



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

“Efecto del fruto de *Opuntia robusta* sobre el daño hepático en un modelo de fibrosis hepática”

PRESENTA

Nayeli Amalinalli Pulido Hornedo

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS.

Comité tutorial:

Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña

Dr. Javier Ventura Juárez

Dr. Han Moshage

Aguascalientes, Ags. Noviembre 2022

Carta de voto aprobatorio



CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
PRESENTE

Por medio del presente como TUTOR designado del estudiante **NAYELI AMALINALLI PULIDO HORNEDO** con ID 128792 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **EFFECTO DEL FRUTO DE *Opuntia robusta* SOBRE EL DAÑO HEPÁTICO EN UN MODELO DE FIBROSIS HEPÁTICA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla 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 3 de noviembre de 2022



Dra. en Farm. Ma. Consolación Martínez Saldaña
Tutor de tesis

c.c.p.- interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Carta de voto aprobatorio



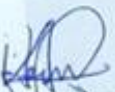
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES
E INNOVACIÓN

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
PRESENTE

Por medio del presente como COTUTOR designado del estudiante **NAYELI AMALINALLI PULIDO HORNEDO** con ID 128792 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **EFFECTO DEL FRUTO DE *Opuntia robusta* SOBRE EL DAÑO HEPÁTICO EN UN MODELO DE FIBROSIS HEPÁTICA** un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla 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 07 de noviembre de 2022



Dr. Javier Ventura Juárez
Cotutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Carta de voto aprobatorio



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
P R E S E N T E

Por medio del presente como ASESOR designado del estudiante **NAYELI AMALINALLI PULIDO HORNEDO** con ID 128792 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **EFFECTO DEL FRUTO DE *Opuntia robusta* SOBRE EL DAÑO HEPÁTICO EN UN MODELO DE FIBROSIS HEPÁTICA** un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla 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 07 de noviembre de 2022

Dr. Han Moshage
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19

Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 18-nov-22

NOMBRE: NAYELI AMALLINALI PULIDO HORNEDO **ID** 128792

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, MODALIDAD TRADICIONAL **LGAC (del posgrado):** ÍNAS EN LA RESPUESTA IMUNE, LA PLASTICIDAD Y LA SECRECIÓN N

TIPO DE TRABAJO: Tesis Trabajo práctico

TÍTULO: "Efecto del fruto de Opuntia robusta sobre el daño hepático en un modelo de fibrosis hepática"

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

CONTRIBUYE A PROPONER UN TRATAMIENTO ALTERNATIVO A LA FIBROSIS HEPÁTICA

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

<u>SI</u>	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
<u>SI</u>	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
<u>SI</u>	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
<u>SI</u>	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
<u>SI</u>	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
<u>SI</u>	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
<u>SI</u>	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
<u>NO</u>	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

<u>SI</u>	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
<u>SI</u>	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
<u>SI</u>	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
<u>NO</u>	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
<u>SI</u>	Coincide con el título y objetivo registrado
<u>SI</u>	Tiene congruencia con cuerpos académicos
<u>SI</u>	Tiene el CVU del Conacyt actualizado
<u>SI</u>	Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

<u>SI</u>	Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
<u>SI</u>	El estudiante es el primer autor
<u>SI</u>	El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
<u>SI</u>	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
<u>SI</u>	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
<u>SI</u>	La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí SI
No _____

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:



DR. DANIEL CERVANTES GARCÍA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:



DRA. ALMA LINA GUERRERO BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:



DR. JUAN JÁUREGUI RINCÓN

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:



M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Constancia de publicación de artículo



plants

an Open Access Journal by MDPI



Hepatoprotective Effect of *Opuntia robusta* Fruit Biocomponents in a Rat Model of Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis

Nayeli Amalinalli Pulido-Hornedo; Javier Ventura-Juárez; Fidel Guevara-Lara; Herson Antonio González-Ponce; Esperanza Sánchez-Alemán; Manon Buist-Homan; Han Moshage; Ma. Consolación Martínez-Saldaña

Plants 2022, Volume 11, Issue 15, 2039



Agradecimientos

A mi tutora, la Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña por su inmenso apoyo y por enseñarme en lo académico y lo personal; todo mi agradecimiento y admiración. A mi cotutor, el Dr. Javier Ventura Juárez por mostrarme que la devoción y generosidad son valores que no se deben perder. A mi asesor, el Dr. Han Moshage por su amabilidad, sus atenciones y su apoyo en todo momento.

A mi compañera y amiga la Biol. Gloria Stephanie Villa Jaimes por su apoyo y por los momentos de diversión. A la L.A.Q.B Sonia Sophia Muñoz Cruz, por su gran compromiso y cariño.

A las investigadoras la Dra. Sandra Luz Martínez Hernández, la M.C. Ma. Lorena Sandoval Cardoso, la L.A.Q.B Mariana Villalobos, la Ing. Laura Yamamoto Flores, la Biol. Ana Lourdes Medrano y la L.A.Q.B Irma Guadalupe Reynoso Andeola por su apoyo académico y personal. Así como a los investigadores el Dr. Fidel Guevara Lara, el Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega, el Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta, el Dr. José Luis Quintanar Stephano por sus consejos y apoyo académico.

A mis compañeros de generación por hacer el camino más llevadero con su solidaridad sincera.

Al 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. 713673 y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Dedicatorias

A mis padres, por la educación, fé, apoyo y amor sin reservas que me han brindado. Son mi respaldo de vida.

A mi hermana y hermanos por su amor y por celebrar mis logros. Siempre juntos.

A mis amigos por su apoyo, comprensión, paciencia y cariño.

A mis abuelas por mostrarme la fortaleza, tenacidad y ternura de la femineidad.

Sin alguno de ustedes, no lo habría logrado.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	9
1. Fibrosis hepática	9
1.1 <i>Epidemiología de la fibrosis hepática</i>	9
1.2 <i>Etiología de la fibrosis hepática</i>	10
1.3 <i>Fisiopatología de la fibrosis hepática</i>	11
2. Estrés oxidativo celular	13
2.1 <i>Mecanismos pro-oxidantes endógenos</i>	14
2.2 <i>Radicales libres y moléculas reactivas</i>	15
2.3 <i>Mecanismos de daño (daño a macromoléculas)</i>	16
2.4 <i>Daño celular</i>	16
2.5 <i>Inflamación en la fibrosis hepática</i>	17
3. Células estelares hepáticas (HSC)	18
4. Antioxidantes	20
4.1 <i>Antioxidantes endógenos</i>	20
4.1.1 <i>Antioxidantes endógenos enzimáticos y no enzimáticos</i>	20
4.2 <i>Antioxidantes exógenos</i>	21
5. Alimentos funcionales	22
5.1 <i>Uso en enfermedades asociadas al estrés oxidativo</i>	23
6. Metabolitos secundarios	24
6.1 <i>Compuestos fenólicos</i>	24
6.1.1 <i>Flavonoides</i>	25
6.2 <i>Betalaínas</i>	26
6.2.1 <i>Betacianinas/ Betanina</i>	28
6.3 <i>Vitaminas C y E</i>	30
6.3.1 <i>Vitamina C</i>	30
6.3.2 <i>Vitamina E</i>	30
7. Género Opuntia	31
7.1 <i>Opuntia robusta</i>	32
II) ANTECEDENTES	32

2.1 Tioacetamida.....	32
2.2 Evaluaciones previas de la capacidad antioxidante del fruto de <i>Opuntia robusta</i> (Or)	35
III) JUSTIFICACIÓN.....	37
IV) HIPÓTESIS.....	38
V) OBJETIVO	38
VI) OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
VII) DISEÑO EXPERIMENTAL	39
VIII) METODOLOGÍA.....	41
8.1 Caracterización nutracéutica de Or.....	41
8.1.1 Colecta, extracción y almacenamiento	41
8.1.1.1 Procedimientos de extracción.....	41
8.1.1.2 Análisis bromatológico de OrP.....	42
8.1.1.3 Determinación de contenido de humedad de OrP.....	42
8.2 Determinación in vitro de la capacidad antioxidante de OrP y OrE.....	43
8.2.1 Obtención de extracto metanólico de OrP.....	43
8.2.2 Determinación de betacianinas	44
8.2.3 Determinación de fenoles solubles totales.....	44
8.2.4 Determinación de flavonoides solubles totales.....	45
8.2.5 Determinación de capacidad antioxidante usando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	46
8.2.6 Determinación de actividad antioxidante usando el radical ácido 2,2'-azino-bis-3etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS ⁺).....	47
8.2.7 Determinación de la actividad antioxidante por el método Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP).....	48
8.2.8 Determinación de la actividad antioxidante OrP usando AAPH como indicador de daño oxidativo y hemólisis en eritrocitos humanos	49
8.2.8.1 Análisis Preliminar de Citotoxicidad Conducente a Hemólisis para el Extracto de Muestra Problema.....	50
8.2.8.2 Análisis de Citoprotección por el Extracto de OrP contra la Hemólisis Oxidativa Inducida por AAPH	51
8.2.8.3 Análisis de la Curva de Calibración de Citoprotección con Trolox ^{MR} y con la Muestra Problema	53
8.2.9 Capacidad de eliminación de H ₂ O ₂	54
8.2.10 Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector UV (HPLC- UV) de vitaminas C y E	55
8.2.10.1 Vitamina C	55
8.2.10.2 Vitamina E.....	55
8.3 Modelo experimental in vivo.....	56
8.3.1 Marcadores bioquímicos de daño hepático.....	57
8.3.2 Biomarcadores de estrés oxidativo	57
8.3.2.1 Glutatión reducido (GSH).....	57

8.3.2.2 Malondialdehído (MDA).....	58
8.3.3 Estudio histopatológico.....	58
8.3.3.1 Tinción tricrómica de Masson	58
8.3.3.2 Mediciones de tabiques fibróticos interlobulillares.....	59
8.4 Marcadores moleculares de daño hepático.....	60
8.4.1 Expresión génica de TNF- α mediante qPCR.....	60
8.4.1.1 Extracción de RNA.....	60
8.4.1.2 Cuantificación de RNA.....	61
8.4.1.3 Síntesis de cDNA.....	61
8.4.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa (qPCR).....	61
8.4.2 Expresión proteica de α -SMA a través de Western blot.....	63
8.4.2.1 Extracción de proteína.....	63
8.4.2.2 Cuantificación de proteína.....	63
8.4.2.3 SDS-PAGE.....	64
8.4.2.4 Transferencia a membrana de PVDF.....	65
8.4.2.5 Tinción rojo Ponceau.....	66
8.4.2.6 Western Blotting.....	66
8.5 Análisis estadísticos	67
IX) RESULTADOS.....	68
9.1 Caracterización nutracéutica del fruto de <i>Opuntia robusta</i>	68
9.1.1 Colecta, extracción y almacenamiento	68
9.1.1.1 Análisis bromatológico.....	69
9.1.1.2 Determinación del contenido de humedad de OrP.....	70
9.2 Determinación <i>in vitro</i> de la capacidad antioxidante de OrP	71
9.2.1 Determinación del contenido de betanocianinas, fenoles solubles totales y flavonoides solubles totales en OrP.....	71
9.2.2 Determinación de capacidad antioxidante usando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	72
9.2.3 Determinación de actividad antioxidante usando el radical ácido 2,2'-azino-bis-3etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS ⁺).....	72
9.2.4 Determinación de la actividad antioxidante por el método Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP).....	73
9.2.5 Capacidad de eliminación de H ₂ O ₂	73
9.2.6 Determinación de la actividad antioxidante del OrP usando AAPH como indicador de daño oxidativo y hemólisis en eritrocitos humanos	74
9.2.6.1 Análisis Preliminar de Citotoxicidad Conducente a Hemólisis para el Extracto de Muestra Problema.....	74
9.2.6.2 Análisis de Citoprotección por el Extracto de OrP contra la Hemólisis Oxidativa Inducida por AAPH	74
9.2.6.3 Análisis de la Curva de Calibración de Citoprotección con Trolox ^{MR} y con OrP	74
9.2.7 Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector UV (HPLC- UV) de vitaminas E y C.	75
9.3 Modelo experimental <i>in vivo</i>	77
9.3.1 Marcadores bioquímicos de daño hepático.....	77
9.3.1.1 Grupos experimentales hepatoprotectores	77

9.3.1.2 Grupos experimentales concomitantes	78
9.3.2 Biomarcadores de estrés oxidativo	79
9.3.2.1 Glutación reducido (GSH).....	79
9.3.2.2 Malondialdehído.....	82
9.3.3 Análisis histopatológico de los grupos experimentales	83
9.3.3.1 Grupos hepatoprotectores.....	83
9.3.3.2 Grupos concomitantes	84
9.3.3.3 Morfometría	87
9.4 Biomarcadores moleculares de daño hepático.....	88
9.4.1. Expresión génica relativa de TNF- α	88
9.4.2. Expresión proteica relativa de α -SMA.....	89
X) DISCUSIONES	92
XI) CONCLUSIONES.....	107
XII) PROSPECTIVA	108
XIII) BIBLIOGRAFÍA.....	108
XIV) ANEXOS	124
XV) ARTÍCULO PUBLICADO	138

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatología de la fibrosis hepática.....	12
Figura 2. Biosíntesis de betacianinas.....	27
Figura 3. Mecanismo de daño del metabolito tóxico TAsO₂.....	35
Figura 4. Curva patrón de fenoles solubles totales.....	45
Figura 5. Curva patrón de flavonoides solubles totales.....	46
Figura 6. Curva de calibración de DPPH.	47
Figura 7. Curva de calibración de ABTS^{•+}.	48
Figura 8. Curva de calibración de FRAP.	49
Figura 9. Curva de calibración de AAPH.	54
Figura 10. Evaluación cuantitativa de septos de fibrosis interlobulillar	59
Figura 11. Cladodios de Opuntia robusta	69
Figura 12. Cromatograma de HPLC-UV de vitamina C en el extracto de Opuntia robusta (OrE).....	76
Figura 13. Cromatograma de HPLC-UV del estándar alfa tocoferol y vitamina E en OrE. .76	

Figura 14. Concentraciones de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) entre los tratamientos hepatoprotectores en diferentes tiempos de evaluación.	77
Figura 15. Concentraciones de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) entre los tratamientos concomitantes en diferentes tiempos de evaluación.	79
Figura 16. Concentraciones de glutatión reducido (GSH) en tejido hepático de los tratamientos en los diferentes cortes de tiempo.	81
Figura 17. Concentraciones de malondialdehído (MDA) de los tratamientos en los diferentes tiempos de evaluación.	82
Figura 18. Estudio histopatológico de los grupos tratados con los hepatoprotectores. ..	83
Figura 19. Proyecciones de daño desde la zona 3 hacia los espacios portales.	85
Figura 20. Efecto de los hepatoprotectores en la histopatología del daño hepático inducido con TAA a través del tiempo.	86
Figura 21. Mediciones de los tabiques fibróticos interlobulillares de los diferentes tratamientos, en los diversos cortes de tiempo.	87
Figura 22. Expresión génica relativa de TNF-α de los grupos hepatoprotectores.	88
Figura 23. Expresión génica relativa de TNF-α de grupos concomitantes.	89
Figura 24. Expresión proteica relativa de α-SMA de los grupos de hepatoprotectores. ...	90
Figura 25. Expresión proteica relativa de α-SMA.	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Radicales libres orgánicos e inorgánicos más importantes.	15
Tabla 2. Sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.	21
Tabla 3. Volúmenes de reacción para análisis preliminar de citotoxicidad conducente a hemólisis para OrP.	50
Tabla 4. Velocidades de reacción del análisis de citoprotección por los extractos de OrP contra a hemólisis oxidativa inducida por AAPH.	52
Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos TNF-α y 18 s.	62
Tabla 6. Curva patrón para cuantificación de proteínas por el método de Bradford.	63
Tabla 7. Geles de poliacrilamida para electroforesis de proteínas.	64

Tabla 8. Peso total del fruto colectado con cáscara, peso total del fruto sin cáscara y peso a partir del cual se obtuvieron OrP y OrE.68

Tabla 9. Análisis bromatológico.69

Tabla 10. Porcentaje de humedad de OrP (pulpa del fruto de *Opuntia robusta*).70

Tabla 11. Cuantificación de betacianinas, compuestos fenólicos solubles totales y flavonoides solubles totales en OrP.....71

Tabla 12. Determinación cuantitativa de la capacidad antioxidante de OrP.....73



RESUMEN

La fibrosis hepática es una enfermedad crónica asociada al estrés oxidativo que tiene un gran impacto en la mortalidad de la población. Debido a su capacidad antioxidante, evaluamos el efecto protector del fruto de *Opuntia robusta* (Or) sobre la fibrosis hepática. Se realizó la caracterización nutracéutica de Or y se indujo un modelo de fibrosis con tioacetamida (TAA) en ratas Wistar macho. Posteriormente, se establecieron 11 grupos experimentales; 4 de los cuales fueron administrados con los hepatoprotectores, mientras que otros 4 se administraron en concomitancia con TAA, además del grupo experimental de daño hepático, el grupo sham y el grupo control. Se evaluaron las aminotransferasas (AST y ALT), el glutatión reducido (GSH), el malondialdehído (MDA) y la histopatología. Así como la expresión génica relativa de TNF- α a través de RT-qPCR y la presencia de la proteína α -SMA mediante Western Blotting. Or contiene $436,5 \pm 57$ mg de equivalentes de Betacianinas/L., 793 mg de equivalentes de catequina (CAE)/100 g de flavonoides, 1118 mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de fenoles totales, 141,14 mg/100 g de vitamina C y 429,9 μ g/100 g de vitamina E. La capacidad antioxidante de Or fue: 2,27 mmol de Trolox® equivalentes (TE)/L (DPPH), $62,2 \pm 5,0$ μ mol TE/g (ABTS⁺), $80,2 \pm 11,7$ μ mol TE/g (FRAP), $247,9 \pm 15,6$ μ mol TE/g (AAPH) y 15% de eliminación de H₂O₂. Se observó un aumento ($p < 0,05$) de las aminotransferasas y una disminución ($p < 0,05$) del GSH hepático en el grupo TAA en comparación con el grupo control y los grupos concomitantes. La histopatología mostró cambios en la arquitectura normal del hígado tratado con TAA en comparación con los tratamientos concomitantes. Por otro lado, aunque Or aumentó los niveles tisulares de TNF- α , disminuyó la presencia de la proteína α -SMA. Or contiene componentes bioactivos con capacidad antioxidante, que pueden reducir el daño hepático fibrótico.

