1), 122–129. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.028>
- Hissin, P.J. and Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry*, 74:214–226. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2)

- Hoen, P., Commandeur, J., Vermeulen, N., Van Berkel, T. and Bijsterbosch, M. (2000). Selective induction of cytochrome P450 3A1 by dexamethasone in cultured rat hepatocytes: Analysis with a novel reverse transcriptase–polymerase chain reaction assay. *Biochemical Pharmacology*, 60(10), 1509–1518.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437–4444. <http://doi.org/10.1021/jf0201529>
- Illoldi-Rangel, P., Ciarleglio, M., Sheinvar, L., Linaje, M., Sánchez-Cordero, V., & Sarkar, S. (2012). Opuntia in México: Identifying Priority Areas for Conserving Biodiversity in a Multi-Use Landscape. *PLoS ONE*, 7(5), e36650. doi:10.1371/journal.pone.0036650.
- Jaeschke, H. (1990). Glutathione disulfide formation and oxidant stress during acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice in vivo: The protective effect of allopurinol. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 255, 935–941.
- Jaeschke, H., Knight, T. & Bajt, M. (2003). The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology Letters*, 144(3), 279–288. doi:10.1016/S0378-4274(03)00239-X.
- Jaeschke, H. & Bajt, M. (2005). Intracellular Signaling Mechanisms of Acetaminophen-Induced Liver Cell Death. *Toxicological Sciences*, 89(1), 31–41. doi:10.1093/toxsci/kfi336
- James, L. P., Mayeux, P. R., & Hinson, J. A. (2003). Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(12), 1499–1506.
- Jaramillo, F., Rodríguez M. L., Avelar, F., de la Cerda, E. & Maldonado, M. (2012). Radicales libres, estrés oxidativo y antioxidantes celulares. En Jaramillo, F., Rincón, A. & Martínez, M. (1ª edición), *Estrés oxidativo y su impacto en la salud*

(pp. 17-39). Aguascalientes, México: *Textos Universitarios*. ISBN: 978-607-8227-95-2.

- Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2–3), 65–87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>
- Jothy, S. L., Aziz, A., Chen, Y., & Sasidharan, S. (2012). Antioxidant Activity and Hepatoprotective Potential of Polyalthia longifolia and Cassia spectabilis Leaves against Paracetamol-Induced Liver Injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1–10. doi:10.1155/2012/561284.
- Kanner, J., Harel, S., & Granit, R. (2001). Betalains A New Class of Dietary Cationized Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5178–5185. <https://doi.org/10.1021/jf010456f>
- Katzung, B. G. (2010). Farmacología básica y clínica. (9ª ed.). *Editorial El Manual Moderno*. ISBN: 978-607-1503-36-7.
- Khan, M. I. (2016). Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and Bioavailability: Nutritional biochemistry of betalains.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 316–330. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12185>
- Kim, H. G., Kim, J. M., Han, J. M., Lee, J. S., Choi, M. K., Lee, D. S., Park, Y. H., Son, C. G. (2014). Chunggan extract, a traditional herbal formula, ameliorated alcohol-induced hepatic injury in rat model. *World Journal of Gastroenterology*, 20(42), 15703. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i42.15703>
- Kim, I. H., Hwang, J. H., Kim, K. S., Noh, J. R., Choi, D. H., Kim, D. K., Tadi, S., Yim, Y. H., Choi, H. S., Lee, C. H. (2015). Metformin ameliorates acetaminophen hepatotoxicity via Gadd45 β -dependent regulation of JNK signaling in mice. *Journal of Hepatology*, 63, 75-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.050>
- Kim, J.-S., He, L., & Lemasters, J. J. (2003). Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(3), 463–470. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00618-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00618-1)

- Kim, S. H., Jeon, B. J., Kim, D. H., Kim, T. I., Lee, H. K., Han, D. S., Sung, S. H. (2012). Prickly Pear Cactus (*Opuntia ficus indica* var. *saboten*) Protects Against Stress-Induced Acute Gastric Lesions in Rats. *Journal of Medicinal Food*, 15(11), 968–973. doi:10.1089/jmf.2012.2282.
- Knockaert, L., Descatoire, V., Vadrot, N., Fromenty, B., & Robin, M.-A. (2011). Mitochondrial CYP2E1 is sufficient to mediate oxidative stress and cytotoxicity induced by ethanol and acetaminophen. *Toxicology in Vitro*, 25(2), 475–484. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.11.019>
- Kozłowska, A., & Szostak-Wegierek, D. (2014). Flavonoids-food sources and health benefits. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 65(2). Obtenido de: <http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-a162625a-4ae7-4ae3-b06e-a3deb6803b03>
- Krenzlok, E. P., & Royal, M. A. (2012). Confusion: acetaminophen dosing changes based on NO evidence in adults. *Drugs in R&D*, 12(2), 45.
- Lee, W. M. (2008). Acetaminophen-related acute liver failure in the United States. *Hepatology Research*, 38, S3–S8. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2008.00419.x>
- Lee, Y.-S., Kim, H., Brahim, J. S., Rowan, J., Lee, G., & Dionne, R. A. (2007). Acetaminophen selectively suppresses peripheral prostaglandin E2 release and increases COX-2 gene expression in a clinical model of acute inflammation. *PAIN*, 129(3), 279–286. doi:10.1016/j.pain.2006.10.020.
- Livrea, M. A., & Tesoriere, L. (2013). Lipoperoxyl Radical Scavenging and Antioxidative Effects of Red Beet Pigments. En B. Neelwarne (Ed.), *Red Beet Biotechnology* (pp. 105–124). Boston, MA: Springer US. Obtenido de http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-3458-0_6
- Madrigal-Santillán, E., García-Melo, F., Morales-González, J., Vázquez-Alvarado, P., Muñoz-Juárez, S., Zuñiga-Pérez, C., Hernández-Ceruelos, A. (2013). Antioxidant and Anticlastogenic Capacity of Prickly Pear Juice. *Nutrients*, 5(10), 4145–4158. doi:10.3390/nu5104145.

- Malireddy, S., Kotha, S. R., Secor, J. D., Gurney, T. O., Abbott, J. L., Maulik, G., Parinandi, N. L. (2012). Phytochemical Antioxidants Modulate Mammalian Cellular Epigenome: Implications in Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(2), 327–339. doi:10.1089/ars.2012.4600.
- Małolepsza, U., & Urbanek, H. (2000). Plant flavonoids as biochemically active compounds. *Wiadomości Botaniczne*, 44(3/4), 27–37.
- Mancipe, L., Fernández, D. & Fernández, D. (2010). Intoxicación por acetaminofén. *Revista de la Facultad de Medicina*, 18 (2): 221-227.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 17(6), 271–278.
- Mendoza, N. P. (2008). Farmacología medica / Medical Pharmacology. *Ed. Médica Panamericana*. ISBN: 978-968-7988-44-3.
- Miller, E. R., Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R. A., Appel, L. J., & Guallar, E. (2005). Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Annals of Internal Medicine*, 142(1), 37–46.
- Morales, F. J., & Jiménez-Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72(1), 119–125.
- Moreno, R. (2013). Hepatitis fulminante. *Revista de Gastroenterología de México*, 78, 101–102. <http://doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.06.019>
- Moussa-Ayoub, T. E., El-Samahy, S. K., Kroh, L. W., & Rohn, S. (2011). Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulase preparation. *Food Chemistry*, 124(3), 1177–1184. doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.032.
- Moussa-Ayoub, T. E., El-Samahy, S. K., Rohn, S., & Kroh, L. W. (2011). Flavonols, betacyanins content and antioxidant activity of cactus *Opuntia macrorhiza* fruits. *Food Research International*, 44(7), 2169–2174. doi:10.1016/j.foodres.2011.02.014.

- Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., & Fukuyama, H. (2003). Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, *10*(1), 108–116.
- Nagy, P. (2013). Kinetics and Mechanisms of Thiol–Disulfide Exchange Covering Direct Substitution and Thiol Oxidation-Mediated Pathways. *Antioxidants & Redox Signaling*, *18*(13), 1623–1641. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4973>
- Navarro-Núñez, L., Rivera, J., Guerrero, J. A., Martínez, C., Vicente, V., & Lozano, M. L. (2009). Differential effects of quercetin, apigenin and genistein on signalling pathways of protease-activated receptors PAR1 and PAR4 in platelets. *British Journal of Pharmacology*, *158*(6), 1548–1556.
- Nekvapil, T., Kopriva, V., Boudny, V., Hostovsky, M., Dvorak, P., & Malota, L. (2012). Decrease in the Antioxidant Capacity in Beverages Containing Tea Extracts during Storage. *The Scientific World Journal*, *2012*, 1–5. doi:10.1100/2012/361698.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.*, *5*(35), 27986–28006. <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>
- NOM-062-ZOO-1999; Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 22 de agosto de 2001.
- NOM-033-ZOO-1995; Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 16 de julio de 1996.
- Nowak, J. Z. (2013). Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration. *Pharmacological Reports*, *65*(2), 288–304.
- Olaleye, M. T., Akinmoladun, A. C., Ogunboye, A. A., & Akindahunsi, A. A. (2010). Antioxidant activity and hepatoprotective property of leaf extracts of *Boerhaavia diffusa* Linn against acetaminophen-induced liver damage in rats. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(8-9), 2200–2205. doi:10.1016/j.fct.2010.05.047.
- Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2*(5): 270-278.
- Pang, C., Zheng, Z., Shi, L., Sheng, Y., Wei, H., Wang, Z., & Ji, L. (2016). Caffeic acid

- prevents acetaminophen-induced liver injury by activating the Keap1-Nrf2 antioxidative defense system. *Free Radical Biology and Medicine*, 91, 236–246. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.024>
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*, 4(2), 89–96.
- Poljsak, B. (2011). Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 1–15. doi:10.1155/2011/194586.
- Poljsak, Borut, Šuput, D., & Milisav, I. (2013). Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–11. doi:10.1155/2013/956792.
- Pollastri, S., & Tattini, M. (2011). Flavonols: old compounds for old roles. *Annals of Botany*, 108(7), 1225–1233. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr234>
- Prakash Maran, J., Manikandan, S., & Mekala, V. (2013). Modeling and optimization of betalain extraction from *Opuntia ficus-indica* using Box–Behnken design with desirability function. *Industrial Crops and Products*, 49, 304–311. doi:10.1016/j.indcrop.2013.05.012.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*; 26:1231-1237.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
- Reynoso, R. C., Giner, T. V., & de Mejia, E. G. (1999). Safety of a filtrate of fermented garambullo fruit: biotransformation and toxicity studies. *Food and Chemical Toxicology*, 37(8), 825–830.
- Riley, P. A. (1994). Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 65(1), 27–33. <https://doi.org/10.1080/09553009414550041>
- Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., & Russo, G. L. (2012). The flavonoid

- quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. *Biochemical Pharmacology*, 83(1), 6–15. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.08.010>
- Sáenz, C. (2013). Opuntia as a natural resource. En Sáenz, C., Berger, H., Rodríguez-Félix, A., Galletti, L., Corrales-García, L., Sepúlveda, E., Varnero, M. T., García de Cortázar, V., Cuevas-García, R., Arias, E., Mondragón, C., Higuera, I., Rosell, C., Agro-industrial utilization of cactus pear (pp.1-5). Rome, Italy: FAO. E-ISBN: 978-92-5-107987-4.
- Sáenz, C., Tapia, S., Chavez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616–622. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.095.
- Scheinvar, L. (2011). “Estado del conocimiento de las especies del nopal (*Opuntia* spp.) productoras de xonostles silvestres y cultivadas”, Instituto de Biología, UNAM. Obtenido de: http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/centrosOrigen/Opuntia/Informe_Final/Informe%20final%20Opuntia.pdf
- Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Molecular Cell*, 48(2), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>
- Simmons, D. L., Botting, R. M., Robertson, P. M., Madsen, M. L., Vane, J. R. (1999). Induction of an acetaminophen-sensitive cyclooxygenase with reduced sensitivity to nonsteroid antiinflammatory drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 96:3275–80.
- Stadtman, E. R. (2006). Protein oxidation and aging. *Free Radical Research*, 40(12), 1250–1258. <https://doi.org/10.1080/10715760600918142>
- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., ... Felker, P. (2005). Color, Betalain Pattern, and Antioxidant Properties of Cactus Pear (*Opuntia* spp.) Clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 442–451. <http://doi.org/10.1021/jf048751y>
- Strack, D., Vogt, T., & Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62(3), 247–269.

- Sumaya-Martínez, M. T., Cruz-Jaime, S., Madrigal-Santillán, E., García-Paredes, J. D., Cariño-Cortés, R., Cruz-Cansino, N., Alanís-García, E. (2011). Betalain, Acid Ascorbic, Phenolic Contents and Antioxidant Properties of Purple, Red, Yellow and White Cactus Pears. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 6452–6468. doi:10.3390/ijms12106452.
- Szabo, G., & Csak, T. (2012). Inflammasomes in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 57(3), 642–654.
- Terrones, M. C. (2012). Biotransformación de medicamentos y estrés oxidativo. En Jaramillo, F., Rincón, A. & Martínez, M. (1ª edición), *Estrés oxidativo y su impacto en la salud* (pp. 57-70). Aguascalientes, México: *Textos Universitarios*. ISBN: 978-607-8227-95-2.
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65–74.
- van Acker, S. A., de Groot, M. J., van den Berg, D.-J., Tromp, M. N., Donné-Op den Kelder, G., van der Vijgh, W. J., & Bast, A. (1996). A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chemical Research in Toxicology*, 9(8), 1305–1312.
- Vázquez-Medina, J. P., Zenteno-Savín, T., Elsner, R., & Ortiz, R. M. (2012). Coping with physiological oxidative stress: a review of antioxidant strategies in seals. *Journal of Comparative Physiology B*, 182(6), 741–750. doi:10.1007/s00360-012-0652-0.
- Vendemiale, G., Grattagliano, I., Altomare, E., Turturro, N., & Guerrieri, F. (1996). Effect of acetaminophen administration on hepatic glutathione compartmentation and mitochondrial energy metabolism in the rat. *Biochemical Pharmacology*, 52(8), 1147–1154.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126–133.
- Wanasundara, U., Amarowicz & R., Shahidi, F. (1996). Partial characterization of natural antioxidants in canola meal. *Food Research International*, 28(6), 525-530.

- Ward, J. (2012). Plasma microRNA profiles distinguish lethal injury in acetaminophen toxicity: A research study. *World journal of Gastroenterology*, *18*(22), 2798. doi:10.3748/wjg.v18.i22.2798.
- Wu, Y., Wang, F., Zheng, Q., Lu, L., Yao, H., Zhou, C., ... Zhao, Y. (2006). Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Laggera alata* against carbon tetrachloride-induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes and in rats with hepatic damage. *Journal of Biomedical Science*, *13*(4), 569–578. <http://doi.org/10.1007/s11373-006-9081-y>
- Yahia, E. M., & Mondragon-Jacobo, C. (2011). Nutritional components and anti-oxidant capacity of ten cultivars and lines of cactus pear fruit (*Opuntia* spp.). *Food Research International*, *44*(7), 2311–2318. doi:10.1016/j.foodres.2011.02.042.
- Yakovlev, A. G. (2000). A Role of the Ca²⁺/Mg²⁺-dependent Endonuclease in Apoptosis and Its Inhibition by Poly(ADP-ribose) Polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(28), 21302–21308. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001087200>
- Yi, L., Jin, X., Chen, C.-Y., Fu, Y.-J., Zhang, T., Chang, H., ... Mi, M.-T. (2011). Chemical Structures of 4-Oxo-Flavonoids in Relation to Inhibition of Oxidized Low-Density Lipoprotein (LDL)-Induced Vascular Endothelial Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(12), 5471–5489. <https://doi.org/10.3390/ijms12095471>
- Yin, R., Zhang, D., Song, Y., Zhu, B.-Z., & Wang, H. (2013). Potent DNA damage by polyhalogenated quinones and H₂O₂ via a metal-independent and Intercalation-enhanced oxidation mechanism. *Scientific Reports*, *3*. <https://doi.org/10.1038/srep01269>
- Zafra-Rojas, Q. Y., Cruz-Cansino, N., Ramírez-Moreno, E., Delgado-Olivares, L., Villanueva-Sánchez, J., & Alanís-García, E. (2013). Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(5), 1283–1288. doi:10.1016/j.ultsonch.2013.01.021.
- Zamek-Gliszczyński, M. J. (2005). Multiple mechanisms are involved in the biliary excretion of acetaminophen sulfate in the rat: role of MRP2 and BCRP1. *Drug*

Metabolism and Disposition, 33(8), 1158–1165.