ABSTRACT

Liver fibrosis is a chronic disease associated with oxidative stress that has a great impact on the population mortality. Due to their antioxidant capacity, we evaluated the protective effect of *Opuntia robusta* fruit (Or) on liver fibrosis. A nutraceutical characterization of Or was performed and a model of fibrosis was induced with thioacetamide (TAA) in male Wistar rats. Subsequently, 11 experimental groups were established; 4 of which were administered with the hepatoprotectors, while another 4 were administered concomitantly with TAA, in addition to the liver damage experimental group, the sham group and the control group. Aminotransferases, reduced glutathione (GSH) and histopathology were evaluated. As well as the relative gene expression of TNF- α through RT-qPCR and the presence of the α -SMA protein through Western Blotting. Or contained 436.5 ± 57 mg of Betacyanins equivalents/L., 793 mg of catechin equivalents (CAE)/100 g for flavonoids, 1118 mg of gallic acid equivalents (GAE)/100 g for total phenols, 141.14 mg/100 g of vitamin C and 429.9 μ g/100 g of vitamin E. The antioxidant capacity of Or was: 2.27 mmol of Trolox[®] equivalents (TE)/L (DPPH), 62.2 ± 5.0 μ mol TE/g (ABTS^{••}), 80.2 ± 11.7 μ mol TE/g (FRAP), 247.9 ± 15.6 μ mol TE/g (AAPH) and 15% of H₂O₂ elimination. An increase ($p < 0.05$) of aminotransferases and a decrease ($p < 0.05$) of hepatic GSH was observed in the TAA group compared to the control and the concomitant groups. Histopathology showed changes in the normal architecture of the liver treated with TAA compared to the concomitant treatments. On the other hand, although Or increased tissue levels of TNF- α , it decreased the presence of α -SMA protein. Or contains bioactive components with antioxidant capacity, which can reduce fibrotic liver damage.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

I. INTRODUCCIÓN

1. Fibrosis hepática

La fibrosis hepática es una respuesta adaptativa inadecuada al daño tisular crónico. Es un proceso caracterizado por el desequilibrio entre la secreción y la degradación de la matriz extracelular en respuesta a la exposición continua del hígado a diferentes estímulos nocivos. La exposición crónica a diversos agentes etiológicos genera estrés oxidativo que induce la secreción de mediadores solubles inflamatorios y fibrogénicos, como TNF- α , TGF- β , IL1 e IL6, que eventualmente causan daño hepatocelular (Shi et al., 2021). Estas citocinas activan diferentes poblaciones de células hepáticas y provocan una reacción inflamatoria sostenida. Se genera la activación de algunas poblaciones celulares, entre ellas, los macrófagos hepáticos (células de Kupffer). Una vez activados, provocan la activación de las células estrelladas hepáticas quiescentes (qHSC) que desencadenan un desequilibrio en la síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular (EMC, por sus siglas en inglés). En consecuencia, se genera un depósito progresivo de colágena I y III en el espacio de Disse, que modifica la arquitectura normal del parénquima hepático y de no eliminarse el agente lesivo, altera las funciones normales del órgano.

1.1 Epidemiología de la fibrosis hepática

La epidemia de obesidad en los últimos años ha impactado en el aumento de la prevalencia de NAFLD (Non- alcoholic fatty liver disease, por sus siglas en inglés) y su forma progresiva NASH (Non-alcoholic steatohepatitis, por sus siglas en inglés), que eventualmente evoluciona a fibrosis hepática. La fibrosis es el principal factor asociado con la morbilidad y mortalidad en pacientes que padecen NAFLD a nivel mundial (Ebadi et al., 2021). Se tiene la sospecha de que el 66% de los pacientes mayores de 50 años con diabetes y/o obesidad padecen NASH con fibrosis avanzada (Rinella, 2015). Estas patologías son las principales causas de enfermedad hepática crónica (EHC) en muchos países (Arrese M & Feldstein A, 2017).

Actualmente, a nivel mundial las EHC son una preocupación de salud importante, ya que causan aproximadamente 2 millones de muertes anualmente. La fibrosis hepática es una

patología que representa la progresión de las enfermedades inflamatorias crónicas que contribuye al 45% de mortalidad y es la undécima causa de muerte más común en el mundo (Roehlen et al., 2020). Además, la fibrosis hepática es el principal riesgo para el desarrollo de hepatocarcinoma celular (HCC). Las tasas de prevalencia más altas de cirrosis se encuentran en los países occidentales (Marcellin & Kutala, 2018), mientras que en Latinoamérica parece ser una preocupación creciente.

México posee la prevalencia más alta de cirrosis descompensada en el continente americano y la mortalidad de esta patología ocupa el cuarto lugar a nivel nacional. Actualmente, la etiología de las tasas de incidencia de cirrosis se asocia con desórdenes metabólicos (Cisneros Garza et al., 2022) y el grupo de edad más afectado es entre 51 y 70 años (Méndez-Sánchez et al., 2018).

Una porción de pacientes con NAFLD padecerá de fibrosis hepática progresiva (Mann et al., 2016), sin embargo, es necesario implementar un método adecuado de diagnóstico para obtener una cifra acertada de la fibrosis hepática.

Debido al aumento en la incidencia y prevalencia de la fibrosis hepática además de la relativa ineficacia del uso de agentes quelantes, antivirales de acción directa y algunos fármacos que son utilizados actualmente (Berumen et al., 2020), existe la necesidad de un nuevo abordaje terapéutico para reducir el daño y así prevenir su progresión.

1.2 Etiología de la fibrosis hepática

La fibrosis hepática es un proceso dinámico que interrumpe las funciones basales del hígado. Su etiología es multifactorial y se relaciona con virus (hepatitis B y hepatitis C), esteatohepatitis alcohólica (ASH) y NASH, así como enfermedades autoinmunes, genéticas (Roehlen et al., 2020) y metabólicas como el Síndrome metabólico (SM) (Sarem et al., 2006).

Se ha descrito que la acumulación de grasa en los hepatocitos está correlacionada fuertemente con todos los factores del SM. Los péptidos y las citocinas secretadas por los adipocitos pueden aumentar la acumulación de grasa intracelular. A su vez, la inflamación secundaria y esteatosis hepáticas pueden contribuir a la inflamación de bajo

grado relacionada con el SM (Haider et al., 2009), creando un círculo vicioso de daño progresivo.

1.3 Fisiopatología de la fibrosis hepática

De manera general, la esteatosis hepática se genera debido a que el tejido adiposo visceral produce señales que alteran tanto el metabolismo de la glucosa como el de lípidos, lo que conlleva a la acumulación de grasa hepática y crea un medio proinflamatorio que detona lesión hepática a nivel celular. Además, se desencadenan otros procesos nocivos como el estrés oxidativo, lipotoxicidad, apoptosis y necrosis. Todo lo anterior, contribuye al daño hepático traducido en fibrosis progresiva (Rinella, 2015).

NAFLD se divide en esteatosis aislada con o sin la presencia de inflamación no específica y NASH que presenta ciertos grados de fibrosis hepática. La esteatosis aislada se distingue por la presencia de grasa macrovesicular en el citoplasma de las células, mientras que NASH se caracteriza por la presencia adicional de tumefacción celular y por último, la fibrosis hepática se caracteriza por depósitos anormales de fibras de colágeno (Rinella, 2015).

En la patogénesis de la fibrosis hepática, el daño hepatocelular culmina con la necrosis de los hepatocitos inducida por estrés oxidativo, que conlleva a la activación de las células de Kupffer secretoras de diversas citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1), responsable de la activación de las células estelares hepáticas (HSC) y de su cambio fenotípico a miofibroblastos, los cuales expresan α -SMA, proteína utilizada como el marcador de diferenciación miofibroblástica y/o HSC activadas. Por lo tanto, las HSC pierden su capacidad normal de almacenar vitamina A y lípidos (Ross & Pawlina, 2015) y adquieren la capacidad de remodelar la matriz extracelular (MEC), mediante la secreción incrementada de colágena I y III y la disminución de la secreción metaloproteinasas (MMP) responsables de la degradación de MEC en el espacio perisinusoidal o espacio de Disse (Sarem et al., 2006). Este colágeno extra tiene continuidad con el tejido conectivo del espacio portal y con el tejido que rodea la vena central. Un incremento en el estroma fibroso en el espacio de Disse es un signo temprano de respuesta hepática a

xenobióticos. Así mismo, las HSC participan en la remodelación de la matriz extracelular en un intento de restauración hepática (Ross & Pawlina, 2015).

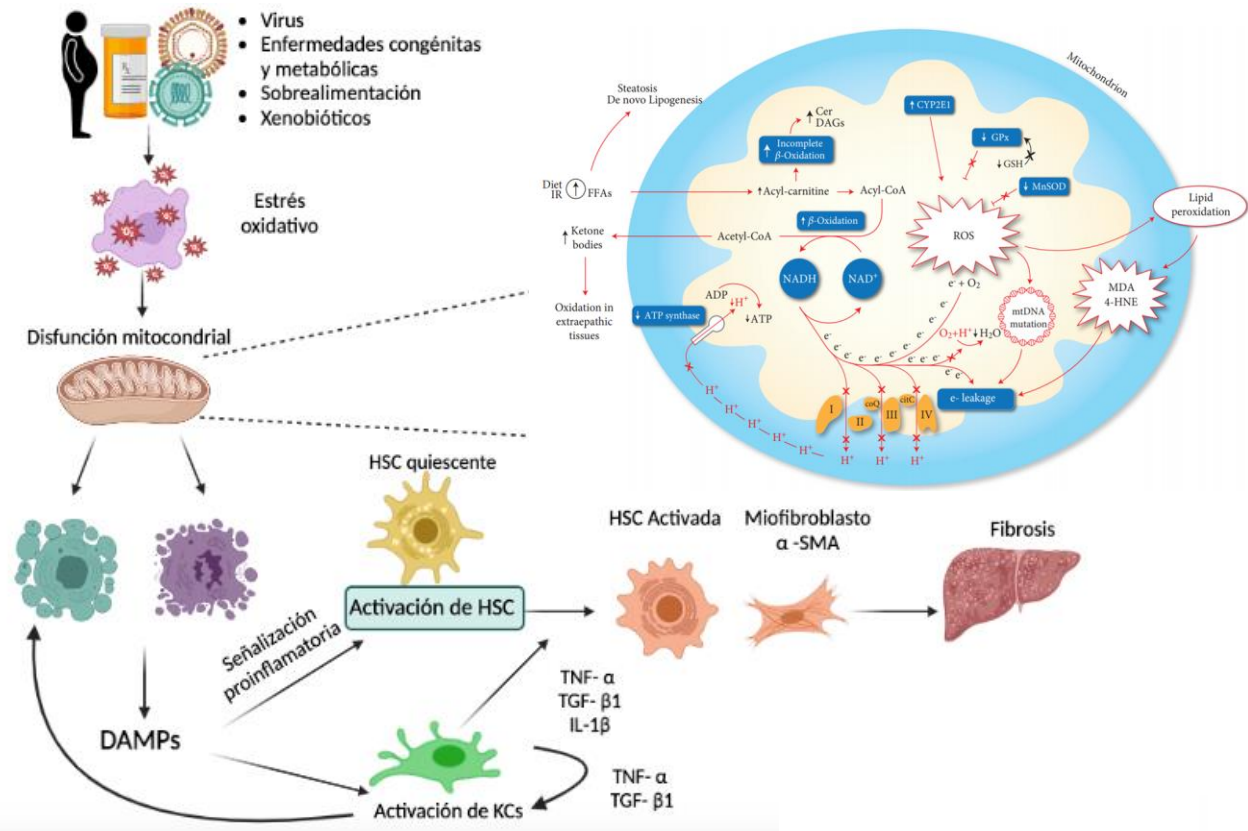


Figura 1. Fisiopatología de la fibrosis hepática.

Tras una lesión aguda, el proceso fisiopatológico se equilibra al contrarrestar los estímulos fibróticos mediante mecanismos antifibróticos, que dan como resultado la inactivación o apoptosis de los miofibroblastos y la resolución de la cicatriz. Por el contrario, en la enfermedad hepática crónica, el desequilibrio entre los mecanismos profibrogénicos incrementados y/o persistentes con respecto a los mecanismos antifibrogénicos, provoca la activación permanente de miofibroblastos proliferantes, contráctiles y migratorios que conduce a la producción excesiva de MEC (Elpek, 2014; Zhou et al., 2014). El hecho de que el hígado pase a una etapa de disipación de las cicatrices antifibróticas o de pasar a una etapa de promoción de la fibrosis está regulado principalmente por células no parenquimatosas, incluidas las células de Kupffer y otras

células inmunitarias (Campana & Iredale, 2017; Natarajan et al., 2006; Ramachandran et al., 2012).

La apoptosis de los hepatocitos y la liberación de patrones asociados a daño (DAMPs) por parte de éstas células no solo activan las HSC directamente, sino que también inducen el reclutamiento y la activación de linfocitos y macrófagos que contribuyen a la promoción de la transdiferenciación de las HSC y la activación de los miofibroblastos al producir citocinas proinflamatorias y profibrogénicas (Barron & Wynn, 2011; Krenkel & Tacke, 2017). Distintas subpoblaciones de macrófagos, por otro lado, participan en la resolución de la fibrosis debido a la expresión de MMP (Fallowfield et al., 2007; Tacke & Zimmermann, 2014). Sobre una base molecular, una red compleja de vías de señalización inducidas por citocinas orquesta las interacciones celulares profibrogénicas. De hecho, se ha sugerido que el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la vía del inflammasoma (NLRP3)-caspasa1, así como la señalización de WNT/B-catenina, son vías de señalización clave asociadas con la activación de HSC y progresión de la fibrosis (Nishikawa et al., 2018; F. Xu et al., 2016; Ying et al., 2017).

2. Estrés oxidativo celular

El estrés oxidativo se ha definido como una alteración en el equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) generadas durante el metabolismo celular y las defensas antioxidantes endógenas del organismo, que puede conducir al daño celular. Este desbalance establece la base de muchas patologías, incluidos diferentes tipos de cáncer, aterosclerosis, infarto al miocardio, diabetes, enfermedades inflamatorias, desórdenes del sistema nervioso central y envejecimiento celular (Zeghibib et al., 2022). Asimismo, el estrés oxidativo es un factor clave en el desarrollo de la fibrosis hepática, ya que daña los hepatocitos y promueve la liberación de mediadores proinflamatorios (J. Xu et al., 2018). Los ROS también actúan sobre las HSC, en las cuales inducen cambios epigenéticos, entre los cuales se encuentran, la remodelación de la cromatina mediante

la modificación de histonas, la metilación del ADN y el silenciamiento de genes mediante microRNAs (miRs) (Roehlen et al., 2020).

2.1 Mecanismos pro-oxidantes endógenos

Las ROS constituyen una familia de mediadores pro-fibróticos incluidos superóxidos, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxil ($\cdot OH$), los cuales son generados durante procesos metabólicos celulares basales, en particular durante la fosforilación oxidativa y la lipoperoxidación en hepatocitos, HSC y macrófagos. A niveles bajos, las ROS pueden funcionar como mensajeros secundarios para activar diferentes respuestas celulares normales. Sin embargo, a niveles altos, generan la disrupción de lípidos celulares, proteínas y ADN, lo que conduce a la apoptosis y necrosis de los hepatocitos. Además, las ROS estimulan la producción de factores proinflamatorios y profibrogénicos por HSC activadas, células de Kupffer y otras células proinflamatorias (Roehlen et al., 2020). La tasa de producción de ROS aumenta considerablemente en situaciones de hipoxia, ejercicio intenso, isquemia y por exposición a diversos agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, contaminación ambiental, humo del tabaco y por acción de xenobióticos (Guerra, 2001).

Los ROS son generados por múltiples fuentes celulares como la NADPH oxidasa, mitocondria, xantina oxidasa, sintasa de óxido nítrico derivada del endotelio (ENOS), ciclooxigenasa y lipooxigenasa (Bonomini et al., 2015). Otra fuente importante de ROS son las oxidasas de función mixta del citocromo P-450. Estas enzimas son importantes para metabolizar sustratos presentes de manera normal en el organismo, como ácidos grasos, colesterol, esteroides y ácidos biliares. También se generan durante la biotransformación de estos sustratos, ya que emplean oxígeno molecular; sin embargo, el grado de generación de ROS puede variar considerablemente dependiendo del metabolito catalizado y del citocromo implicado en la reacción. Otras fuentes de ROS en el organismo son los macrófagos y los neutrófilos, ya que ambos expresan NADPH-oxidasa, que genera $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 cuando se activa (Urtasun & Nieto, 2007).