<https://doi.org/10.1124/dmd.104.002188>

Zhao, X., Cong, X., Zheng, L., Xu, L., Yin, L., & Peng, J. (2012). Dioscin, a natural steroid saponin, shows remarkable protective effect against acetaminophen-induced liver damage in vitro and in vivo. *Toxicology Letters*, 214(1), 69–80. doi:10.1016/j.toxlet.2012.08.005.

Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*; 64:555-559.

Zou, D., Brewer, M., Garcia, F., Feugang, J. M., Wang, J., Zang, R., ... Zou, C. (2005). Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition Journal*, 4(1), 25.

ANEXO A



GPT (ALT)

GPT (ALT)

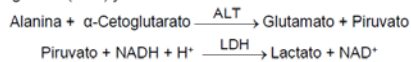
NADH. Cinético UV. IFCC rec.

Determinación cuantitativa de alanina aminotransferasa GPT (ALT) IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La alanina aminotransferasa (ALT) inicialmente llamada transaminasa glutámico pirúvica (GPT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra ensayada¹.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La ALT es una enzima intracelular, se encuentra principalmente en las células del hígado y el riñón. Su mejor aplicación es en el diagnóstico de las enfermedades del hígado. Se observan niveles elevados en enfermedades hepáticas como la hepatitis, enfermedades de los músculos y traumatismos. Cuando se emplean en conjunción con la AST ayuda en el diagnóstico de infartos de miocardio, ya que el valor de la ALT se mantiene dentro de los límites normales y aumenta en los niveles de AST^{1,4,5}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	TRIS pH 7,8	100 mmol/L
Tampón	L-Alanina	500 mmol/L
R 2	NADH	0,18 mmol/L
Substrato	Lactato deshidrogenasa (LDH)	1200 U/L
	α -Cetoglutarato	15 mmol/L

PREPARACIÓN

Reactivo de trabajo (RT):
 Ref: 1001170 Disolver (→) un comprimido de R2 Substrato en un vial de R1.
 Ref: 1001171 Disolver (→) un comprimido de R2 Substrato en 15 mL de R1.
 Ref: 1001172 Disolver (→) un comprimido de R2 Substrato en 50 mL de R1.
 Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.
 Estabilidad: 21 días a 2-8°C o 72 horas a temperatura ambiente (15-25°C).

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar las tabletas si aparecen fragmentadas. No usar reactivos fuera de la fecha indicada. **Indicadores de deterioro de los reactivos:**
 - Presencia de partículas y turbidez.
 - Absorbancia del Blanco a 340 nm < 1,00.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 340 nm.
- Baño termostabilizable a 25°C, 30°C ó 37°C (\pm 0,1°C)
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma¹. Estabilidad de la muestra: 7 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
 Longitud de onda: 340 nm
 Cubeta: 1 cm paso de luz
 Temperatura constante: 25°C / 30°C / 37°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.
- Pipetear en una cubeta:

RT (mL)	1,0
Muestra (μ L)	100
- Mezclar, incubar 1 minuto.

- Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronometro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.
- Calcular el promedio de la diferencia de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

CÁLCULOS

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de ALT}$$

Unidades: La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μ mol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

Factores de conversión de temperaturas

Los resultados pueden transformarse a otras temperaturas multiplicando por:

Temperatura de medición	Factor para convertir a		
	25°C	30°C	37°C
25°C	1,00	1,32	1,82
30°C	0,76	1,00	1,39
37°C	0,55	0,72	1,00

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210). Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica. Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA^{4,5}

	25°C	30°C	37°C
Hombres	Hasta 22 U/L	29 U/L	40 U/L
Mujeres	Hasta 18 U/L	22 U/L	32 U/L

En recién nacidos normales se han descrito valores de referencia hasta el doble del de los adultos, debido a su inmadurez hepática, estos valores se normalizan aproximadamente a los tres meses. Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el *límite de detección* 0 U/L hasta el *límite de linealidad* 400 U/L.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/10 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 10.

Precisión:

Media (U/L)	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
	42	112	41	111
SD	0,47	0,96	0,79	2,21
CV (%)	1,12	0,85	1,90	1,98

Sensibilidad analítica: 1 U/L = 0,000503 ΔA / min.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x). Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:
 Coeficiente de regresión (r^2): 0,9869.

Ecuación de la recta de regresión: $y = 1,0589x - 0,6075$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Los anticoagulantes de uso corriente como la heparina, EDTA oxalato o fluoruro no afectan los resultados. La hemólisis interfiere con la determinación¹. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la ALT^{2,3}.

NOTAS

SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Murray R. Alanine aminotransferase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1088-1090.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACCC 2001.
- Burtis A. et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd edition. AACCC 1999.
- Tietz N. W. et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACCC 1995.

PRESENTACIÓN

Ref: 1001170	Cont.	R1: 20 x 2 mL, R2: 20 → 2 mL
Ref: 1001171		R1: 1 x 150 mL, R2: 10 → 15 mL
Ref: 1001172		R1: 10 x 50 mL, R2: 10 → 50 mL

ANEXO B



GOT (AST)

GOT (AST)

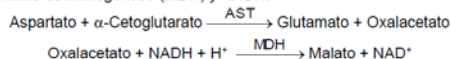
NADH. Cinético UV. IFCC rec.

Determinación cuantitativa de aspartato aminotransferasa GOT (AST) IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La aspartato aminotransferasa (AST) inicialmente llamada transaminasa glutamato oxaloacética (GOT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra ensayada¹.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La AST es una enzima intracelular, se encuentra en niveles altos en el músculo del corazón, las células del hígado, las células del músculo esquelético y en menor cantidad en otros tejidos.

Aunque un nivel elevado de AST en suero no es específico de enfermedad hepática se emplea principalmente para su diagnóstico y seguimiento, junto con otras enzimas como la ALT y ALP. También se utiliza en el control post-infarto, en pacientes con desordenes del músculo esquelético, y en otras afecciones^{1,4,5}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	TRIS pH 7,8	80 mmol/L
Tampón	L-Aspartato	200 mmol/L
R 2	NADH	0,18 mmol/L
Substrato	Lactato deshidrogenasa (LDH)	800 U/L
	Malato deshidrogenasa (MDH)	600 U/L
	α -Cetoglutarato	12 mmol/L

PREPARACIÓN

Reactivo de trabajo (RT):

Ref: 1001160 Disolver (→) un comprimido de R2 Substrato en un vial de R1.

Ref: 1001161 Disolver (→) un comprimido de R2 Substrato en 15 mL de R1.

Ref: 1001162 Disolver (→) un comprimido de R2 Substrato en 50 mL de R1.

Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

Estabilidad: 21 días a 2-8°C o 72 horas a temperatura ambiente (15-25°C).

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

No usar las tabletas si aparecen fragmentadas.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia del Blanco a 340 nm < 1,00.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 340 nm.
- Baño termostabilizable a 25°C, 30°C ó 37°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$)
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma¹. Estabilidad de la muestra: 7 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda:340 nm
Cubeta:1 cm paso de luz
Temperatura constante:25°C / 30°C / 37°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.
- Pipetear en una cubeta:

RT (mL)	1,0
Muestra (μL)	100
- Mezclar, incubar 1 minuto.

- Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronometro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.
- Calcular el promedio del incremento de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

CÁLCULOS

$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de AST}$

Unidades: La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

Factores de conversión de temperaturas

Los resultados pueden transformarse a otras temperaturas multiplicando por:

Temperatura de medición	Factor para convertir a		
	25°C	30°C	37°C
25°C	1,00	1,37	2,08
30°C	0,73	1,00	1,54
37°C	0,48	0,65	1,00

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA¹

	25°C	30°C	37°C
Hombres	Hasta 19 U/L	26 U/L	38 U/L
Mujeres	Hasta 16 U/L	22 U/L	31 U/L

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección 0 U/L hasta el límite de linealidad 360 U/L.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/10 con CINA 9 g/L y multiplicar el resultado final por 10.

Precisión:

	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
Media (U/L)	55,5	165	55,0	162
SD	1,30	3,44	0,92	2,52
CV (%)	2,35	2,07	1,68	1,55

Sensibilidad analítica: 1 U/L = 0,00051 $\Delta A/\text{min}$.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de regresión (r^2): 0,98277.

Ecuación de la recta de regresión: $y = 0,9259x - 5,1685$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Los anticoagulantes de uso corriente como la heparina, EDTA oxalato o fluoruro no afectan los resultados. La hemólisis interfiere con la determinación¹.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la AST^{2,3}.

NOTAS

SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFÍA

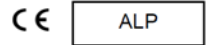
- Murray R. Aspartate aminotransferase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 1112-116.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTACION

Ref: 1001160	Cont.	R1: 20 x 2 mL, R2: 20 → 2 mL
Ref: 1001161		R1: 1 x 150 mL, R2: 10 → 15 mL
Ref: 1001162		R1: 10 x 50 mL, R2: 10 → 50 mL



ANEXO C



Fosfatasa alcalina p-Nitrofenilfosfato. Cinético. DGKC

Determinación cuantitativa de fosfatasa alcalina (FAL) IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La fosfatasa alcalina (FAL) cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato (pNPP) a pH 10,4 liberando p-nitrofenol y fosfato, según la siguiente reacción:



La velocidad de formación del p-Nitrofenol, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

Las fosfatasas alcalinas son enzimas que se encuentran presentes en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón.

Tanto el aumento como la disminución de los niveles en plasma, tienen significado clínico.

Causas más probables de aumento del nivel de FAL:

Enfermedad ósea de Paget, obstrucciones hepáticas, hepatitis, hepatotoxicidad por medicamentos y osteomalacia.

Causas más probables de disminución del nivel de FAL:

Cretenismo y déficit de vitamina C^{1,5,6}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	Dietanolamina (DEA) pH 10,4	1 mmol/L
Tampón	Cloruro de magnesio	0,5 mmol/L
R 2	p-Nitrofenilfosfato (pNPP)	10 mmol/L
Substrato		

PREPARACIÓN

Reactivo de trabajo (RT):

Ref: 1001130

Disolver (→) un comprimido de R 2 Substrato en un vial de R 1 Tampón.

Ref: 1001131

Disolver (→) un comprimido de R 2 Substrato en 15 mL de R 1 Tampón.

Ref: 1001132

Disolver (→) el contenido de un vial de R 2 Substrato en 50 mL de R 1.

Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

Estabilidad: 21 días a 2-8°C o 5 días a temperatura ambiente (15-25°C).

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

No usar las tabletas si aparecen fragmentadas.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancias del Blanco a 405 nm \geq 1,30.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 405 nm.
- Baño termostatable a 25°C, 30°C ó 37°C (\pm 0,1°C)
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma heparinizado¹.

Suero libre de hemólisis, separado de los hematíes lo antes posible.

Estabilidad: 3 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: 405 nm
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura constante 25°C / 30°C / 37°C

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.

3. Pipetear en una cubeta:

RT (mL)	1,2
Muestra (μ L)	20

4. Mezclar, incubar 1 minuto.

5. Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronometro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.
6. Calcular el promedio del incremento de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

CÁLCULOS

$\Delta A/\text{min} \times 3300 = \text{U/L de FAL}$

Unidades: La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μ mol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

Factores de conversión de temperaturas

Los resultados pueden transformarse a otras temperaturas multiplicando por:

Temperatura de medición	Factor para convertir a		
	25°C	30°C	37°C
25°C	1,00	1,22	1,64
30°C	0,82	1,00	1,33
37°C	0,61	0,75	1,00

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA¹

	25°C	30°C	37°C
Niños (1-14 años)	< 400 U/L	< 480 U/L	< 645 U/L
Adultos	60 -170 U/L	73 -207 U/L	98 -279 U/L

Factores que pueden afectar los valores de referencia son: ejercicio, períodos de crecimiento en niños y embarazo.

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección 0,000 U/L hasta el límite de linealidad 1200 U/L.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/10 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 10.

Precisión:

	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
Media (U/L)	167	424	166	430
SD	0,94	1,93	3,44	5,92
CV (%)	0,56	0,46	2,07	1,38

Sensibilidad analítica: 1 U/L = 0,0003 $\Delta A/\text{min}$.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,999.

Ecuación de la recta de regresión: $y=0,999x - 0,918$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

El fluoruro, oxalato, citrato y EDTA inhiben la actividad de la fosfatasa alcalina, por lo que no deben ser utilizados como anticoagulantes.

La hemólisis interfiere debido a la elevada concentración de fosfatasa alcalina en los hematíes^{1,2}. Se han descrito varias drogas y otras substancias que interfieren en la determinación de la fosfatasa alcalina^{3,4}.

NOTAS

SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wenger C. et al. Alkaline phosphatase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1094-1098.
2. Rosalki S et al. Clin Chem 1993; 39/4: 648-652.
3. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
4. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
5. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
6. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTACIÓN

Ref: 1001130		R1: 20 x 3 mL , R2: 20 → 3 mL
Ref: 1001131	Cont.	R1: 1 x 150 mL, R2: 10 → 15 mL
Ref: 1001132		R1: 10 x 50 mL, R2: 10 → 50 mL



ANEXO D

ambion | RNA
by *Life* technologies™

TRIzol® Reagent

[Learn More](#)

Catalog Numbers

15596-026
15596-018

Quantity

100 mL [Buy Now](#)
200 mL [Buy Now](#)

Store at 2°C to 25°C

Description

TRIzol® Reagent is a ready-to-use reagent, designed to isolate high quality total RNA (as well as DNA and proteins) from cell and tissue samples of human, animal, plant, yeast, or bacterial origin, within one hour. TRIzol® Reagent is a monophasic solution of phenol, guanidine isothiocyanate, and other proprietary components which facilitate the isolation of a variety of RNA species of large or small molecular size. TRIzol® Reagent maintains the integrity of the RNA due to highly effective inhibition of RNase activity while disrupting cells and dissolving cell components during sample homogenization. TRIzol® Reagent allows for simultaneous processing of a large number of samples, and is an improvement to the single-step RNA isolation method developed by Chomczynski and Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987).

TRIzol® Reagent allows the user to perform sequential precipitation of RNA, DNA, and proteins from a single sample (Chomczynski, 1993). After homogenizing the sample with TRIzol® Reagent, chloroform is added, and the homogenate is allowed to separate into a clear upper aqueous layer (containing RNA), an interphase, and a red lower organic layer (containing the DNA and proteins). RNA is precipitated from the aqueous layer with isopropanol. DNA is precipitated from the interphase/organic layer with ethanol. Protein is precipitated from the phenol-ethanol supernatant by isopropanol precipitation. The precipitated RNA, DNA, or protein is washed to remove impurities, and then resuspended for use in downstream applications.