2.2 Radicales libres y moléculas reactivas

Las ROS comprenden a los radicales libres (RL) y a las moléculas no radicales que contienen oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (González-Ponce TESIS). Los RL se definen como moléculas o porciones de ellas que tienen al menos un electrón desapareado en su orbital más externo, debido a esto son sumamente reactivos e inestables, en consecuencia, buscan su estabilidad aceptando o donando electrones a otras moléculas; un exceso de RL rompe el equilibrio produciendo el estrés oxidativo celular. Como la mayoría de las moléculas no son RL, entonces las reacciones involucran no radicales, es decir, a las moléculas biológicas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos). La reacción de un radical con un no radical produce una reacción en cadena de radicales libres con la formación de nuevos radicales, que a su vez pueden reaccionar con otras macromoléculas. Un ejemplo importante es la peroxidación lipídica y el daño a las proteínas (Betteridge, 2000). Existen radicales y especies reactivas orgánicas e inorgánicas, algunos ejemplos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Radicales libres orgánicos e inorgánicos más importantes.

Inorgánicos o primarios	Orgánicos o secundarios
Oxígeno molecular (O_2)	Radical peróxido ($ROO\cdot$)
Radical anión superóxido ($O_2\cdot^-$)	Hidroperóxido orgánico (ROOH)
Radical hidroxilo ($OH\cdot$)	Lípidos peroxidados
Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)	

(Modificado de Guerra. 2001)

El oxidante celular más reactivo a pesar de su vida media extremadamente corta es el radical hidroxilo, actúa en el mismo lugar donde se genera a través de su capacidad para atacar a la mayoría de las biomoléculas y detona la propagación de las reacciones de oxido-reducción. El anión superóxido no es en sí mismo reactivo y se genera cuando el oxígeno acepta un electrón. Puede actuar como agente oxidante pero es mucho más reactivo cuando actúa como agente reductor de complejos de hierro. Debido a esto, se considera de mayor importancia como fuente de radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno. El óxido nítrico es un radical fisiológico y es de importante consideración ya que funciona como mediador de tono vascular (Betteridge, 2000).

2.3 Mecanismos de daño (daño a macromoléculas)

Las ROS se consideran hepatotóxicas por su capacidad de reaccionar con la mayoría de las macromoléculas, inactivando enzimas, dañando el ADN, produciendo modificaciones post-traduccionales e induciendo reacciones de peroxidación de lípidos, lo que rompe las membranas biológicas (Urtasun & Nieto, 2007). Además, inducen daños oxidativos acumulativos a las células e inducen la disfunción celular con la edad y eventualmente a la muerte. Uno de los organelos celulares más estrechamente involucrado en este tipo de procesos es la mitocondria, debido a que se considera la principal fuente intracelular de anión superóxido (O_2^-) y el principal objetivo del ataque de RL (Bonomini et al., 2015).

La cadena respiratoria mitocondrial ó fosforilación oxidativa produce ROS que dañan los propios componentes mitocondriales, incluídas proteínas, lípidos y ADN mitocondrial (ADNmt). Ello acumula de una forma progresiva mutaciones somáticas inducidas por oxidantes en el ADNmt que causan la ruptura de su cadena y conducen a un deterioro de la función bioenergética de las mitocondrias, por lo tanto, al envejecimiento. La acumulación de estas alteraciones puede provocar un deterioro de los componentes de la cadena respiratoria, lo que lleva a un ciclo repetitivo con un incremento en la producción de ROS mitocondrial y un depósito posterior de más mutaciones del ADNmt. Esta reacción en cadena participa en el aumento del daño oxidativo durante el envejecimiento que induce la disminución progresiva de la función celular y tisular como resultado de un suministro insuficiente de energía, acompañado de una mayor susceptibilidad a la apoptosis (Bonomini et al., 2015).

2.4 Daño celular

Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados son propensos al ataque de radicales libres ya que su doble enlace debilita el enlace carbono-hidrógeno en el átomo de carbono adyacente. En consecuencia, el resto del radical centrado en el carbono sufre un reordenamiento molecular que resulta en un dieno conjugado, el cual se puede combinar con el oxígeno formando así un radical peroxilo (ROO^\cdot) (Betteridge, 2000). Todo este reordenamiento es capaz de robar un átomo de hidrógeno adicional y

comenzar una reacción en cadena que continúa hasta que el sustrato se consume en su totalidad o la reacción termina por efecto de un antioxidante al romper cadenas, como la vitamina E (Betteridge, 2000). Los peróxidos resultantes de dicho proceso, son compuestos estables, pero la descomposición puede ser catalizada por metales de transición y complejos metálicos que producen radicales alcoxilo y peroxilo que pueden provocar la oxidación de lípidos. La peroxidación de lípidos puede tener efectos profundos en la función celular; las consecuencias de la peroxidación exacerbada de membranas celulares produce cambios en la fluidez, aumento de la permeabilidad, disminución del potencial de membrana y su inminente ruptura (Betteridge, 2000).

2.5 Inflamación en la fibrosis hepática

La inflamación es una respuesta natural del cuerpo a la estimulación por un patógeno, toxina o daño físico (químico o traumático) que involucra la generación de una amplia gama de mediadores inflamatorios y ROS por parte de las células inmunitarias. Cuando el proceso inflamatorio no está controlado o cuando los sistemas de defensa endógenos no logran establecer la homeostasis, la inflamación puede volverse crónica y conducir a daño celular y tisular severo. A menudo, este tipo de daño precede al establecimiento de enfermedades crónicas (Zeghib et al., 2022).

La señalización de ROS también regula la expresión y la actividad del factor de transcripción NF- κ B, el cual tiene un papel clave en la regulación de la inflamación y, por lo tanto, es un importante modulador de la progresión de la fibrosis hepática (Luedde & Schwabe, 2011). Se ha sugerido que NF- κ B regula tres aspectos claves en las HSC: su activación, sobrevivencia y sus respuestas inflamatorias. La señalización de NF- κ B puede actuar tanto como de manera profibrogénica como antifibrogénica (Luedde & Schwabe, 2011).

La generación de ROS y el estrés oxidativo están tan íntimamente relacionados con el proceso inflamatorio, que su inhibición provoca reducción de la inflamación. Por lo tanto, varios antioxidantes como la vitamina E, la fosfatidilcolina, la silimarina y la N-acetilcisteína (NAC) se han probado con resultados alentadores como fármacos antifibróticos (Berumen et al., 2020).

3. Células estelares hepáticas (HSC)

Las HSC, constituyen el 5-8% del número total de células hepáticas en su estado quiescente o inactivado. Su citoplasma presenta múltiples gotas de grasa de 1-2 μm de diámetro y son el sitio de almacenamiento de vitamina A o retinol. Aproximadamente el 90% de la vitamina A hepática y el 80% del total del organismo se encuentra almacenado en estas células, mientras que el resto se encuentra en las células parenquimatosas (Sarem et al., 2006).

Como se mencionó con anterioridad, las HSC son las responsables de la síntesis de las MMP, que son un grupo de enzimas que degradan los componentes de la MEC y a su vez, también se encargan de la síntesis de sus inhibidores (TIMP, por sus siglas en inglés) que controlan la actividad catalítica de las MMP, con el objetivo de mantener los componentes de la matriz intersticial en una concentración estable y adecuada (Sarem et al., 2006). Tres eventos en las HSC son fundamentales para la iniciación de la fibrosis hepática, el aumento en el tamaño (hipertrofia), en el número (hiperplasia) de las células además de su transdiferenciación fenotípica a células proliferativas, fibrogénicas y contráctiles. Durante la activación de las células estrelladas, tanto los estímulos patológicos como los mediadores intercelulares y los cambios de la MEC son esenciales. El comienzo del proceso de activación de las HSC se produce por el impacto sobre la homeostasis celular de los hepatocitos generado por el agente lesivo, que detona el estímulo de los efectos pro-inflamatorios de células inmunes y los cambios en la conformación de la MEC que las HSC perciben por medio de receptores de integrinas que conectan componentes de la MEC al citoesqueleto (Sarem et al., 2006). Este proceso de activación celular se puede dividir en dos etapas: iniciación y perpetuación. Durante la fase de iniciación se desarrolla la etapa pre inflamatoria y los cambios de la expresión genética/ fenotípica que permiten a las HSC reaccionar a estímulos locales y a los propiciados por citocinas inflamatorias, todo ello como resultado de los estímulos paracrinos de células circunvecinas y los cambios previos de la composición de la MEC. La perpetuación consiste en todas las actividades celulares que proliferan el fenotipo activado, es decir, las células similares a miofibroblastos. Lo cual se logra por medio de

los efectos gradualmente crecientes de las citocinas y comprende la proliferación, fibrogénesis y contractibilidad celular, además de la quimiotaxis, pérdida de los retinoides y regulación de la MEC. La perpetuación es la etapa resultante de estímulos autocrinos y paracrinos así como de la remodelación acelerada de la MEC (Sarem et al., 2006).

Los miofibroblastos constituyen una fuente de síntesis de proteínas colágenas y no colágenas de la MEC, como colágeno I, III, IV, laminina, elastina, fibronectina y varios proteoglicanos. En las primeras etapas de la lesión a los hepatocitos ya se encuentra instalada una creciente deposición de colágeno III, IV y fibronectina en el espacio perisinusoidal. Diversas sustancias y agentes fibrogénicos sintetizados por las células inflamatorias y por los hepatocitos, se liberan durante el proceso inflamatorio, actúan sobre las HSC y median y mantienen el proceso fibrogénico. Uno de los mediadores profibrogénicos más importantes es el TGF- β ya que además de regular el depósito de la MEC como parte de la respuesta convencional a la lesión tisular, también es un mediador importante en la fibrosis, ya que provoca en las HSC activadas un aumento de la síntesis de fibras colágenas y estimula la síntesis de los componentes de la membrana basal, lo que ocasiona una “capilarización” de los sinusoides. La constante estimulación autocrina de las HSC por el TGF- β es un mecanismo esencial para el desarrollo de la fibrogénesis hepática (Sarem et al., 2006).

Sin embargo, en la lesión crónica, la activación persistente de las HSC conduce a la interrupción del equilibrio entre el depósito y la eliminación de la MEC y desencadena una fibrosis hepática progresiva. Asimismo, en la fibrosis avanzada, el alto número de HSC activadas y la contractibilidad de los miofibroblastos fomentan la constricción de los sinusoides hepáticos, lo que afecta el flujo sanguíneo y por lo tanto el intercambio de nutrientes y participa en la disfunción hepática. Además, la MEC no es inerte y también puede almacenar citocinas y factores de crecimiento secretados por los efectores celulares, lo que contribuye aún más a la inflamación, la fibrogénesis, la proliferación de hepatocitos y la carcinogénesis (Roehlen et al., 2020).

4. Antioxidantes

Se ha definido un antioxidante como cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones, en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o inhibe la oxidación del sustrato (Gutteridge, 1995). Otra definición de antioxidante es una sustancia que elimina ROS directamente o que de manera indirecta actúa para estimular las defensas antioxidantes o para inhibir la producción de ROS (Gülçin, 2020). Los organismos vivos, incluyendo el cuerpo humano, pueden protegerse mediante la eliminación de ROS a través de la producción de compuestos antioxidantes endógenos, además de utilizar los antioxidantes exógenos adquiridos mediante la dieta para así, eliminar los radicales libres (Gülçin, 2020).

4.1 Antioxidantes endógenos

Dado el potencial de daño tisular tan amplio que provoca el estrés oxidativo, el cuerpo ha desarrollado importantes mecanismos de defensa endógena antioxidante, la cual se clasifica en enzimática y no enzimática. Estas defensas pueden considerarse como celulares y extracelulares (Betteridge, 2000). Las enzimas dismutasa, peroxidasa y catalasa son defensas antioxidantes celulares muy importantes, así como la capacidad mitocondrial citocromo oxidasa que funciona catalíticamente en la cadena de transporte de electrones sin liberar especies reactivas de oxígeno para disminuir la producción intracelular de radicales libres. También se incluyen las superóxido-dismutasas (que contienen cobre y zinc en el sitio nativo) en citosol y mitocondrias (que contienen manganeso) que catalizan la dismutación del peróxido de hidrógeno y el oxígeno (Betteridge, 2000).

4.1.1 Antioxidantes endógenos enzimáticos y no enzimáticos

El cuerpo humano tiene un sistema complejo propio de enzimas naturales y defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas, que contrarrestan los efectos nocivos de la

sobreproducción de ROS (Guerra, 2001). Algunos ejemplos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Antioxidantes enzimáticos o primarios	Antioxidantes no enzimáticos o secundarios
Catalasa de los peroxisomas Glutación peroxidasa Superóxido dismutasa (SOD1 y SOD2)	Glutación

(Modificado de Guerra 2001).

Los sistemas enzimáticos son capaces de metabolizar los radicales libres provenientes de los procesos redox celulares mientras que los no enzimáticos son los “radical scavengers”, especies químicas que destruyen directamente los RL (Guerra, 2001). Los antioxidantes enzimáticos comprenden: las superóxido dismutasas (SOD1 y SOD2) que dismutan el O_2^- y lo convierten en H_2O_2 y O_2 ; la catalasa y la glutación-peroxidasa que descomponen el H_2O_2 ; las glutatións-S-transferasas, que pueden eliminar los intermediarios reactivos y los aldehídos lipídicos; las metalotioneínas, las hemo-oxigenasas, las tioredoxinas, la ceruloplasmina y la ferritina, que ayudan a eliminar metales tales como el hierro, que promueve las reacciones oxidativas. Así como, los antioxidantes no enzimáticos como el glutación, la ubiquinona, el ácido úrico y la bilirrubina (Urtasun & Nieto, 2007).

Es importante para la célula deshacerse de los productos resultantes de los procesos antioxidantes como las proteínas alteradas oxidativamente ya que representan una fuente generadora de nuevos RL y las proteasas celulares son las encargadas de esta función. Y por último los antioxidantes terciarios que son los encargados de restaurar las biomoléculas dañadas por los RL (Guerra, 2001).

4.2 Antioxidantes exógenos

Por otro lado, los antioxidantes también pueden ser obtenidos a través de la dieta y en conjunto con el sistema antioxidante endógeno, amplifican la respuesta de defensa ante

el daño oxidativo celular. Es por ello, que la suplementación y/o tratamiento con antioxidantes se ha adoptado para proteger contra varios estados fisiopatológicos en los que el estrés oxidativo se ha establecido como un mecanismo causal (Malireddy et al., 2012a). Los antioxidantes en alimentos previenen las reacciones en cadena de radicales de oxidación, y actúan inhibiendo el paso de iniciación y propagación que conduce a la terminación de la reacción adversa, retrasando así el proceso de oxidación (Gülçin, 2020; Shahidi & Wanasundara, 1992). En años recientes ha existido un gran interés por identificar fuentes alternativas naturales y seguras de antioxidantes alimentarios y naturales, especialmente de origen vegetal.

Un ejemplo de antioxidante exógeno muy eficaz es la vitamina E lipófila (α -tocoferol). Esta se incorpora en el núcleo lipídico de las membranas celulares ya que tiene la capacidad de eliminar los radicales peroxilo intermedios y, en consecuencia, interrumpe la reacción en cadena de la peroxidación de lípidos (Betteridge, 2000).

5. Alimentos funcionales

Los “alimentos funcionales”, refieren a los alimentos que otorgan al organismo nutrientes como vitaminas, grasas, proteínas y carbohidratos necesarios para la supervivencia y que ayudan en la prevención y/o tratamiento de enfermedades (Brower, 1998). Desde la antigüedad se ha reconocido la importancia de los factores dietéticos en el estado de salud, sin embargo, los estudios epidemiológicos y clínicos más recientes han proporcionado un nuevo enfoque para descubrir los mecanismos tanto químicos como fisiológicos de los efectos de los compuestos alimenticios en la salud humana. Por lo tanto, se han generado nuevos conocimientos para desarrollar tecnologías con el fin de aislar, purificar, identificar y caracterizar componentes biológicamente activos en los alimentos, que son los responsables de la eficacia del alimento en la promoción de la salud y la prevención de enfermedades (Shahidi, 2009) y es así como se ha acuñado el término “nutracéutico” a partir de las palabras “nutrición” y “farmacéutico” (Defelice, 2000), se refiere a “la parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o de salud, incluida la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad” (Brower, 1998).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Cuando los alimentos funcionales se modifican para su distribución, se denominan nutraceuticos e incluyen píldoras, cápsulas, pociones y líquidos que se sabe son el compuesto activo de los alimentos (Brower, 1998; Kalra, 2003). Tanto los alimentos funcionales como los nutraceuticos poseen beneficios fisiológicos demostrados (Shahidi, 2009). Es entonces cuando se denotan los atributos de los alimentos nutraceuticos ya que además de complementar la dieta, ayudan en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos; su uso reduce los altos costos en medicamentos prescritos y los ayuda a consolidarse en el mercado mundial de agentes terapéuticos, además los efectos secundarios por su ingesta son casi inexistentes en comparación con otros compuestos terapéuticos (Kalra, 2003).