- Isolated RNA can be used in RT-PCR, Northern Blot analysis, Dot Blot hybridization, poly(A)+ selection, *in vitro* translation, RNase protection assay, and molecular cloning.
- Isolated DNA can be used in PCR, Restriction Enzyme digestion, and Southern Blots.
- Isolated protein can be used for Western Blots, recovery of some enzymatic activity, and some immunoprecipitation.

Caution

TRIzol® Reagent contains phenol (toxic and corrosive) and guanidine isothiocyanate (an irritant), and may be a health hazard if not handled properly. Always work with TRIzol® Reagent in a fume hood, and always wear a lab coat, gloves and safety glasses. Contact your Environmental Health and Safety (EH&S) department for proper work and disposal guidelines. Avoid direct contact with TRIzol® Reagent, because **contact to skin, eyes, or respiratory tract may cause chemical burns** to the exposed area. **If contact to skin or eyes occurs, immediately** wash the exposed area with copious amounts of water for 15 minutes and seek medical attention if necessary. If you inhale vapors, move to fresh air and seek medical attention if necessary. For more information, refer to the TRIzol® Reagent SDS (Safety Data Sheet), available from our web site at www.lifetechnologies.com/support.

Contents and Storage

TRIzol® Reagent is supplied in 100 mL (Cat. no. 15596-026) or 200 mL (Cat. no. 15596-018) volumes, and shipped at room temperature. Upon receipt, store TRIzol® Reagent at room temperature. TRIzol® Reagent is stable for 12 months when properly stored.

Intended Use

For research use only. Not intended for human or animal diagnostic or therapeutic uses.

Materials Needed

The following additional materials are needed, but not supplied for the isolation of RNA, DNA or proteins.

RNA Isolation	DNA Isolation	Protein Isolation
<ul style="list-style-type: none">• Chloroform• Isopropyl alcohol• 75% ethanol (in DEPC-treated water)• RNase-free water or 0.5% SDS• Centrifuge and rotor capable of reaching up to 12,000 × g• Polypropylene microcentrifuge tubes• Water bath or heat block (55–60°C)	<ul style="list-style-type: none">• Chloroform• 100% ethanol• 75% ethanol• 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol• 8 mM NaOH• Centrifuge and rotor capable of reaching up to 12,000 × g• Polypropylene microcentrifuge tubes	<ul style="list-style-type: none">• Chloroform• Isopropyl alcohol• 100% ethanol• 0.3 M Guanidine hydrochloride in 95% ethanol• 1% SDS• Centrifuge and rotor capable of reaching up to 12,000 × g• Polypropylene microcentrifuge tubes

Preparing Samples

Homogenizing samples

- Determine your sample type, and perform homogenization at room temperature according to the table below. The sample volume should not exceed 10% of the volume of TRIzol® Reagent used for homogenization. Be sure to use the indicated amount of TRIzol® Reagent, because an insufficient volume can result in DNA contamination of isolated RNA.

Sample Type	Action
Tissues	<ol style="list-style-type: none"> Add 1 mL TRIzol® Reagent per 50–100 mg of tissue sample. Homogenize sample using a glass-Teflon® or power homogenizer. Note: Process or freeze tissue samples <i>immediately</i> upon collection.
Adherent Cells (Monolayer)	<ol style="list-style-type: none"> Remove growth media from culture dish. Add 1 mL TRIzol® Reagent directly to the cells in the culture dish per 10 cm² of culture dish surface area. Note: Add 1 mL TRIzol® Reagent for a 35 mm dish, 3 mL for a 60 mm dish, and 8 mL for a 100 mm dish. Lyse the cells directly in the culture dish by pipetting the cells up and down several times.
Suspension Cells	<ol style="list-style-type: none"> Harvest cells by centrifugation and remove media. Add 0.75 mL of TRIzol® Reagent per 0.25 mL of sample (5–10 × 10⁶ cells from animal, plant or yeast origin, or 1 × 10⁷ cells of bacterial origin). Note: Do not wash cells before addition of TRIzol® Reagent to avoid increased chance of mRNA degradation. Lyse cells in sample by pipetting up and down several times. Disruption of some yeast and bacterial cells may require the use of a homogenizer.

- (Optional) When preparing samples with high content of fat, proteins, polysaccharides, or extracellular material (e.g., muscle, fat tissue, or tuberous plant material), an additional isolation step may be required to remove insoluble material from the samples.

Note: Do not perform this additional isolation step if you are performing subsequent DNA isolation on your sample.

Sample Type	Notes
Tissue or cells with high content of fat, protein, polysaccharide, or extracellular material	<ol style="list-style-type: none"> Following homogenization, centrifuge your sample at 12,000 × g for 10 minutes at 4°C. Note: The resulting pellet contains ECM, polysaccharides, and high molecular weight DNA, while the supernatant contains the RNA. In high fat content samples, a layer of fat collects above the supernatant. Remove and discard the fatty layer. Transfer the cleared supernatant to a new tube.

- Proceed to **Phase separation**, or store the homogenized sample. Homogenized samples can be stored at room temperature for several hours, or at –60 to –70°C for at least one month.

Phase separation

- Incubate the homogenized sample (see **Homogenizing samples**) for 5 minutes at room temperature to permit complete dissociation of the nucleoprotein complex.
- Add 0.2 mL of chloroform per 1 mL of TRIzol® Reagent used for homogenization. Cap the tube securely.
- Shake tube vigorously by hand for 15 seconds.
- Incubate for 2–3 minutes at room temperature.
- Centrifuge the sample at 12,000 × g for 15 minutes at 4°C.
Note: The mixture separates into a lower red phenol-chloroform phase, an interphase, and a colorless upper aqueous phase. *RNA remains exclusively in the aqueous phase.* The upper aqueous phase is ~50% of the total volume.
- Remove the aqueous phase of the sample by angling the tube at 45° and pipetting the solution out. Avoid drawing any of the interphase or organic layer into the pipette when removing the aqueous phase.
- Place the aqueous phase into a **new** tube and proceed to the **RNA Isolation Procedure**.
- Save the interphase and organic phenol-chloroform phase if isolation of DNA or protein is desired. See **DNA Isolation Procedure** and **Protein Isolation Procedure** for details. The organic phase can be stored at 4°C overnight.

RNA Isolation Procedure

Always use the appropriate precautions to avoid RNase contamination when preparing and handling RNA.

RNA precipitation

- (Optional) When precipitating RNA from small sample quantities (<10⁶ cells or <10 mg tissue), add 5–10 µg of RNase-free glycogen as a carrier to the aqueous phase.
Note: Glycogen is co-precipitated with the RNA, but does not inhibit first-strand synthesis at concentrations ≤4 mg/mL, and does not inhibit PCR.
- Add 0.5 mL of 100% isopropanol to the aqueous phase, per 1 mL of TRIzol® Reagent used for homogenization.
- Incubate at room temperature for 10 minutes.
- Centrifuge at 12,000 × g for 10 minutes at 4°C.
Note: The RNA is often invisible prior to centrifugation, and forms a gel-like pellet on the side and bottom of the tube.
- Proceed to **RNA wash**.

RNA wash

- Remove the supernatant from the tube, leaving only the RNA pellet.
- Wash the pellet, with 1 mL of 75% ethanol per 1 mL of TRIzol® Reagent used in the initial homogenization.
Note: The RNA can be stored in 75% ethanol at least 1 year at –20°C, or at least 1 week at 4°C.
- Vortex the sample briefly, then centrifuge the tube at 7500 × g for 5 minutes at 4°C. Discard the wash.
- Vacuum or air dry the RNA pellet for 5–10 minutes. Do not dry the pellet by vacuum centrifuge.
Note: Do not allow the RNA to dry completely, because the pellet can lose solubility. Partially dissolved RNA samples have an A_{260/280} ratio <1.6.
- Proceed to **RNA resuspension**.