5.1 Uso en enfermedades asociadas al estrés oxidativo

Los beneficios para la salud de los alimentos funcionales y nutraceuticos residen en varios aspectos, que incluyen la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y procesos inflamatorios, además de la mejora de la respuesta inmune, así como estrés oxidativo celular, es decir, el retraso del proceso de envejecimiento y la extensión de una vida saludable. Se han descubierto una infinidad de posibles propiedades funcionales y fisiológicas de sustancias bioactivas de origen vegetal (Shahidi, 2009). Estas sustancias bioactivas son llamadas “fitoquímicos”.

Asimismo, el consumo de frutas y verduras se ha asociado con un riesgo reducido de algunas enfermedades crónicas, incluida la aterosclerosis coronaria más peligrosa. Los estudios epidemiológicos han demostrado una asociación inversa entre la ingesta de frutas y verduras y la mortalidad por enfermedades relacionadas con la edad, como la enfermedad coronaria y el cáncer, lo que se atribuye a su actividad antioxidante. Los principales compuestos bioactivos de estas fuentes naturales son especialmente los fenoles, flavonoides y pigmentos que son los responsables de sus beneficios para la salud. Las propiedades antioxidantes de los fenoles son responsables de la inhibición de la oxidación del colesterol de lipoproteínas de baja densidad (Gülçin, 2020).

6. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios de las plantas (fitoquímicos) son todas aquellas moléculas que no están relacionadas con la supervivencia de éstas, es decir, que no están involucradas con las funciones de fotosíntesis, respiración y crecimiento. Otros fitoquímicos que se encuentran en concentraciones muy altas en algunas especies, se denominan metabolitos secundarios; algunos tienen un papel clave en la protección de las plantas contra los herbívoros y la infección microbiana, como atrayentes para los polinizadores y los animales que dispersan semillas, como agentes alelopáticos, protectores UV, etc. Sin embargo, los metabolitos secundarios también son de interés debido a su uso como tintes, fibras, pegamentos, aceites, ceras, agentes saborizantes, fármacos y perfumes, y se consideran fuentes potenciales de nuevos fármacos naturales, antibióticos, insecticidas y herbicidas (Croteau, 2000).

En los últimos años, el papel de los metabolitos secundarios como componentes de la dieta se ha convertido en un área muy importante de investigación en nutrición humana, ya que se ha postulado que su ingesta moderada a largo plazo puede disminuir la incidencia de enfermedades crónicas (Crozier et al., 2007).

Las tres clases principales de fitoquímicos con actividad biológica son los terpenoides, metabolitos fenólicos y alcaloides, además de otros componentes de plantas que contienen nitrógeno como los pigmentos betalaínicos.

6.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos vegetales secundarios presentes de forma natural en todas las partes de las plantas, incluidas frutas, verduras, semillas, nueces, hojas, raíces, harinas y cortezas. Se cree que estos compuestos son una parte integral de la dieta humana y animal (Gülçin, 2020). Son una clase importante de agentes bioactivos contenidos en plantas que tienen una alta capacidad antioxidante, también poseen una variedad de otros mecanismos relacionados con la diferenciación celular, la desactivación de pro-carcinógenos, reparación de ADN, inhibición de la formación de N-nitrosamina, entre otros (Shahidi, 2004).

Para lograr el efecto antioxidante, los principales mecanismos que los compuestos fenólicos poseen son la eliminación de radicales libres y la quelación de metales (Shahidi, 2009). Los fenoles simples y sus derivados, como los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos y lignina poseen la capacidad de eliminar RL y apagar las ROS, debido a ello, proporcionan medios efectivos para prevenir y tratar enfermedades que usan la producción de radicales libres como su principal mecanismo patógeno (Shahidi, 2009). Así mismo, los compuestos fenólicos pueden prevenir la oxidación del colesterol LDL a su forma aterogénica y, por lo tanto, brindar protección contra las enfermedades cardiovasculares. La agregación antiplaquetaria y las propiedades vasodilatadoras de los fenólicos también contribuyen a su capacidad cardioprotectora (Shahidi, 2009). Además, estos compuestos también inhiben la metástasis mediante diversos mecanismos, por lo tanto, son efectivos para tratar cánceres de distintas naturalezas (Indap et al., 2006; McCann et al., 2007; Yi et al., 2005) y por si fuera poco también pueden funcionar como filtros UV y agentes de señalización. En general, los efectos producidos por los alimentos nutraceuticos se deben a un cóctel de fitoquímicos presentes que actúan de manera sinérgica (Shahidi, 2009).

6.1.1 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos cuya estructura comprende quince carbonos, con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Son los más numerosos de los fenoles y se encuentran en todo el reino vegetal (Harborne, 1995). Están presentes en altas concentraciones en la epidermis de las hojas y la piel de los frutos y tienen papeles importantes y variados como metabolitos secundarios. El esqueleto básico de flavonoides puede tener numerosos sustituyentes. Los grupos hidroxilo suelen estar presentes en las posiciones 4', 5 y 7. Los azúcares son muy comunes y la mayoría de los flavonoides existen naturalmente como glucósidos. Mientras que tanto los azúcares como los grupos hidroxilo aumentan la solubilidad en agua de los flavonoides, otros sustituyentes, como los grupos metilo y las unidades de isopentilo, hacen que los flavonoides sean lipofílicos (Crozier et al., 2007).

Se han estudiado ampliamente varios flavonoides desde las perspectivas de la protección de la salud y la utilidad farmacológica. Los flavonoides han sido analizados como moduladores de la respuesta inmune e inflamatoria, por su impacto en la función del músculo liso, como agentes anticancerígenos, antivirales, antitóxicos y hepatoprotectores por sus funciones antibacterianas, antivirales, analgésicas, antialérgicas, citostáticas, apoptóticas, estrogénicas y antiestrogénicas (Croteau, 2000; Malireddy et al., 2012b). Además, existe un considerable interés en el uso de isoflavonoides en la prevención del cáncer.

6.2 Betalaínas

Las betalaínas también son consideradas metabolitos secundarios con actividad biológica. Son pigmentos N- heterocíclicos vacuolares que están compuestos de una estructura central nitrogenada, ácido betalámico (ácido 4- (2-oxoetilideno) - 1,2,3,4 tetrahidropiridin-2,6-dicarboxílico) que se condensa con compuestos imino (ciclo-DOPA y/o sus derivados de glucosilo) o aminas y/o sus derivados para formar betacianinas violetas, como la betanina y betaxantinas amarillas, como la indicaxantina, respectivamente. Se han elucidado las estructuras de 75 diferentes betalaínas provenientes de plantas bajo el orden *Caryophyllales* (Khan, 2015). La biosíntesis del ácido betalámico partir de la tirosina y su unión a las diferentes estructuras a las que se une para dar lugar a las betacianinas o betaxantinas, se muestra en la figura 2.

En la biosíntesis completa de las betacianinas, se integran las rutas de generación de seco-DOPA y de ácido betalámico a partir de dos moléculas de L-Tirosina. Posteriormente, se genera la unión espontánea de ciclo- DOPA con ácido betalámico por medio de una base de Schiff para, consecuentemente, sintetizar betanidina, la cual puede transformarse en betanina por medio de una enzima llamada glucosil-transferasa específica para realizar dicha glucosilación (García Carmona, 2016).

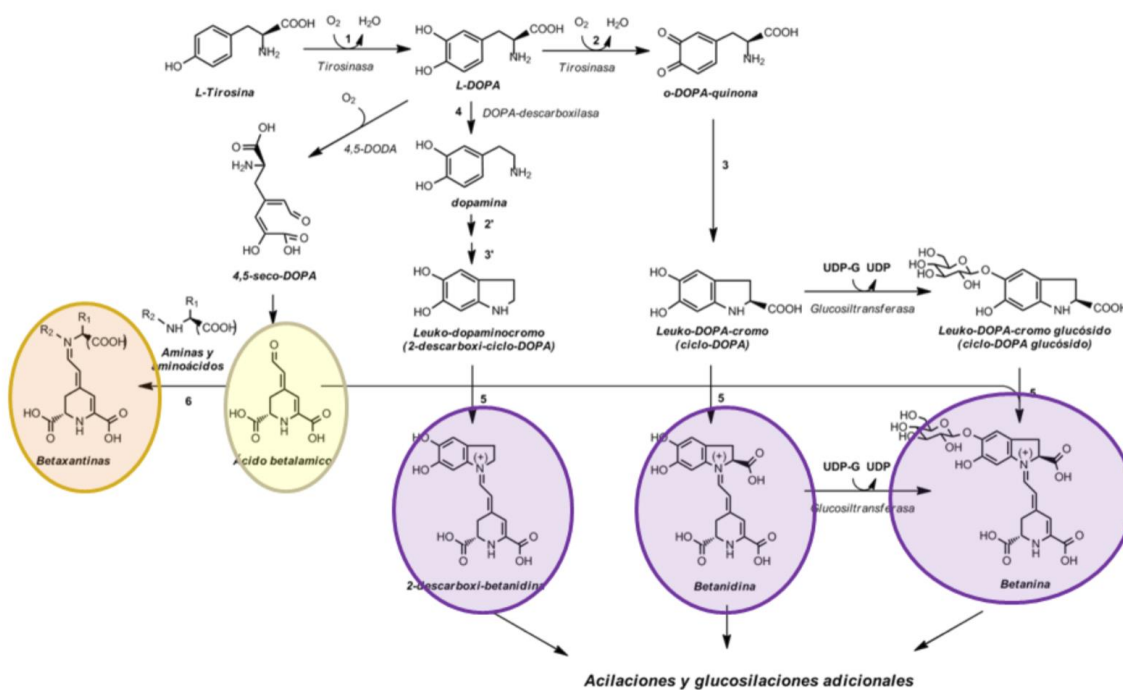


Figura 2. Biosíntesis de betacianinas.

En 1998 se caracterizó por primera vez la capacidad antirradical de las betalaínas y se ha correlacionado la actividad de eliminación de radicales y el contenido de betalaínas en los extractos de plantas crudas (Čanadanović-Brunet et al., 2011; Czapski et al., 2009; Vulić et al., 2012, 2014). La potente capacidad de eliminación de radicales de la betanina radica en la energía de disociación del enlace homolítico O-H fenólico y el potencial de ionización. Se ha revelado una mayor capacidad de donación de hidrógeno y electrones a pH>4, ya que a pH básico están presentes formas mono, di y tri desprotonadas (Gliszczynska-Świgło et al., 2006). Esta dependencia de pH en la respuesta antioxidante de todas las betalaínas es explicada por el pKa del ácido betalámico (6.8). Además, se ha reportado que cada molécula de ácido betalámico puede reducir dos moléculas de Fe³⁺ a Fe²⁺ (Gandía-Herrero et al., 2012). Es decir, podría donar 2 electrones a un agente oxidante. Adicional a la capacidad de eliminación de radicales conferida por la estructura central, la presencia de grupos hidroxilo fenólicos también se relaciona con una capacidad de eliminación de radicales más alta (Khan, 2015). Por otra parte, se le adjudica la gran capacidad antioxidante de la betanina a su naturaleza monofenólica y a sus productos de oxidación, ya que actúan como intermediarios reductores que confieren

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

a la molécula un potencial mayor de donación de H⁺ o e⁻ (Butera et al., 2002). En resumen, se ha demostrado que la capacidad de eliminación de radicales libres de la betanina aumenta en presencia de un grupo hidroxilo fenólico, mientras que la glicosilación la inhibe y la acilación no tiene efecto alguno sobre esta capacidad (Gandía-Herrero et al., 2010; Taira et al., 2015).

La betanina y la betanidina han demostrado ser inhibidores eficientes de la peroxidación lipídica de membrana y la oxidación de LDL, además cabe mencionar que la eficacia de la betanina fue superior que la betanidina (Kanner et al., 2001). En otro estudio se menciona que la betanina puede inhibir el 71% de la peroxidación lipídica en un sistema de liposomas (Reddy et al., 2005). En otro estudio, los eritrocitos enriquecidos con betalaína fueron más resistentes a la peroxidación de lípidos de membrana inducida por hidroperóxido de cumeno (Tesoriere et al., 2004).

Por otro lado, existe una deficiencia de datos sobre la biodisponibilidad de las betalaínas ya que la literatura disponible tiene muchas discrepancias en la biodisponibilidad (%) y la cinética plasmática, ya que los estudios realizados hasta el momento no han considerado la distribución de tejidos y los productos de la biotransformación (Khan, 2015).

6.2.1 Betacianinas/ Betanina

El pigmento betanina es uno de los compuestos más abundantes entre las betalaínas (Gliszczyńska-Świgło et al., 2006). Algunos estudios han demostrado que la betanina contenida en el extracto de *Beta vulgaris* tiene propiedades de eliminación de radicales y como antioxidantes naturales, en consecuencia, poseen la capacidad de prevenir y/o tratar enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Azeredo, 2009). Se ha estudiado la importante capacidad antioxidante de este pigmento y se le ha adjudicado a su habilidad para donar electrones (Kanner et al., 2001). Otro de los mecanismos descubiertos es mediante la inducción de la síntesis de glutatión en eritrocitos humanos (Tesoriere et al., 2004). Otro de los beneficios de la betanina es su efecto sobre las

lipoproteínas de baja densidad, evita su oxidación (Kanner et al., 2001; Tesoriere et al., 2003), reduciendo así, los biomarcadores de lipoperoxidación (Tesoriere et al., 2004). En los linfocitos humanos disminuye el daño a ADN inducido por la molécula oxidante H₂O₂ (Siriwardhana et al., 2006). Asimismo, en hepatocitos humanos, el tratamiento con betanina activó la vía de señalización dependiente del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) (NRF2-ARE) (Krajka-Kuźniak et al., 2013).

También se han realizado estudios *in vitro* con betanina; en uno de ellos la betanina aplicada a células hepáticas de rata aumentó la quinona reductasa (Wettasinghe et al., 2002). Los ensayos de alimentación con ratas mostraron que el jugo de remolacha rico en betanina mitiga la hepatotoxicidad hepática causada por N-nitrosodietilamina (NDEA), el tetracloruro de carbono (Han, Gao, et al., 2014; Kujawska et al., 2009), como resultado del estado antioxidante potenciado y la sobre expresión de la enzima quinona reductasa de fase II (Szaefer et al., 2014); la toxicidad hepática se vió compensada de manera eficiente por los efectos protectores de la betanina, el restablecimiento de la expresión de la enzima citocromo P450, la mejora del estado redox hepático y la restauración de las funciones mitocondriales (Han, Gao, et al., 2014; Han, Zongju, et al., 2014).

En ratones alimentados con extracto de remolacha roja, la betanina tiene efectos antiinflamatorios al inhibir la ciclooxigenasa- 2 (Reddy et al., 2005). Se ha sugerido que la betanina puede tener un efecto protector en el hígado de las ratas tratadas con paraquat, herbicida altamente tóxico (Han et al., 2015; Han, Zongju, et al., 2014). Otro estudio asegura que la presencia de betalaínas, específicamente betanina conduce a una reducción en la producción de ROS, daño en el ADN y modificaciones en el metabolismo oxidativo de los neutrófilos Q.

6.3 Vitaminas C y E

6.3.1 Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico es un nutriente necesario que participa en una variedad de funciones biológicas. Debido a que los seres humanos han perdido la capacidad de sintetizarla, dependen de la dieta como fuente de vitamina C para prevenir condiciones patológicas por su deficiencia, como el escorbuto y para mantener la salud general. Los efectos benéficos que brinda, se deben, sobre todo a que es un cofactor para muchas enzimas, en especial, aquellas involucradas en la síntesis de colágeno además de su importante actividad antioxidante (Traber & Stevens, 2011). Se ha reportado que es un potente eliminador de ROS en plasma y en hígado (Abhilash et al., 2014), lo que explica también su capacidad para proteger a las membranas biológicas contra la lipoperoxidación, mediante la reducción de un electrón de los radicales hidropoxilo lipídicos a través del ciclo redox de la vitamina E (Traber & Stevens, 2011).

Como antioxidante, la vitamina C brinda protección contra el daño celular inducido por el estrés oxidativo mediante la eliminación de especies reactivas de oxígeno, la neutralización de los radicales hidropoxilo lipídicos dependiente de la vitamina E y la protección de las proteínas contra la alquilación por productos electrofílicos de peroxidación lipídica. Estas bioactividades tienen relevancia para los trastornos inflamatorios. La vitamina C también desempeña un papel en la función de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) al reciclar el cofactor de eNOS, la tetrahidrobiopterina, que es relevante para la elasticidad arterial y la regulación de la presión arterial (Traber & Stevens, 2011).

6.3.2 Vitamina E

La vitamina E es un antioxidante importante que elimina radicales peroxilo y previene la propagación de radicales libres en las membranas y en las lipoproteínas plasmáticas. Cuando se forman radicales peroxilo (ROO^{*}), estos reaccionan 1000 veces más rápido

con la vitamina E (Vit E-OH) que con los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que forman las membranas biológicas. El grupo hidroxilo del tocoferol reacciona con el radical peroxilo para formar el correspondiente hidroperóxido lipídico y el radical tocoferilo (Vit E-O[•]). El radical tocoferilo (Vit E-O[•]) reacciona con la vitamina C (u otros donantes de hidrógeno), oxidando esta última y devolviendo la vitamina E a su estado reducido. Los síntomas humanos de la deficiencia de vitamina E sugieren que sus propiedades antioxidantes juegan un papel importante en la protección de las membranas de los eritrocitos y los tejidos nerviosos (Traber & Stevens, 2011).