RNA resuspension

1. Resuspend the RNA pellet in RNase-free water or 0.5% SDS solution (20–50 µL) by passing the solution up and down several times through a pipette tip.
Note: Do not dissolve the RNA in 0.5% SDS if it is to be used in subsequent enzymatic reactions.
2. Incubate in a water bath or heat block set at 55–60°C for 10–15 minutes.
3. Proceed to downstream application, or store at –70°C.

DNA Isolation Procedure

DNA is isolated from the interphase and phenol-chloroform layer saved from the **Phase separation** step.

DNA precipitation

1. Remove any remaining aqueous phase overlying the interphase. This is critical for the quality of the isolated DNA.
2. Add 0.3 mL of 100% ethanol per of 1 mL TRIzol® Reagent used for the initial homogenization.
3. Cap the tube and invert the sample several times to mix.
4. Incubate samples for 2–3 minutes at room temperature.
5. Centrifuge the tube at 2000 × g for 5 minutes at 4°C to pellet the DNA.
6. Remove the phenol-ethanol supernatant and save it in a new tube if protein isolation is desired. The supernatant can be stored at –70°C for several months.
7. Proceed with the **DNA wash** step using the DNA pellet.

DNA wash

1. Wash the DNA pellet with 1 mL of sodium citrate/ ethanol solution (0.1 M sodium citrate in 10% ethanol, pH 8.5) per 1 mL of TRIzol® Reagent used for the initial homogenization.
2. Incubate for 30 minutes at room temperature. Mix occasionally by gentle inversion.
Note: The DNA can be stored in sodium citrate/ethanol solution at least 2 hours.
3. Centrifuge at 2000 × g for 5 minutes at 4°C. Remove and discard supernatant.
4. Repeat wash (steps 1–3), once.
Note: Repeat wash twice for large DNA pellets (>200 µg).
5. Add 1.5–2 mL 75% ethanol per 1 mL of TRIzol® Reagent used for the initial homogenization.
Note: DNA samples may be stored in 75% ethanol at 4°C for several months.
6. Incubate for 10–20 minutes at room temperature. Mix the tube occasionally by gentle inversion.
7. Centrifuge at 2000 × g for 5 minutes at 4°C. Remove and discard supernatant.
8. Air or vacuum dry the DNA pellet for 5–10 minutes. Do not allow the pellet to dry out. Do not dry the pellet by vacuum centrifuge.
9. Proceed to the **DNA resuspension** step.

DNA resuspension

Resuspend the DNA in 8mM NaOH at a concentration of 0.2–0.3 µg/µL.

1. Add 0.3–0.6 mL of 8mM NaOH per 50–70 mg of tissue, or per 1 × 10⁷ cells.
Note: Resuspending the DNA in a mild base is highly recommended because isolated DNA does not resuspend well in water or Tris buffer.
2. Remove any insoluble material by centrifuging the sample at 12,000 × g for 10 minutes at 4°C.
3. Transfer the supernatant containing the DNA to a **new** tube. Adjust pH as needed with HEPES and proceed to downstream application of choice. The DNA can be stored overnight at 4°C, but for long-term storage adjust to pH 7–8 with HEPES, and add 1 mM EDTA. Store at 4°C or –20°C.

Determining Yield of RNA and DNA

Use absorbance of RNA and DNA at 260 nm and 280 nm to determine concentration.

Sample	Procedure
RNA	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dilute sample in RNase-free water, and measure absorbance at 260 nm and 280 nm. 2. Use the formula $A_{260} \times \text{dilution} \times 40 = \mu\text{g RNA/mL}$ to determine concentration.
DNA	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dilute sample in water or buffer (pH >7.5), and measure absorbance at 260 nm and 280 nm. 2. Use the formula $A_{260} \times \text{dilution} \times 50 = \mu\text{g DNA/mL}$ to determine concentration.

Expected yields

The table below presents typical yields of RNA ($A_{260/280}$ of >1.8) and DNA ($A_{260/280}$ of 1.6–1.8) from various starting materials.

Starting Material	Quantity	RNA	DNA
Epithelial Cells	1 × 10 ⁶ cells	8–15 µg	—
New Tobacco Leaf	—	73 µg	—
Fibroblasts	1 × 10 ⁶ cells	5–7 µg	5–7 µg
Cultured cells, mammal	1 × 10 ⁶	—	5–7 µg
Skeletal muscles and brain	1 mg	1–1.5 µg	2–3 µg
Placenta	1 mg	1–4 µg	2–3 µg
Liver	1 mg	6–10 µg	3–4 µg
Kidney	—	3–4 µg	3–4 µg

Protein Isolation Procedure

Proteins are isolated from the phenol-ethanol supernatant layer left over after the **DNA precipitation** step. Isolate the protein using either **Protein precipitation** OR **Protein dialysis**.

Protein precipitation

1. Add 1.5 mL of isopropanol to the phenol-ethanol supernatant per of 1 mL TRIzol® Reagent used for the initial homogenization.
2. Incubate samples for 10 minutes at room temperature.
3. Centrifuge at 12,000 × g for 10 minutes at 4°C to pellet the protein. Remove and discard the supernatant.
4. Proceed to the **Protein wash** step with the remaining protein pellet.

Protein wash

1. Prepare a wash solution consisting of 0.3 M guanidine hydrochloride in 95% ethanol.
2. Wash the protein pellet with 2 mL of the wash solution per 1 mL of TRIzol[®] Reagent used for the initial homogenization.
3. Incubate for 20 minutes at room temperature.
Note: Protein samples may be stored in 0.3 M guanidine hydrochloride-95% ethanol for at least one month at 4°C or for at least one year at -20°C.
4. Centrifuge at 7500 × g for 5 minutes at 4°C. Remove and discard the wash solution.
5. Repeat steps 2–4, two more times.
6. Add 2 mL of 100% ethanol to protein pellet after the third wash and vortex.
7. Incubate for 20 minutes at room temperature.
8. Centrifuge at 7500 × g for 5 minutes at 4°C. Remove and discard ethanol wash.
9. Air dry the protein pellet for 5–10 minutes. Do not allow the pellet to dry out.
10. Proceed to the **Protein resuspension** step.

Protein resuspension

1. Add 1% SDS to the protein pellet (200 µL) and pipet up and down until the protein is resuspend.
Note: To completely dissolve the protein pellet, you may need to incubate the sample at 50°C in a water bath or heat block.
2. Centrifuge at 10,000 × g for 10 minutes at 4°C to sediment any insoluble material.
3. Transfer the supernatant containing the protein to a new tube and proceed to downstream application of choice, or store the sample at -20°C.

Protein resuspension, continued

Poor solubility of the pellet in SDS can occur, because the solubility of specific classes of proteins differs with different solvents. If the protein pellet is insoluble in SDS, the following alternative solvents (Hummon et. al., 2007) may be required to solubilize the pellet:

- 1% SDS and 62.5 mM sarkosyl at pH 8.0–8.8
- 9.5 M urea and 2% CHAPS, pH 9.1
- 250mM glycerol, 10mM TEA, and 4% CHAPS
- 2% diethylamine
- 10M Urea

Protein dialysis

1. Load the phenol-ethanol supernatant into the dialysis membrane.
Note: The phenol-ethanol solution can dissolve some types of dialysis membranes (e.g., cellulose ester). Test dialysis tubing with the membrane to assess compatibility before starting.
2. Dialyze the sample against 3 changes of 0.1% SDS at 4°C. Make the first change of solution after 16 hours, the second change 4 hours later (at 20 hours), and the final change 2 hours later (at 22 hours).
Note: 0.1% SDS is required to resolubilize the proteins from the pellet; a lower concentration of SDS is insufficient. If desired, the SDS can be diluted after solubilization.
3. Centrifuge the dialysate at 10,000 × g for 10 minutes at 4°C. Proteins are located in the clear supernatant.
4. Transfer supernatant to a new tube and proceed to downstream application, or store the sample at -20°C.
5. (Optional) Solubilize the pellet by adding 100 µL of 1% SDS and 100 µL of 8 M urea.

Determining Yield of Protein

Measure protein concentration by Bradford assay (SDS concentration must be <0.1%).

Troubleshooting

Problem	Cause	Solution
Low yield of RNA, Low yield of DNA, or Low yield of protein	<ul style="list-style-type: none"> • Incomplete homogenization or lysis of samples • Final RNA, DNA or protein pellet was incompletely redissolved 	<ul style="list-style-type: none"> • Decrease the amount of starting material. Mince tissues into smaller pieces and make sure it is completely immersed in TRIzol[®] Reagent for optimal lysis. • Increase the solubilization rate by pipetting the sample repeatedly, and heat the sample to 50–60°C.
RNA is degraded, DNA is degraded, or Protein is degraded.	<ul style="list-style-type: none"> • Samples were not immediately processed or frozen after collection. • Isolated RNA, DNA, or protein preparations were stored at the incorrect temperature. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sample must be processed or frozen immediately after collection. • Store RNA samples at -60 to -70°C. Store DNA and protein samples at -20°C.
RNA contamination or DNA contamination	<ul style="list-style-type: none"> • Interphase/organic phase pipetted up with aqueous phase. • Incomplete removal of aqueous phase • DNA pellet insufficiently washed with 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol 	<ul style="list-style-type: none"> • Do not attempt to draw off the entire aqueous layer after phase separation. • Remove remnants of the aqueous phase prior to DNA precipitation. • Make sure pellet is washed with 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol.
Low A _{260/280} for RNA	<ul style="list-style-type: none"> • Sample was homogenized in an insufficient volume of TRIzol[®] Reagent • Incomplete removal of organic phase 	<ul style="list-style-type: none"> • Add the appropriate amount of TRIzol[®] Reagent for your sample type (see Homogenizing samples). • Do not attempt to draw off the entire aqueous layer after phase separation.
Low A _{260/280} for DNA	Phenol was not sufficiently removed from the DNA preparation	Wash the DNA pellet one additional time in 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol.

References

Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532-537
 Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159
 Hummon, A. B., Lim S. R., Difiilippantonio, M. J., Ried, T. (2007) Isolation and solubilization of proteins after TRIzol[®] extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques* 42, 467-472

Limited Use Label License No. 358: Research Use Only: The purchase of this product conveys to the purchaser the limited, non-transferable right to use the purchased amount of the product only to perform internal research for the sole benefit of the purchaser. No right to resell this product or any of its components is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for internal research purposes only and is not for use in commercial services of any kind, including, without limitation, reporting the results of purchaser's activities for a fee or other form of consideration. For information on obtaining additional rights, please contact outlicensing@lifetech.com or Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.
 ©2010 Life Technologies Corporation. All rights reserved. The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.
 TRIzol[®] is a registered trademark of Molecular Research Center, Inc.

ANEXO E

Oligonucleotidos utilizados para RT-PCR cuantitativo.

	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Probe 5'-3'
18S	CGGCTACCACATCC AAGGA	CCAATTACAGGGC CTCGAAA	CGCGCAAATTACCCAC TCCCGA
CYP2E1	GTGACTGACTGTCT CCTCATAGAGATG	GTCGGCCAAAGTC ACAGAAAC	AGAAGGAAAAACACAG CCAAGAACCCATG
Catalase	GGATTATGGCCTCC GAGATCT	ACCTTGGTTCAGGT CAAATGGAT	ATGCCATCGCCAGTGG CAATTACC
GPx	GGACATCAGGAGAA TGGCAAGA	CGCACTTCTCAAA CAATGTAAAGTTG	TTCCCTCAAGTATGTCC GACCCGGTG
CuZn SOD (SOD1)	CAGGACCTCATTTT AATCCTCACTC	GTCTCCAACATGC CTCTCTCA	CCGCTGGACCGCCATG TTTCTT
MnSOD (SOD2)	CACCGAGGAGAAGT ACCACGA	GAAC TTCAGTGCA GGCTGAAGA	CCTGAGTTGTAACATCT CCCTTGGCCAG

ANEXO F

SIGMA-ALDRICH PERIODIC ACID-SCHIFF (PAS) STAINING SYSTEM (Procedure No. 395)

INTENDED USE

The PAS staining system offers standard and microwave procedures for the demonstration of lymphocytes and mucopolysaccharides. The staining pattern of the lymphocytes are helpful in making therapeutic decisions in established cases of lymphocytic leukemia. The PAS reaction in tissue sections is useful for the demonstration of mucopolysaccharides. The Diastase (α -amylase) digestion procedure, followed by the PAS stain is useful as an aid in the diagnosis of glycogen storage disease. Periodic Acid Schiff (PAS) reagents are for "In Vitro Diagnostic Use".

The PAS staining procedure may also be used for the demonstration of fungal organisms in tissue sections.²

When treated with periodic acid, glycols are oxidized to aldehydes. After reaction with Schiff's reagent (a mixture of pararosaniline and sodium metabisulfite), a pararosaniline adduct is released that stains the glycol-containing cellular components.¹ This reaction can be performed on blood or bone marrow films, tissue touch preparations or tissue sections.^{2,3} When used on blood or bone marrow films, this test may be helpful in recognizing some cases of erythroleukemia and acute lymphoblastic leukemia.⁴

Diastase (α -amylase) digestion may be employed as an aid in the diagnosis of glycogen storage disease. Diastase hydrolyzes starch, glycogen and degradation products originating in these polysaccharides present in tissue. The resultant by-products of the digestion process are rinsed away prior to PAS staining.⁵

A technique for rapid PAS staining using microwave ovens is included.^{6,8}

REAGENTS

PERIODIC ACID SOLUTION, Catalog No. 3951-100 ml
Periodic acid, 1 g/dl.

SCHIFF'S REAGENT, Catalog No. 3952-50 ml
Pararosaniline HCl, 1%, and sodium metabisulfite, 4%, in hydrochloric acid, 0.25 mol/l.

HEMATOXYLIN SOLUTION, GILL NO. 3, Catalog No. GHS3-100 ml
Certified hematoxylin, 6 g/l, sodium iodate, 0.6 g/l, aluminum sulfate, 52.8 g/l and stabilizer.

STORAGE AND STABILITY:

Store Periodic Acid Solution, and Schiff's Reagent in refrigerator (2–8°C). Store Hematoxylin Solution, Gill No. 3 at room temperature (18–26°C). Reagents are stable until expiration date shown on labels. Formation of a precipitate in Schiff's Reagent does not affect performance.

DETERIORATION:

Discard Hematoxylin Solution, Gill No. 3, if solution turns brown (over oxidized from air) or purple (loss of acidity) or when time required for suitable staining exceeds the time recommended in the procedure by more than 5 minutes.

PREPARATION:

Periodic Acid Solution, Schiff's Reagent and Hematoxylin Solution, Gill No. 3 are supplied ready to use. Warm reagents to room temperature (18–26°C) before use.

Scott's Tap Water Substitute is prepared by diluting 1 part of Scott's Tap Water Substitute Concentrate with 9 parts deionized water.

Formalin-Ethanol Fixative Solution is prepared by mixing 5 ml of formaldehyde with 45 ml of 95% ethanol (Reagent Alcohol). Prepare fresh daily and keep tightly capped.

PRECAUTIONS:

Normal precautions exercised in handling laboratory reagents should be followed. Dispose of waste observing all local, state, provincial or national regulations. Refer to Material Safety Data Sheet and product labeling for any updated risk, hazard or safety information.

PAS TISSUE-TROL™ control slides are paraffin embedded human tissue containing PAS and should be considered potentially infectious.

PROCEDURE

SPECIMEN COLLECTION:

It is recommended that specimen collection be carried out in accordance with CLSI document M29-A3. No known test method can offer complete assurance that blood samples or tissue will not transmit infection. Therefore, all blood derivatives or tissue specimens should be considered potentially infectious.