7. Género *Opuntia*

El género *Opuntia* posee una gran importancia cultural y nutricional, se distribuye ampliamente en México, específicamente en la Sierra Madre Oriental, la Mesa del Centro y el Eje Neovolcánico (Torres-Bojórquez et al., 2017). Está conformado por 189 especies silvestres aproximadamente, 83 de ellas se distribuyen de manera ubicua en México y 29 se encuentran en la zona centro-norte de México, en parte de los estados de Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas, Ciudad de México y Aguascalientes (Reyes-Agüero et al., 2005) ya que el clima semiárido endémico de esta región favorece su propagación. El género ha ofrecido beneficios al hombre y tanto su distribución cosmopolita como el amplio aprovechamiento de sus componentes (fruto y cladodios) en su totalidad, han impulsado investigaciones sobre las propiedades nutricionales de su fruto, la tuna, sobre todo su capacidad antioxidante (Castellanos-Santiago & Yahia, 2008) y/o para el aislamiento de metabolitos secundarios, entre ellos betalaínas y carotenoides (Patel, 2012).

La tuna es ovoide, posee pericarpio grueso, con pulpa jugosa y dulce, con abundantes semillas (Torres-Bojórquez et al., 2017). Su consumo aporta lípidos, proteínas, minerales, fibra, aminoácidos, vitamina C, compuestos fenólicos y pigmentos betalaínicos (Sumaya-Martínez et al., 2011), así mismo, debido a las altas concentraciones de agentes antioxidantes se han considerado como alimento funcional (Torres-Bojórquez et al., 2017). Uno de los componentes predominantes en la tuna son

las llamadas betalainas que son pigmentos solubles en agua e incluyen betacianinas (color rojo- violeta) y betaxantinas (color amarillo), el color evidente del fruto está dado por la concentración y el tipo de betalainas presentes (Castellanos-Santiago & Yahia, 2008). Dichos pigmentos muestran una actividad antioxidante importante y un potencial uso como pigmentos naturales (Ramírez-Ramos et al., 2015). Se cree que las Cactaceas, sobre todo el género *Opuntia*, son una excelente fuente de betalainas (Stintzing & Carle, 2004).

7.1 *Opuntia robusta*

Opuntia robusta es originaria de México Central (Britton N & Rose J, 1919), zona árida de los estados del área central como Zacatecas, Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí, Guanajuato y Michoacán (Bravo- Hollis H, 1978). Se trata de una planta arbustiva, ramosa, de 1 a 2 metros, con tronco bien definido, artículos orbiculares de 25 a 40 centímetros de longitud, robustos, color verde azulado claro, espinas vigorosas, de 5 centímetros de longitud, amarillentas en la base y blancas hacia la extremidad, flores amarillas grandes, de 5 a 7 centímetros de ancho, lóbulos del estigma verdes, fruto globoso o elíptico, al principio tuberculado, de 7 a 11 centímetros de longitud, purpurino o con tinte verdoso. *Opuntia robusta* pertenece al género *Opuntia* de la familia Cactaceae, que es característico por su alta adaptabilidad a una gran diversidad de climas y tierras. *Opuntia robusta* es bien conocida por su potencial nutricional para mitigar escasez de alimentos y agua en áreas propensas a la sequía (Chaouch et al., 2016).

II) ANTECEDENTES

2.1 Tioacetamida

La tioacetamida (TAA) es un compuesto ampliamente utilizado para simular el daño generado en la patogenia de la fibrosis hepática. TAA aumenta la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de su metabolito, el tioacetamida disulfóxido (TASO₂), que causa estrés oxidativo severo junto con la peroxidación de lípidos y la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

generación de carbonilos de proteínas y aductos con el ADN (Yuan & Kaplowitz, 2013). El estrés oxidativo en el hígado provoca la activación de las HSC debido a las ROS producidas durante el metabolismo de TAA. Las ROS proporcionan señales de activación paracrina que inducen la transdiferenciación de HSC en células similares a miofibroblastos que provocan un desequilibrio en la síntesis y degradación de EMC (Novo et al., 2010), perpetuando el proceso fibrótico.

TAA es un compuesto que contiene tio-azufre. En 1943, se utilizaba como antifúngica para naranjos y apareció contaminando el jugo de naranja (Cascales Angosto & Ferrandiz García, 1987). Fitzhugh y Nelson en 1984 lo informaron por primera vez como hepatotóxico (Fitzhugh & Nelson, 1948). Una dosis única de esta sustancia en animales es capaz de generar necrosis centrolobulillar con posterior respuesta regenerativa (Mangipudy et al., 1995; Okuyama et al., 2005). Mientras que su administración crónica puede conducir a fibrosis hepática, eventual cirrosis hepática y hepatocarcinoma (Low et al., 2004; Moreira et al., 1995; Natarajan et al., 2006). Las ventajas de usar TAA como modelo de xenobiótico hepático es que tiene una gran afinidad por el hígado, específicamente para el área perivenosa y un periodo considerable entre sus efectos necrogénicos y la insuficiencia hepática (Chilakapati et al., 2005; Mehendale, 2005).

Uno de los mecanismos efectuados por la TAA consiste en la formación de aductos, en el cual los metabolitos reactivos tienen la facultad de unirse covalentemente a macromoléculas celulares. Por otro lado, la producción de ROS resultante de la administración de TAA es seguida por la peroxidación de lípidos de membrana celular, agotamiento de los principales sistemas antioxidantes como el glutatión y la reducción de grupos tiol SH (Lotková et al., 2007; Sanz et al., 2002; Zaragoza et al., 2000). Sin embargo, no es el único mecanismo mediante el cual TAA produce daño hepático, también realiza una movilización el calcio de sus almacenes intracelulares (Diez-Fernandez et al., 1996). La convergencia entre el aumento de la formación de ROS y un desequilibrio en la homeostasis del calcio pueden inducir un aumento en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, interrumpir el potencial de la misma y en consecuencia, inhibir la respiración mitocondrial (Bernardi et al., 2001). Es evidente que

la TAA afecta el metabolismo de la energía mitocondrial (Cervinkova 1998, n.d.; Möller & Dargel, 1985), por ello se cree la mitocondria podría jugar un importante papel en la hepatotoxicidad inducida por TAA (Moronvalle-Halley et al., 2005; Okuyama et al., 2005).

TAA también aumenta la producción de fibras de colágeno, activa las HSC e induce mediadores pro-fibrogénicos involucrados en las vías del factor de crecimiento transformante (TGF- β 1) canónico y no canónico, incluido el factor nuclear (NF- κ B) y la producción de citocinas proinflamatorias, malondialdehído (MDA) y 4- hidroxinonenal, en contraste con el glutatión (GSH/ GSSG) y el factor eritroide nuclear (Nrf2) los cuales disminuyen (Ramos-Tovar et al., 2019). Pero los mecanismos de daño hepático por excelencia de la TAA son el estrés oxidativo y la inflamación. El estrés oxidativo tiene como particularidad en el hígado, la activación de las HSC; las ROS producidas por el metabolismo de TAA brindan señales de activación paracrina para inducir la transdiferenciación a macrófagos, la proliferación, migración y síntesis de proteínas de la matriz extracelular (Novo et al., 2010).

TAA debe ser activada metabólicamente para ejercer su daño, mediante su metabolito tóxico, tioacetamida disulfóxido (TASO₂) (Cascales Angosto & Ferrandiz García, 1987). La tioacetamida se biotransforma mediante la acción catalítica de una monooxigenasa microsomal de acción mixta perteneciente al citocromo P450, la CYP2E1 (Chilakapati et al., 2007). Dicha activación metabólica de TAA promueve la formación de su metabolito reactivo, TASO₂ por ROS generadas como intermediarios (Andrés et al., 2003; Chilakapati et al., 2007). TAA es bioactivada por CYP2E1 a TAA sulfóxido (TASO), (primer paso) y a tioacetamida disulfóxido altamente reactivo (TASO₂) (segundo paso), que inicia la necrosis hepática por enlace covalente (Chilakapati et al., 2007) (Figura 3). Los derivados de acetamidinolisina son los responsables de los efectos hepatotóxicos inducidos por TAA ya que su metabolito reactivo TASO₂ se une covalentemente a proteínas, favoreciendo la formación de estos compuestos (Dyroff & Neal, 1981).

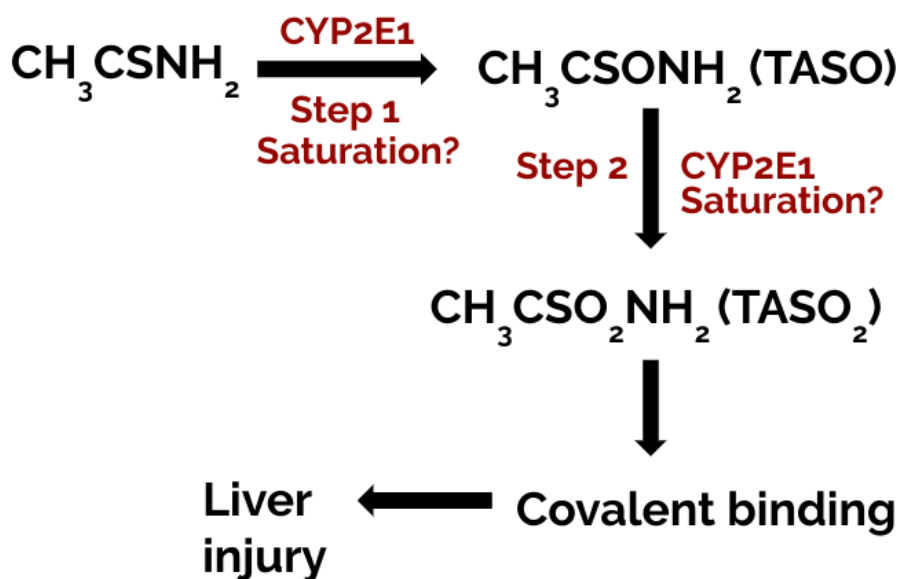


Figura 3. Mecanismo de daño del metabolito tóxico TASO₂. (Chilakapati *et al.* 2005).

El modelo de daño hepático con TAA presenta un lapso de tiempo muy amplio entre elevaciones significativas de los marcadores de enzimas séricas de la lesión y la insuficiencia hepática que conduce a la muerte, tiempo que permite realizar todo tipo de mediciones de evaluaciones de marcadores de daño (Chilakapati *et al.*, 2007).

2.2 Evaluaciones previas de la capacidad antioxidante del fruto de *Opuntia robusta* (Or)

Se ha reportado que la ingesta regular del fruto de *Opuntia robusta* (Or) reduce significativamente el daño oxidativo *in vivo* en un grupo de pacientes con hipercolesterolemia familiar (Budinsky *et al.*, 2001). Poblaciones con altos índices de síndrome metabólico y diabetes mellitus, han empleado la pulpa del fruto de *O. robusta* (OrP) como compuesto hipoglucemiante por generaciones (Fрати-Munari *et al.*, 1988), en dichos individuos se ha monitoreado una disminución significativa del colesterol LDL, así como un decremento sustancial de isoprostanos en orina, suero y plasma.

En el área del sur de Arizona y las partes vecinas del norte de México, se usa Or en la medicina tradicional de los nativos americanos (Budinsky *et al.*, 2001) y se ha

demostrado que esta intervención nutricional muestra acciones hipoglucémicas (Fratimunari et al., 1988) e hipolipidémicas (Fernandez et al., 1992; Wolfram et al., 2002) incluso a nivel del receptor de LDL (Fernandez et al., 1992, 1994). Individuos con peso ideal que padecen hipercolesterolemia familiar, han mostrado efectos benéficos de Or en el daño oxidativo *in vivo* (Budinsky et al., 2001). También se ha documentado que su consumo regular mejora la función de las plaquetas (Wolfram et al., 2003).

Por otro lado, se ha demostrado que, en México, el contenido de compuestos con actividad biológica de Or, es más abundante en comparación con otros cultivares, (González-Ponce et al., 2016; Yahia & Mondragon Jacobo, 2011). Yahia & Mondragón, 2011 concluyeron, mediante los ensayos FRAP y DPPH que las betalaínas, la vitamina C y los compuestos fenólicos son los encargados de la capacidad antioxidante y a su vez, se ha demostrado que Or es una de las especies con mayor concentración de estos metabolitos en comparación con otras especies de *Opuntia*, entre ellas, *Opuntia streptacantha*. Asimismo, el extracto de Or presentó alta capacidad antioxidante evaluada con los métodos DPPH, FRAP y ABTS. Asimismo, las enzimas ALT y AST, la albúmina sérica y el antioxidante endógeno GSH mostraron actividad muy parecida a los controles comparados contra los grupos administrados con sobredosis aguda de acetaminofén (González Ponce et al., 2020; González-Ponce et al., 2016) y diclofenaco (Villa-Jaimes et al., 2022) en ratas, sugiriendo su importante capacidad hepatoprotectora. Se ha observado una disminución significativa en la concentración de triglicéridos en ratas hiperglucémicas que recibieron jugo de fruto de *Opuntia robusta* (OrE) (Zenteno Ramírez, 2016) el cual también tiene efecto contra cáncer de colon, próstata e hígado (Chavez-Santoscoy et al., 2009). Por otro lado, se ha demostrado en estudios anteriores que el consumo diario de Or también facilita la detoxificación hepática y puede ser considerada para el tratamiento de NAFLD (González-Ponce et al., 2016). En México, *Opuntia robusta* es una especie silvestre y no existe amenaza contra su distribución (Hernández et al., 2017).

III) JUSTIFICACIÓN

La fibrosis hepática es una enfermedad inflamatoria crónica, asociada a un aumento significativo de las tasas de morbilidad que contribuye al 45% de mortalidad a nivel mundial. Actualmente no existen terapias adecuadas para tratar su progresión (Berumen et al., 2020; Roehlen et al., 2020). México posee la prevalencia más alta de cirrosis descompensada en el continente americano y la mortalidad por esta patología ocupa el cuarto lugar a nivel nacional. Actualmente, su etiología se asocia principalmente a desórdenes metabólicos (Cisneros Garza et al., 2022), sin embargo, existen estímulos biológicos y químicos que conducen al proceso de fibrosis. El grupo de edad más susceptible oscila entre 50-70 años (Méndez-Sánchez et al., 2018), debido a presencia de patologías primarias crónico-degenerativas y el uso de fármacos. La alta incidencia y prevalencia de la fibrosis hepática y la relativa ineficacia de los tratamientos utilizados, establecen la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas para reducir el daño y prevenir su progresión.

Por otro lado, las especies del género *Opuntia* tienen gran importancia cultural y nutricional en México. Las especies de *Opuntia* poseen múltiples beneficios, y su amplia distribución ha impulsado la investigación sobre las propiedades nutricionales de sus frutos, las tunas (Castellanos-Santiago & Yahia, 2008; Patel, 2012), que se han propuesto como un alimento funcional. Se ha reportado que los compuestos bioactivos del fruto de *Opuntia robusta* (Or) brindan un importante efecto benéfico sobre la salud intestinal, cardiovascular y hepática, debido a sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Chang et al., 2008; Chavez-Santoscoy et al., 2009; Jiménez-Aguilar et al., 2015). Asimismo, este fruto se ha utilizado para tratar enfermedades degenerativas y metabólicas en cuya etiología esta presente el estrés oxidativo (Budinsky et al., 2001).

Se han reportado los efectos antioxidantes y hepatoprotectores de los extractos de Or sobre el daño hepático agudo generado por el estrés oxidativo inducido con paracetamol (González Ponce et al., 2020; González-Ponce et al., 2016) y diclofenaco (Villa-Jaimes et al., 2022). Debido a que el estrés oxidativo es un fenómeno común en el daño hepático agudo y crónico que puede conducir a la fibrosis, el objetivo de este estudio fue

determinar las propiedades nutraceuticas y los efectos antioxidantes, hepatoprotectores y antifibróticos de Or en un modelo de fibrosis hepática inducida con TAA en rata.

IV) HIPÓTESIS

En un modelo de fibrosis hepática no alcohólica en rata, los componentes del fruto *Opuntia robusta* poseen efecto hepatoprotector.

V) OBJETIVO

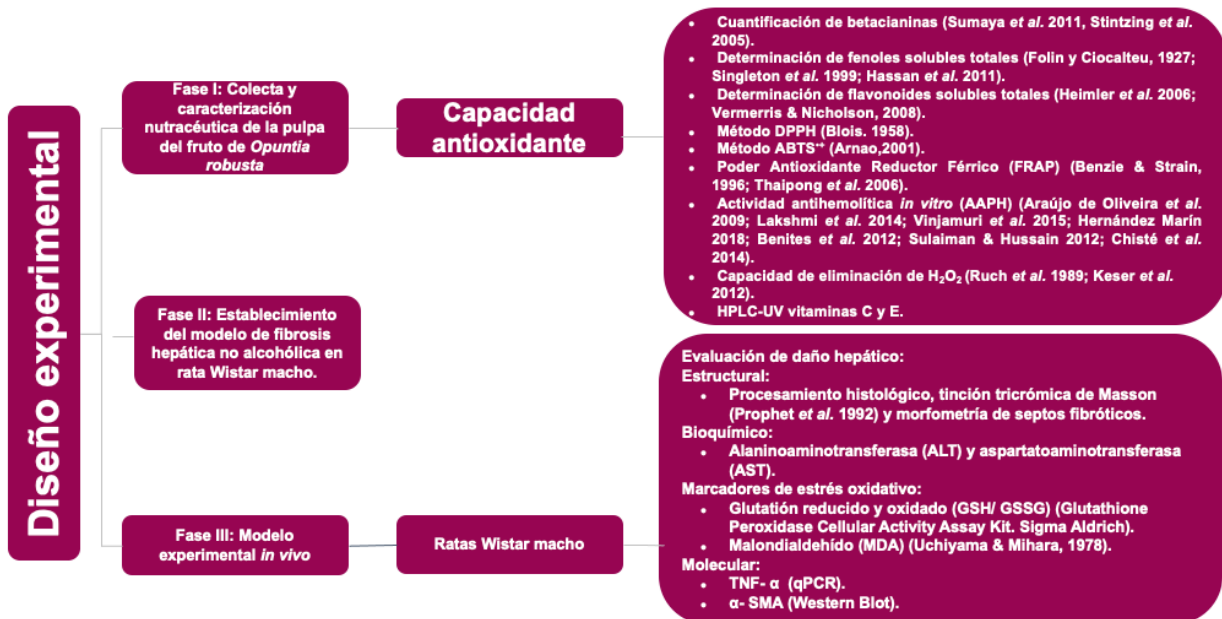
Evaluar el efecto hepatoprotector del fruto de *Opuntia robusta* en un modelo de fibrosis hepática no alcohólica.