Freshly prepared whole, EDTA or heparinized blood or bone marrow films are used. Fix as soon as possible.⁴

For polysaccharides, tissue fixed in 10% neutral buffered formalin, Zenker's or Bouin's may be used.² It should be noted that some carbohydrates are water soluble.³ For the demonstration of glycogen, Carmoy's fluid, Gendie's fluid or acid alcoholic formalin are recommended.² Time required for diastase extraction may be prolonged when tissue is fixed in a picric acid containing fixative.² Cut tissue sections at 5 microns.

SPECIAL MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

Formaldehyde solution, 37%

Reagent Alcohol

Positive PAS control slides, such as PAS TISSUE-TROL™, Catalog No. TTR009-25EA, should be included in each run

Xylene or xylene substitute

MICROWAVE PROCEDURES ONLY:

Microwave Oven

Coplin jar with vented lids

Scott's Tap Water Substitute Concentrate, Catalog No. S5134-6x100ML

α -Amylase (for Diastase Extraction Procedure only), Catalog No. A3176

NOTES:

If a microwave oven is used, please see the Owner's Manual for instructions. Blood films prepared from clinically healthy individuals may be included for control purposes. Polymorphonuclear leukocytes will show an intense red cytoplasmic stain. Tissue sections known to be PAS positive and/or contain glycogen should be included each time a stain sequence is performed.

The data obtained from this procedure serves only as an aid to diagnosis and should be reviewed in conjunction with other clinical diagnostic tests or information.

PROCEDURE:

I. BLOOD, BONE MARROW, OR TISSUE TOUCH PREPARATIONS

Standard Procedure:

1. Fix air dried blood films for **1 minute** at room temperature in Formalin-Ethanol Fixative Solution.
2. Rinse slides **1 minute** in slowly running tap water.
3. Immerse slides in Periodic Acid Solution for **5 minutes** at room temperature.
4. Rinse slides in several changes of distilled water.
5. Immerse slides in Schiff's Reagent for **15 minutes** at room temperature.
NOTE: Immediately after use, cap Schiff's Reagent and return to refrigerator (2–8°C).
6. Wash slides in running tap water for **5 minutes**.
7. Counterstain slides in Hematoxylin Solution, Gill No. 3, for **90 seconds**.
8. Rinse slides in running tap water for **15–30 seconds**, air dry and examine microscopically under oil immersion (900x) lens. Slides may be mounted in toluene or xylene based mounting media.

Microwave Procedure:

1. Fix air dried films at room temperature for **1 minute** in Formalin-Ethanol Fixative Solution.
2. Rinse slides for **1 minute** in slowly running tap water.
3. Place slides in **40 ml** of Periodic Acid Solution contained in a plastic Coplin jar.
4. Microwave on **800 watts** for **10 seconds**.
5. Rinse well in several changes of deionized water.
6. Immerse slides in **40 ml** Schiff's Reagent contained in a plastic Coplin jar.
7. Microwave at **800 watts** for **15 seconds**. Mix solution with a beral pipet or applicator stick and let incubate for **1 minute**.
8. Rinse in warm, gently running tap water for **5 minutes**.
9. Place slides in **40 ml** of Hematoxylin Solution Gill No. 3 contained in a plastic Coplin jar.
10. Microwave on **800 watts** for **10 seconds**.
11. Rinse in running tap water for **1–2 minutes**, then blue in Working Scott's Tap Water Substitute at room temperature.
12. Rinse in running tap water. Air dry.
13. Slides may be mounted in toluene or xylene based mounting media.

II. TISSUE SECTIONS

Standard Procedure:

1. Deparaffinize and hydrate sections to deionized water.
2. Immerse slides in Periodic Acid Solution for **5 minutes** at room temperature (18–26°C).
3. Rinse slide in several changes of distilled water.
4. Immerse slides in Schiff's Reagent for **15 minutes** at room temperature (18–26°C).
5. Wash slides in running tap water for **5 minutes**.
6. Counterstain slides in Hematoxylin Solution, Gill No. 3, for **90 seconds**.
7. Rinse slides in running tap water.
8. Dehydrate, clear and mount sections in toluene or xylene based mounting media.

Microwave Procedure:

1. Deparaffinize and hydrate to deionized water.
2. Immerse slides in **40 ml** of Periodic Acid Solution contained in a plastic Coplin jar. Loosely cover jar with lid, or use lids with holes drilled into them.
3. Microwave at **800 watts** for **10 seconds**.
4. Rinse well in several changes of deionized water.
5. Immerse slides in **40 ml** Schiff's Reagent contained in a plastic Coplin jar.
6. Microwave at **800 watts** for **15 seconds**. Mix solution with a beral pipet or applicator stick and let incubate for **1 minute**.
7. Rinse in warm, gently running tap water for **5 minutes**.
8. Place slides in Hematoxylin, Gill No. 3, contained in a plastic Coplin jar.
9. Microwave on **800 watts** for **10 seconds**.
10. Rinse in running tap water for **1–2 minutes**, then blue in Scott's Tap Water Substitute at room temperature. Rinse in running tap water. Dehydrate, clear and mount.

Microwave Procedure for Diastase (α -Amylase) Digestion:

1. Use duplicate test slides. Label one for digestion with diastase and one for PAS staining only.
NOTE: Slides coated with a tissue adhesive are recommended. Do not celloidinize sections when doing diastase digestion.²
2. Deparaffinize and hydrate slides to deionized water.
3. Prepare Diastase (α -amylase) Working Solution by dissolving 0.2 g α -Amylase, (Catalog No. A 3176), to 40 ml of deionized water. Mix well and place in plastic Coplin jar. Prepare just prior to use.
4. Microwave at **600 watts** for **25 seconds**.
5. Remove slides from Coplin jar and rinse digested slide in running tap water for **5 minutes**.
6. Using both the digested and the undigested slides, proceed with the Microwave Procedure for Tissue, step 2.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

PAS positive substances stain pink to red and nuclei are blue. A Diastase (α -Amylase) Extraction slide will have no visible PAS staining of glycogen when compared to the undigested glycogen positive control slide.

If observed results vary from expected results, please contact Sigma-Aldrich Technical Service for assistance.

REFERENCES

1. Hotchkiss RD: A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. Arch Biochem 16:131, 1948
2. Sheehan DC, Hrapchak BB: Theory and Practice Histotechnology, 2nd ed. CV Mosby, St. Louis, (MO), pp 52, 164-167, 1980
3. Culling CFA, Allison RT, Barr WT: Cellular Pathology Technique, 4th ed. Butterworths, pp 216-220, 1985
4. Davey FR, Nelson DA: Periodic Acid Schiff (PAS) Stain. IN Hematology, 2nd ed. WJ Williams, E Buetler, AJ Erslev, RW Rundles, McGraw-Hill, New York, pp 1630-1632, 1977
5. Thompson SW: Selected Histochemical and Histopathological Methods, CC Thomas, Springfield, (IL), pp 520-539, 1966
6. Leong AS-Y, Milios J: Rapid immunoperoxidase staining of lymphocyte antigens using microwave irradiation. J Pathol 148:183, 1986
7. Brinn NT: Rapid metallic histologic staining using the microwave oven. J Histotechnol 6:125, 1983
8. Valle S: Special stains in the microwave oven. J. Histotechnol 9:237, 1986

TISSUE-TROL is a trademark of Sigma-Aldrich Co. LLC

© 2014 Sigma-Aldrich Co. LLC. All rights reserved. SIGMA-ALDRICH is a trademark of Sigma-Aldrich Co. LLC, registered in the US and other countries. Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see product information on the Sigma-Aldrich website at www.sigmaaldrich.com and/or on the reverse side of the invoice or packing slip.

Procedure No. 395
 Previous Revision: 2011-03
 Revised: 2014-09



EC REP MDSS GmbH
 Schiffgraben 41
 30175 Hannover, Germany **CE**

SIGMA-ALDRICH, INC.
 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA
 314-771-5765
 Technical Service: 800-325-0250
 or e-mail at clintech@sial.com
 To Order: 800-325-3010
www.sigmaaldrich.com