VI) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

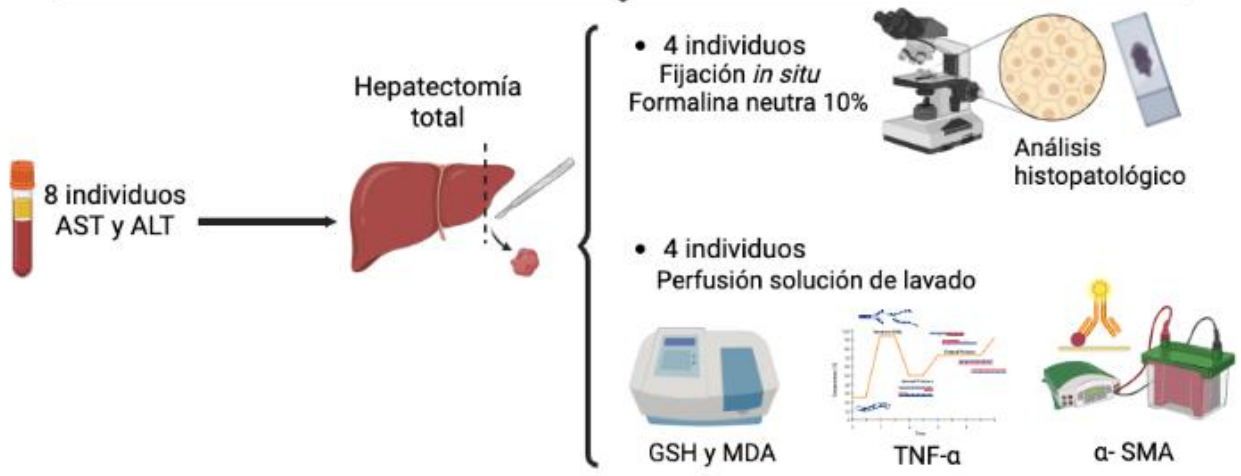
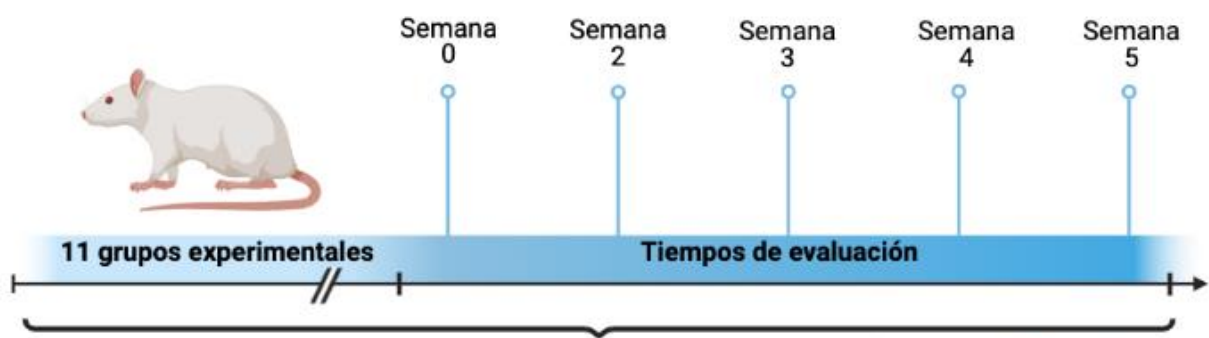
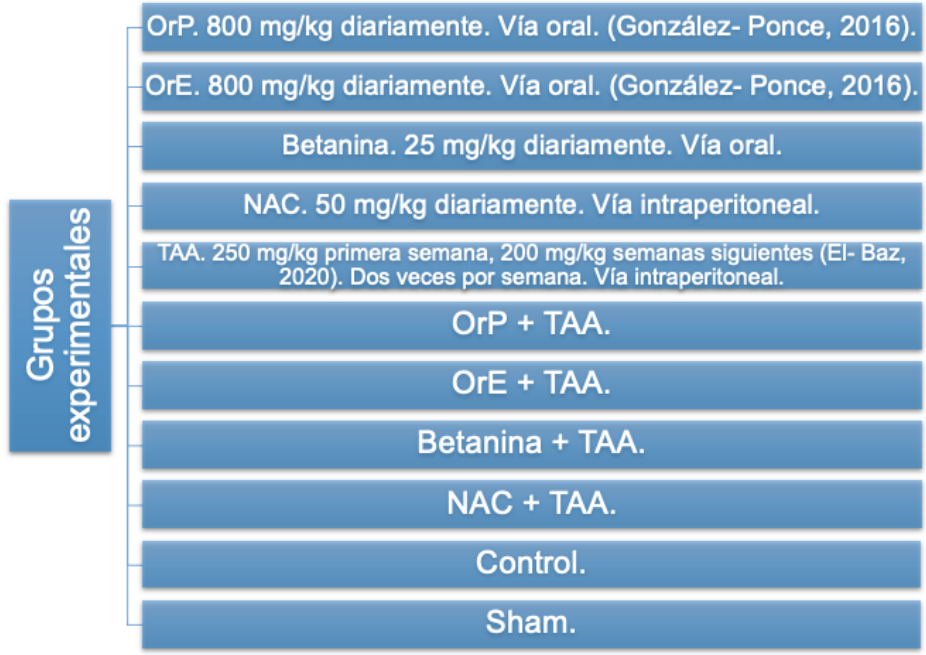
- Caracterizar la capacidad nutraceutica de la pulpa del fruto de *Opuntia robusta*.
- Establecer el modelo de fibrosis hepática no alcohólica en rata Wistar macho adulto.
- Evaluar el efecto hepatoprotector del tratamiento con el extracto y la pulpa del fruto de *Opuntia robusta*, mediante marcadores de daño bioquímico, estructural y molecular en un modelo de fibrosis hepática no alcohólica.

VII) DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental estuvo constituido por tres fases, la primera fue la recolección del fruto de *Opuntia robusta* y la caracterización nutracéutica de su pulpa. La fase II constó del establecimiento del modelo de fibrosis hepática no alcohólica en ratas Wistar macho y por último la fase III, el desarrollo de los grupos experimentales, así como la evaluación de los marcadores estructurales, bioquímicos y moleculares de daño en tejido hepático.



Modelo experimental *in vivo*



VIII) METODOLOGÍA

8.1 Caracterización nutracéutica de Or

8.1.1 Colecta, extracción y almacenamiento

Se realizó la colecta de Or en la comunidad “Soledad de abajo”, El Llano, Aguascalientes, México (coordenadas 21°47'04.7"N 102°06'40.1"W), en tres diferentes fechas 2, 28 de Agosto de 2019 y 11 de Agosto de 2020. Los frutos fueron debidamente lavados y desinfectados con Microdyn® con la finalidad de evitar cualquier contaminación y para eliminar espinas.

8.1.1.1 Procedimientos de extracción

Se llevo a cabo la obtención tanto de OrE como de OrP a partir del fruto íntegro de la siguiente manera.

OrE: Se pesaron los frutos colectados íntegros, también se realizó el pesaje del fruto y de la cáscara, por separado. Se procedió a la homogeneización en licuadora Osterizer® 10 Speed Blender, procedimiento seguido del tamizaje del fruto para eliminar las semillas. Posteriormente, el material se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos a 4°C en centrífuga refrigerada de suelo Sorvall™ ST8 FR Thermo Fisher Scientific y después de hacer pasar a través de un filtro de papel Whatman 40 (tamaño de poro de 8 micras), se recuperó el sobrenadante, fracción soluble. Se cuantificaron los volúmenes obtenidos y se alicuotaron en tubos Falcon oscuros de 50 mililitros, 25 mililitros de extracto en cada uno de ellos.

OrP: Se realizó el pesaje de las unidades íntegras, sin cáscara y también de la cáscara, para conocer las proporciones en peso de cada uno de los componentes. OrP se obtuvo al eliminar solamente las semillas y esto se logró al prensar cada una de las tunas con un tamiz generado al doblar 3 veces una gasa quirúrgica Protect^{MR}, tejido 20 x 12. Se cuantificó y reportó el volumen de OrP obtenido de cada una de las unidades. Se dividió el volumen total en alícuotas de 25 mililitros en tubos Falcon oscuros de 50 mililitros.

Tanto OrE como OrP se liofilizaron en liofilizador Labconco® FreeZone 6 Liter Freeze Dry System (Labconco Corp., Kansas City, MO, USA) con la finalidad de evitar contaminaciones y facilitar la administración. Dichos liofilizados se almacenaron en ultracongelador Haier Biomedical a -80°C hasta su utilización.

8.1.1.2 Análisis bromatológico de OrP

El análisis bromatológico de OrP se realizó en la Estación Zootécnica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes siguiendo los protocolos recomendados por la AOAC. El contenido de fibra cruda se realizó de acuerdo al método oficial de la (AOAC, 1971), la fibra cruda bajo oficialidad del método (AOAC, 1977), el porcentaje de humedad de acuerdo a los métodos oficiales (Karl Fischer, 2001) y (Horwitz, 2002), la proteína cruda bajo el método (AOAC, 1969) y el contenido de cenizas de acuerdo a la (NMX-Y-093-1976).

8.1.1.3 Determinación de contenido de humedad de OrP

Se obtuvo el contenido de humedad de OrP mediante la técnica establecida por (Horwitz, 2002), la cual consiste en llevar la muestra a peso constante para determinar su porcentaje de agua y de sólidos totales. Se introdujeron pequeñas charolas de aluminio previamente pesadas en estufa Felisa® modelo FE-291AD serie 1604023, a una temperatura de 105°C durante 2 horas, posteriormente se colocaron por 15 minutos en un desecador para enfriar y se pesaron. Se repitió dicho procedimiento hasta que ya no se registró cambio en su peso, es decir, se llevó a peso constante. Se agregaron a las charolas 3 gramos de muestra aproximadamente, no sin antes registrar el peso exacto; se introdujeron en la estufa y después de 24 horas, se extrajeron y se dejaron enfriar en el desecador por 15 minutos. Se realizó el pesaje de las charolas para determinar el peso de la muestra seca al considerar el peso de éstas vacías.

8.2 Determinación *in vitro* de la capacidad antioxidante de OrP y OrE

8.2.1 Obtención de extracto metanólico de OrP

Para extraer la mayor cantidad de componentes con actividad biológica y antioxidante, se realizó una extracción metanólica de OrP, para lo cual, se pesaron en balanza analítica Sartorius M- power, 0.25 gramos de muestra seca (ó la equivalencia de muestra líquida para asegurar que se tiene dicho peso de sólidos) y se anotó el peso exacto, ya que este se usaría en cálculos posteriores; se añadieron 10 mL de metanol acuoso al 50% (v/v) pH 2.0 y se agitaron los tubos a temperatura ambiente durante 1 h en una plataforma de agitación orbital, posteriormente se centrifugaron los tubos a 1500 g por 10 min en centrífuga Hettich Zentrifugen EBA 200 a temperatura ambiente, recuperando el sobrenadante (extracto A) en un tubo Falcon de 50 mL oscuro. Al residuo insoluble se le agregaron 10 mL de acetona acuosa al 70% (v/v) y se resuspendió perfectamente con ayuda de Vortex- Genie 2 Scientific Industries, el cual se agitó nuevamente a temperatura ambiente por 1 h en plataforma de agitación orbital. Se centrifugaron los tubos a 1500 gravedades por 10 minutos a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante (Extracto B) en el mismo tubo Falcon de 50 mL oscuro donde se colocó el Extracto A y se aforó a 25 mL con mezcla alcohol- acetona (Mezcla 1:1 de metanol acuoso al 50% (v/v) pH 2.0 y acetona acuosa al 70% (v/v)).

De dichos extractos metanólicos, se determinó la presencia y concentración de fenoles y flavonoides solubles totales. Además, se evaluó su capacidad antioxidante mediante diversos ensayos, los cuales emplean distintos compuestos como formadores de radicales libres, entre ellos, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), 2,2'- azino- bis (ácido 3-etilbenzotiazolina- 6- sulfónico) (ABTS^{•+}), dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2 amidinopropano) y en el caso del método FRAP, la donación de electrones para estabilizar la molécula radical.

Se realizó una curva de calibración con cantidades conocidas de antioxidantes empleados como referencia para cada una de las técnicas, que mediante regresión

lineal, permitió obtener la ecuación de la recta para conseguir los valores de cada una de las muestras y hacer posible la comparación con dichos antioxidantes de referencia.

8.2.2 Determinación de betacianinas

La determinación de la concentración de betacianinas en las muestras de pulpa se realizó de acuerdo con Stintzing *et al.* 2005 (Stintzing *et al.*, 2005), con pequeñas modificaciones. Se realizaron diluciones de 1:30 y 1:40 con agua destilada, se leyó su absorbancia por triplicado a 538 nm y se aplicó la siguiente ecuación para cada valor:

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

Donde:

A: Absorbancia de la muestra.

FD: Factor de dilución.

PM: Peso molecular (550 g/mol).

ϵ : Coeficiente de extinción molar (60000 L/ (mol cm) en agua).

l: longitud de lectura de la celda.

8.2.3 Determinación de fenoles solubles totales

Se realizó la curva de calibración con concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 μ g de ácido gálico con un total de 4 repeticiones (Figura 4), mientras que de los extractos metanólicos de OrP se emplearon 250 μ L por triplicado y se añadieron 125 μ L de reactivo de fenol Folin-Ciocalteu 2N (Folin, 1912; Folin & Ciocalteu, 1927; Singleton *et al.*, 1999); después de 6 minutos se agregó carbonato de sodio al 7% (Na_2CO_3), y se sometió a reposo durante 90 minutos. Transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron en microcentrífuga Micro 2000 Clay Adams™ Becton Dickinson a 12,000 rpm por 3 minutos y se leyeron en espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Scientific a λ 757 nm.

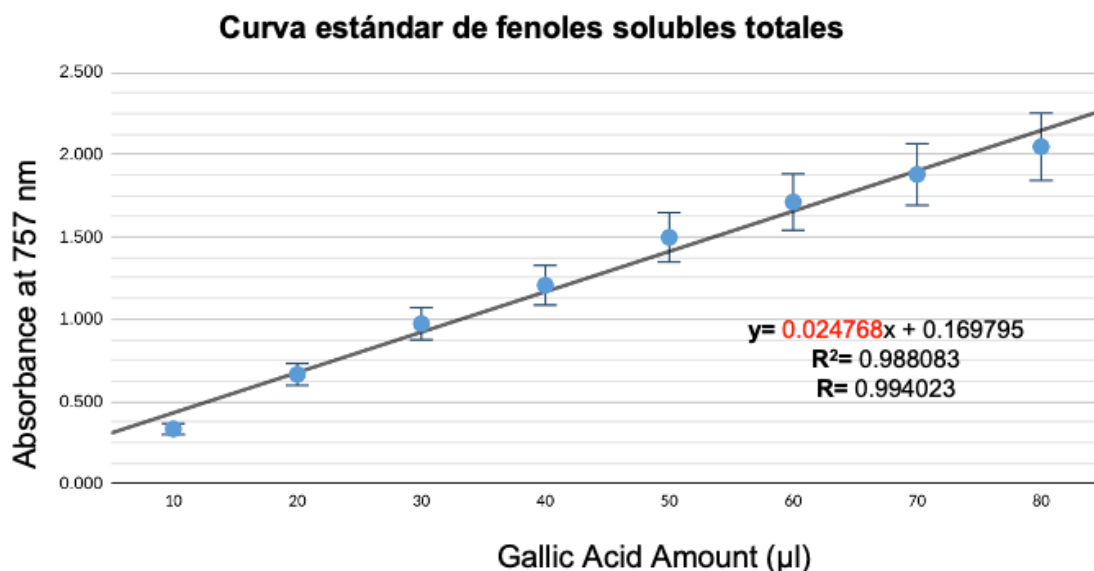


Figura 4. Curva patrón de fenoles solubles totales usando concentraciones conocidas de ácido gálico y las absorbancias promedio de las cuatro repeticiones; se muestran los valores de coeficientes m, b, R^2 y R.

8.2.4 Determinación de flavonoides solubles totales

Se elaboró la curva de calibración con 4 repeticiones y con el compuesto antioxidante estándar, catequina a concentraciones 0, 3.33, 8.33, 16.67, 33.33, 50.00, 66.67, y 83.33 µg (Figura 5); se utilizaron dos volúmenes de OrP (250 y 500 µL), se adicionó nitrito de sodio (NaNO_3) al 5% (p/v), cloruro de aluminio (AlCl_3) al 10% (p/v) e hidróxido de sodio (NaOH) 1 M. Se llevó a un volumen final de reacción de 2.5 mL y se dejó reaccionar en reposo durante 30 minutos, protegiendo las muestras de la luz. Transcurrido el tiempo, se leyeron a λ de 510 nm.

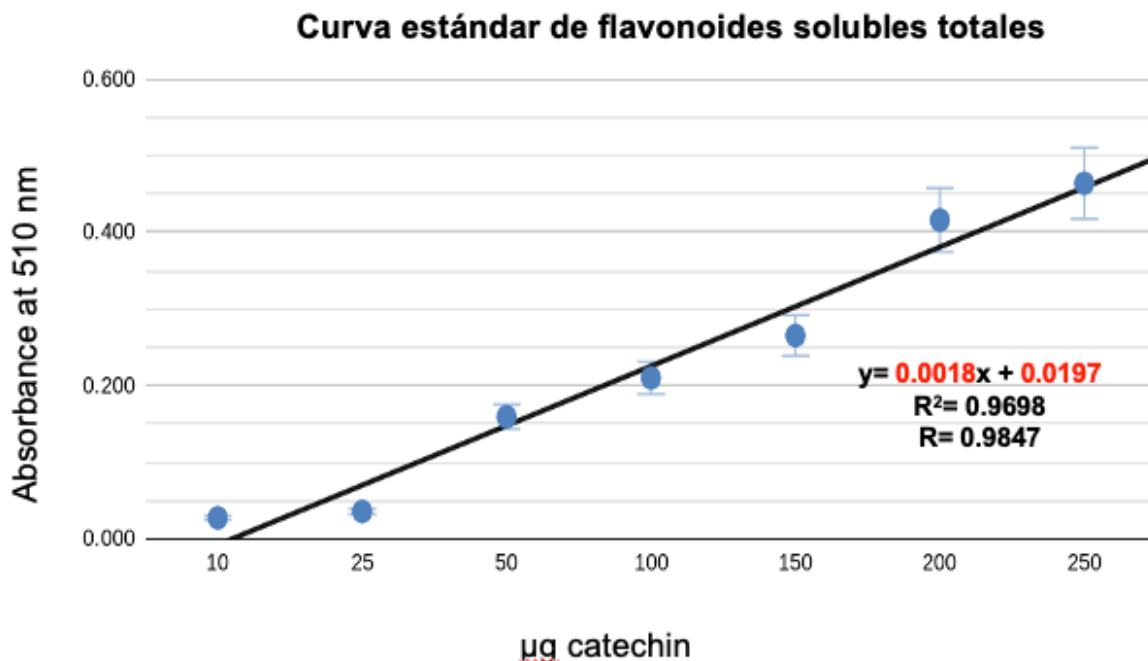


Figura 5. Curva patrón de flavonoides solubles totales usando cantidades conocidas de catequina y las absorbancias promedio de las cuatro repeticiones; se muestran los valores de coeficientes m, b, R^2 y R.

8.2.5 Determinación de capacidad antioxidante usando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Se elaboró una curva de calibración con cantidades conocidas (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 nmol por triplicado) de Trolox^{MR} 1mM, análogo hidrosoluble de la vitamina E (Figura 6); mientras que para las muestras problema se usaron 75 µL por triplicado de OrP, completando con una mezcla alcohol-acetona (Mezcla 1:1 de metanol acuoso al 50% (v/v) pH 2.0 y acetona acuosa al 70% (v/v)) a 100 µL. Se añadieron 600 µL de DPPH 0.13 mM y después de dejar en reposo las muestras durante 20 minutos, protegiéndolas de la luz, se leyeron a λ de 515 nm.

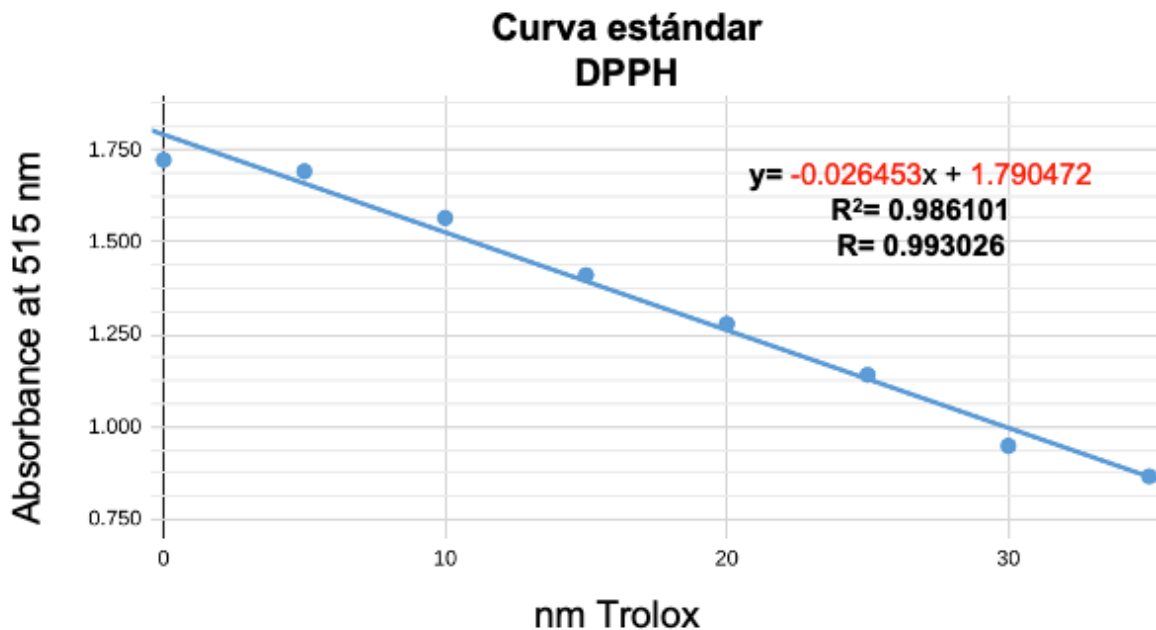


Figura 6. Curva de calibración de DPPH.

8.2.6 Determinación de actividad antioxidante usando el radical ácido 2,2'-azino-bis-3etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS^{•+})

Para la elaboración de la curva de calibración se usaron 0, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 nmol de Trolox^{MR} 1mM (Figura 7). Se utilizaron 50 µL de OrP por triplicado y se completó este volumen a 100 µL con una mezcla alcohol-acetona (Mezcla 1:1 de metanol acuoso al 50% (v/v) pH 2.0 y acetona acuosa al 70% (v/v)). Posteriormente se añadieron 2850 µL de solución de trabajo de ABTS^{•+} (ABTS + persulfato de potasio). Después de un reposo de 2 horas y protegidas de la oscuridad, las muestras se leyeron a λ de 734 nm.

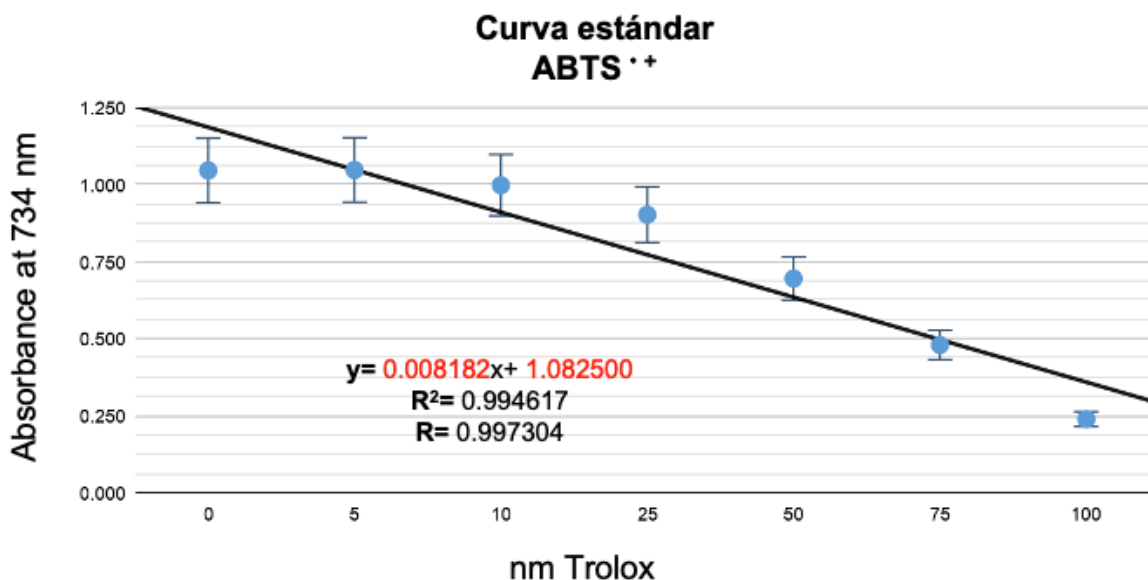


Figura 7. Curva de calibración de ABTS^{•+}. Así como los valores de coeficientes m, b, R² y R.

8.2.7 Determinación de la actividad antioxidante por el método Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP)

La construcción de la curva de calibración se llevó a cabo con 0, 16.65, 33.30, 49.95, 66.60, 83.25 y 99.90 nmol de Trolox^{MR} 0.666 mM (Figura 8) y para las muestras biológicas se emplearon 50 µL y se completó a 100 µL con una mezcla alcohol-acetona (Mezcla 1:1 de metanol acuoso al 50% (v/v) pH 2.0 y acetona acuosa al 70% (v/v)) y se adicionaron 2850 µL de solución FRAP, se protegieron de la luz cada uno de los tubos durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se procedió a la lectura de las muestras, la cual se realizó a λ 593 nm.

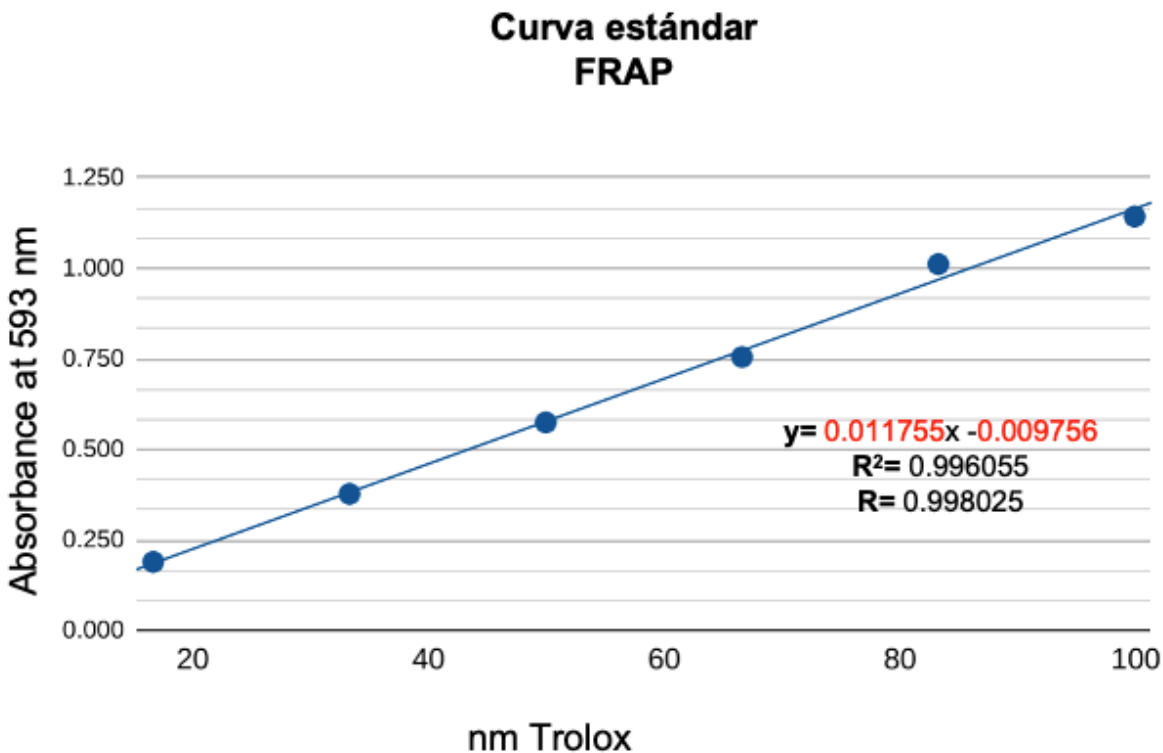


Figura 8. Curva de calibración de FRAP.

8.2.8 Determinación de la actividad antioxidante OrP usando AAPH como indicador de daño oxidativo y hemólisis en eritrocitos humanos

Para la realización de este ensayo fue necesario llevar a cabo una nueva extracción, tal como se describió con anterioridad para la obtención del extracto metanólico pero esta vez con buffer de fosfatos al pH 7.4 (PBS) para así evitar la lisis causada por el metanol y la acetona.

Este ensayo se lleva a cabo en tres etapas, la primera se realizó para descubrir si OrP posee la capacidad de lisar los eritrocitos por sí misma. En la segunda parte se evalúa la citoprotección otorgada por la OrP al causar lipoperoxidación por el radical AAPH (dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)), cuya capacidad antioxidante se compara con una curva de calibración con cantidades conocidas de Trolox^{MR} (Figura 9) en la tercer fase del ensayo.

Se obtuvieron alrededor de 4 mL de sangre humana mediante punción venosa en tubos con anticoagulante (EDTA). Se llevó a centrifugación en centrífuga Hettich Zentrifugen EBA 200 a temperatura ambiente a 3500 rpm durante 5 minutos para posteriormente retirar el plasma y la capa leucocitaria. Se realizaron 5 lavados con PBS pH 7.4, descartando el sobrenadante en cada una de las veces. Después de los lavados se prepararon soluciones al 5% (v/v) y 10% (v/v) ambas en PBS pH 7.4.

8.2.8.1 Análisis Preliminar de Citotoxicidad Conducente a Hemólisis para el Extracto de Muestra Problema

Esta evaluación se basa en las metodologías de (Lakshmi et al., 2014; V. Oliveira et al., 2009; Vinjamuri et al., 2015), con modificaciones de (Hernández Marín, 2018). En la siguiente tabla se muestra la preparación de las muestras de reacción de blancos, controles y extracto de la muestra a analizar, en tubos Eppendorf® de 2 mL. Se realizó por triplicado para el extracto de pulpa:

Tabla 3. Volúmenes de reacción para análisis preliminar de citotoxicidad conducente a hemólisis para OrP.

Reactivos	Tubo #					
	1 Blanco del control negativo	2 Control negativo (Hemólisis basal)	3 Blanco del control positivo	4 Control positivo (Hemólisis total)	5 Blanco de la muestra problema (disolvente)	6 Extracto de muestra problema
Agua destilada (µL)	-----	-----	1000	1000	-----	-----
PBS pH 7.4 (µL)	1250	1000	250	-----	990-0	900
Disolvente (µL)	-----	-----	-----	-----	10-1000	-----
Extracto de muestra problema (µL)	-----	-----	-----	-----	-----	100 (Por triplicado)
Eritrocitos al 5%(v/v) en PBS pH 7.4 (µL)	-----	250	-----	250	250	250
Volumen total (µL)	1250	1250	1250	1250	1250	1250

Posteriormente, se cubrieron los tubos con papel aluminio y se incubaron a $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ en agitación orbital a 200 rpm durante 30 minutos; transcurrido el tiempo se llevaron a centrifugación a 685 g por 5 min a 25°C y se leyeron sus sobrenadantes a 545 nm (espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Scientific). Se aplicó la siguiente ecuación para determinar el porcentaje de hemólisis que provocaron los extractos:

$$\% \text{Hemólisis} = [(Amp - Acp) / (Acp - Acp)] \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

Amp: Absorbancia de la muestra problema= Abs tubo #6 contra el tubo #5 como blanco.

Acn: Absorbancia del control negativo= Abs tubo #2 contra el tubo #1 como blanco.

Acp: Absorbancia del control positivo= Abs tubo #4 contra el tubo #3 como blanco.

8.2.8.2 Análisis de Citoprotección por el Extracto de OrP contra la Hemólisis Oxidativa Inducida por AAPH

Esta evaluación de capacidad citoprotectora se basa en las metodologías propuestas por (Benites et al., 2012; Chisté et al., 2014; Sulaiman & Hussain, 2013), con modificaciones implementadas por (Hernández Marín, 2018). En la siguiente tabla se muestra la preparación de las muestras de reacción de blancos, controles y extracto de la muestra a analizar, en tubos Eppendorf® de 2 mL. Se realizó por triplicado para el extracto de OrP (a partir de la una dilución 1:10):

Tabla 4. Velocidades de reacción del análisis de citoprotección por los extractos de OrP contra a hemólisis oxidativa inducida por AAPH.

Reactivos	Tubo #					
	1 Blanco del control negativo	2 Control negativo (Hemólisis basal)	3 Blanco del control positivo	4 Control positivo (Hemólisis total)	5 Blanco de la muestra problema (disolvente)	6 Extracto de muestra problema
PBS pH 7.4 (µL)	1000	750	625	375	615-250	-----
Disolvente (µL)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Extracto de muestra problema (µL)	-----	-----	-----	-----	10-375	375 (Por triplicado)
Eritrocitos al 5%(v/v) en PBS pH 7.4 (µL)	-----	250	-----	250	-----	250
AAPH 150 mM en PBS pH 7.4 (µL)	-----	-----	375	375	375	375
Volumen total (µL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Se almacenaron los tubos a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ con agitación orbital a 200 rpm por 5 horas en penumbra y transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 685 g por 5 min a 25°C y se leyeron sus sobrenadantes a 535 nm (espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Scientific). Se aplicó la siguiente ecuación para determinar el porcentaje de inhibición de hemólisis que provocó el extracto de OrP:

$$\% \text{ de Inhibición de Hemólisis} = 100 - \left\{ \left[\frac{\text{Amp}-\text{Acn}}{\text{Acp}-\text{Acn}} \right] \cdot 100 \right\} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

Amp: Absorbancia de la muestra problema= Abs tubo #6 contra el tubo #5 como blanco.

Acn: Absorbancia del control negativo= Abs tubo #2 contra el tubo #1 como blanco.

Acp: Absorbancia del control positivo= Abs tubo #4 contra el tubo #3 como blanco.

8.2.8.3 Análisis de la Curva de Calibración de Citoprotección con Trolox^{MR} y con la Muestra Problema

Se realizó una curva patrón con 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µl de Trolox® (Figura 9), 250 µl de solución de eritrocitos y 375 µl de AAPH. Se almacenaron todos los tubos a 37±0.5°C en agitación orbital a 200 rpm por 5 horas en penumbra y transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 685 g por 5 min a 25°C. Posteriormente, se leyeron sus sobrenadantes a 503 nm (espectrofotómetro Biomate 3 Thermo Scientific) con sus respectivos blancos.

Posteriormente, se resolvió la ecuación polinómica:

$$y = ax^3 + bx^2 + cx + d$$

Mediante el software Wolfram Alpha®, obteniendo la curva patrón para comparar los valores de los extractos obtenidos nuevamente con 100 µl sin dilución y 375 µl de una dilución 1:10 del extracto de OrP por triplicado, con los valores conocidos de Trolox, los cuales se obtuvieron mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Eq. Trolox} = \left(\frac{Abs - b}{m}\right) \left(\frac{Vt}{Va}\right) \left(\frac{1}{Mh \times 10}\right) \left(\frac{1}{100 - H}\right) \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

Eq. Trolox: Micromoles de equivalentes de Trolox/gramo de muestra seca.

A: Absorbancia promedio de las repeticiones de la muestra problema.

b: Ordenada al origen (absorbancia).

m: Pendiente (absorbancia/nanomol de Trolox).

Vt: Volumen total del extracto (microlitros).

Va: Volumen de alícuota usado en el tubo problema (microlitros).

Mh: Peso de la muestra húmeda extraída (gramos).

H: Contenido de humedad de la muestra húmeda (porcentaje).

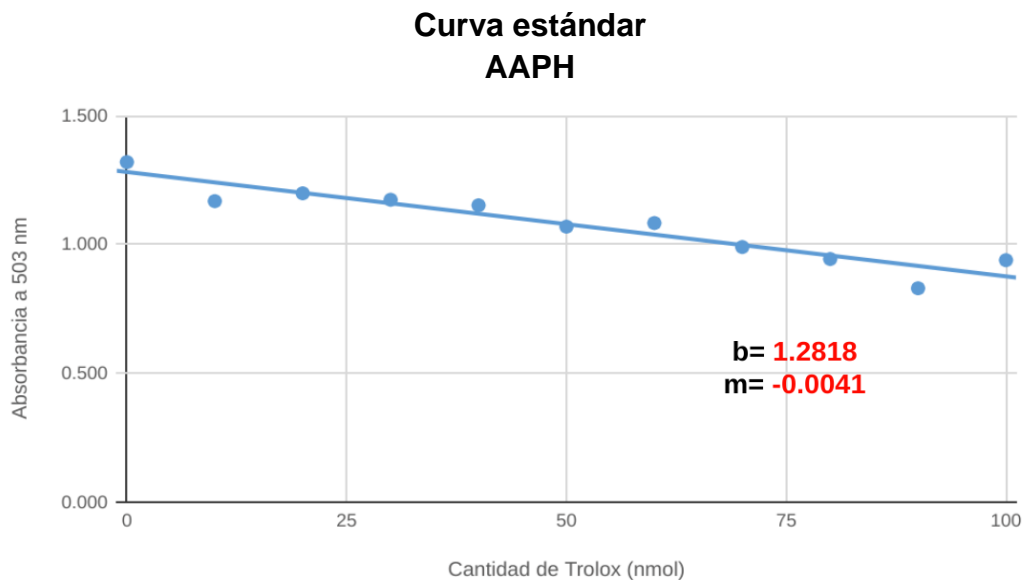


Figura 9. Curva de calibración de AAPH.

8.2.9 Capacidad de eliminación de H₂O₂

De acuerdo con el método descrito por (Ruch et al., 1989) con modificaciones de (Keser et al., 2012), diferentes concentraciones del extracto de OrP fueron añadidas a 0.6 mL de una solución de peróxido de hidrógeno 40 mM. Después de 10 minutos, la absorbancia a 230 nm fue registrada y comparada contra la solución control (buffer de fosfatos sin peróxido de hidrógeno). Posteriormente, el porcentaje de eliminación del peróxido de hidrógeno fue calculado a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de eliminación } H_2O_2 = [(A_c - A_s)/A_c] \times 100$$

Donde

A_c: es la absorbancia del control

A_s: es la absorbancia en presencia de OrP o las soluciones estándar.

8.2.10 Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector UV (HPLC- UV) de vitaminas C y E

8.2.10.1 Vitamina C

La determinación de ácido ascórbico (vitamina C) se realizó en OrE mediante la técnica establecida por (Singh et al., 2016) en una bomba Thermo Scientific ACCELA PDA Detector ACCELA 600. La preparación del estándar de ácido ascórbico se logró agitándolo durante 5 h a temperatura ambiente en etanol con carbón activado y se burbujeaba aire continuamente a través de la solución. Tanto los estándares como las muestras de OrE se diluyeron a niveles óptimos con una fase móvil que contenía tirosina (50 mg/100 ml). Posteriormente se añadió ditioneitol (DTT) hasta una concentración final de 100 mg/100 ml. El modo de intercambio aniónico débil fue el método por el cual se observaron las separaciones óptimas. Se utilizaron columnas Waters μ Bondapak NH2 10 mm 3,9 x 300 mm con fase móvil de acetonitrilo: KH_2PO_4 0,05 M (75:25 p/p) a un caudal de 1,0 mL/min y el volumen de inyección fue de 10 μL . La solución de KH_2PO_4 se calentó y mantuvo a 40°C durante la adición de acetonitrilo, para evitar precipitaciones de KH_2PO_4 cuando se mezclaba acetonitrilo con soluciones acuosas. El ácido ascórbico fue detectado por UV a 268 nm (límite de detección 25 ng).

8.2.10.2 Vitamina E

La determinación de vitamina E en OrE se realizó según (Limbach et al., 2021) utilizando un detector de matriz de diodos Agilent 1260 y con las siguientes especificaciones: columna analítica (Microsorb 100-3 C18 100 x 4,6 mm) a un caudal de elución de 1,0 mL/min. Se inyectaron veinte microlitros de la muestra. Ciclo de muestra: 30 min. La fase móvil fue isocrática [metanol: agua (98:2, v/v)] y las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 290 nm. Se usó alfa-tocoferol como estándar.

8.3 Modelo experimental *in vivo*

Nuestros protocolos de investigación para los experimentos *in vivo* fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad Autónoma de Aguascalientes y se realizaron siguiendo los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999 del gobierno mexicano y los lineamientos de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH publicaciones no. 8023).

Ratas Wistar macho de 120-150 gramos fueron distribuidas en 11 grupos experimentales: Control, Sham, TAA, OrP, OrE, Betanina, N- acetilcisteína (NAC), OrP/TAA, OrE/TAA, Betanina/TAA y NAC/TAA. La tioacetamida fue disuelta en solución salina fisiológica al 0.9% y administrada vía intraperitoneal dos veces por semana: la primera semana a una dosis de 250 mg/kg y las semanas siguientes de 200 mg/kg (El-Baz et al., 2020). NAC se disolvió con solución salina fisiológica al 0.9% y se administró diariamente vía intraperitoneal a una dosis de 50 mg/kg. Mientras que OrP, OrE y Betanina se disolvieron con agua destilada y fueron administradas diariamente vía oral usando una cánula bucoesofaríngea curvada de acero inoxidable (18 × 3" Cadence Science). OrP y OrE a una dosis de 800 mg/kg (González Ponce et al., 2020; González-Ponce et al., 2016) y la betanina a una dosis de 25 mg/kg. Cada uno de los tratamientos se administraron durante 5 semanas y al término de la segunda, tercera, cuarta y quinta semana se tomaron muestras de sangre e hígado para su análisis posterior. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a alimento y agua durante el experimento y su peso fue monitoreado cada semana.

Al final de la segunda, tercera, cuarta y quinta semana, 8 ratas de cada grupo experimental fueron anestesiadas con pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg, posteriormente se llevó a cabo una toracotomía y las muestras de sangre se tomaron mediante punción cardíaca. Después fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos para obtener suero, el cual fue almacenado a -80°C hasta el momento de la evaluación de los marcadores bioquímicos de daño hepático.

Posteriormente, 4 ratas fueron perfundidas con solución de lavado, después se realizó una hepatectomía total y una parte del tejido hepático fue preservado a -80°C hasta la evaluación de los marcadores de estrés oxidativo, mientras que el resto del tejido se almacenó en RNA later (Invitrogen. Thermo Fisher Scientific #Cat AM7024) o en buffer RIPA (Sigma #Cat R0278) con inhibidores de proteasas (cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail. Roche. #Cat 11836153001) para la evaluación de marcadores moleculares de daño. El hígado de los 4 individuos restantes de cada uno de los grupos experimentales fue sometido a fijación *in situ* con formalina neutra al 10% (formalina grado reactivo/ buffer de fosfatos v/v) después de la perfusión con la solución de lavado. De igual manera, se realizó una hepatectomía total para llevar a cabo el análisis histopatológico. Las muestras de hígado fueron colocadas en formalina neutra al 10% hasta su procesamiento.

8.3.1 Marcadores bioquímicos de daño hepático

Las concentraciones séricas de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT) fueron determinadas a través de la técnica de química sanguínea seca en el equipo VITROS® System Integrated 5600 Ortho Clinical Diagnostics Johnson & Johnson Company, Neptune Township, NJ, USA.

8.3.2 Biomarcadores de estrés oxidativo

8.3.2.1 Glutathión reducido (GSH)

Los niveles de GSH fueron determinados en tejido hepático después de su homogenización en el equipo TissueLyser II QIAGEN® Hilden, Germany. El índice GSH/GSSG fue determinado usando el kit comercial Quantification kit for oxidized and reduced glutathione, Sigma Aldrich. St. Louis, MO, USA. Y las determinaciones fueron realizadas en placas de 96 pocillos a través de espectrofotometría en un lector de microplacas iMark™ Microplate Absorbance Reader BIO-RAD. Hercules, CA, USA a 415 nm.

8.3.2.2 Malondialdehído (MDA)

Se realizó la determinación del producto de lipoperoxidación malondialdehído, de acuerdo con el método descrito por (Uchiyama & Mihara, 1978), para lo cual, 100 mg del tejido hepático fue homogenizado con 1 mL de buffer de fosfatos pH 7.4 en el equipo TissueLyser II QIAGEN® Hilden, Germany. Posteriormente se mezclaron 1.5 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) al 1% en ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N, 0.5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 6% y 200 µl de la muestra homogenizada. Los tubos se calentaron hasta su ebullición en baño maría por 45 minutos. Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente y se añadieron 2 mL de n-butanol, luego se agitaron y centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos. Se realizó la lectura de cada una de las muestras a 530 nm, en el espectrofotómetro HACH DR/4000U, utilizando n-butanol como blanco. Por último, se calculó la concentración de MDA, mediante la siguiente fórmula:

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

En donde:

Abs: Absorbancia de la muestra

1100: Factor obtenido del estándar

8.3.3 Estudio histopatológico

Las porciones de tejido hepático fijadas *in situ* fueron deshidratadas en un procesador de tejidos Leica modelo TP 1020 y posteriormente fueron embebidas en cubos de parafina en la plataforma de inclusión Leica EG 1150 H para realizar cortes de 5 µm de grosor en un microtomo Leica modelo RM2125RT. Los tejidos fueron sometidos a desparafinización e hidratación para posteriormente, teñir y de esta manera, monitorear los cambios morfológicos en el tejido.

8.3.3.1 Tinción tricrómica de Masson

El grado de fibrosis hepática fue evaluado a través de la tinción tricrómica de Masson. Posteriormente, tres laminillas por individuo fueron analizadas en un microscopio óptico Primo Star, Zeiss.

8.3.3.2 Mediciones de tabiques fibróticos interlobulillares

Se realizaron las mediciones de los tabiques fibróticos en los espacios interlobulillares de 3 campos diferentes por laminilla. Se analizó una n=3 individuos por cada uno de los tiempos de todos los grupos experimentales. Se usó un fotomicroscopio Leica DM750, camera ICC50W. Heerbrugg, Switzerland y el software LAS EZ version 3.4.0 Leica Microsystems, Switzerland fue empleado para la toma de imágenes, mientras que el software Axio Vision Rel. 4.6 Oberkochen, Germany para realizar las mediciones. Se midieron las áreas de colágena en la zona interlobulillar como pixeles a una ampliación total de 100x. Las zonas que no mostraron el patrón de tinción azul característico de la colágena con la tinción tricrómica de Masson, fueron excluidas. Los resultados fueron expresados como el número total de pixeles positivos para colágena.

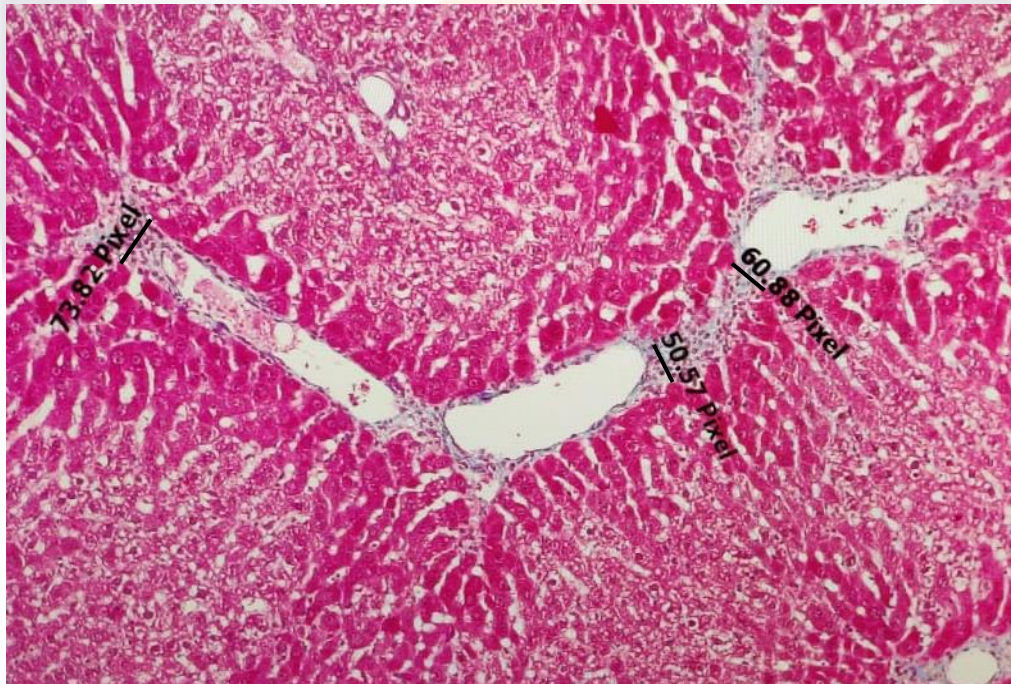


Figura 10. Evaluación cuantitativa de septos de fibrosis interlobulillar en el software Axio Vision Rel. 4.6. Tinción tricrómica de Masson. 1000x.

8.4 Marcadores moleculares de daño hepático

8.4.1 Expresión génica de TNF- α mediante qPCR

8.4.1.1 Extracción de RNA

Para realizar la extracción de RNA del tejido hepático se empleó el kit Promega Z3100 (SV Total RNA Isolation System). Primeramente, se homogenizaron 30 mg de tejido en 500 μ L de TRI Reagent, cuidando en todo momento la cadena de frío para conservar íntegro el material genético. Se centrifugó el homogenizado a 10,000 rpm a 4°C durante 10 min, sin embargo, el tiempo se modificó en función de las partículas en suspensión. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo, al cual se le añadieron 200 μ L de etanol frío al 95% y se mezcló con ayuda de micropipeta, además se mezcló en vórtex durante 1 minuto. Dicha muestra se transfirió a una columna y se centrifugó durante 1 minuto, se decantaron los desechos. Posteriormente, se agregaron 600 μ L de RNA Wash Solution a la columna, se centrifugó por 1 minuto y nuevamente, se descartaron los desechos. Se preparó mix para cada una de las muestras con las cantidades siguientes: 40 μ L de Yellow Core Buffer, 4 μ L de $MnCl_2$ 0.09M y 5 μ L de DNasa I (cantidades por muestra), se mezcló gentilmente con micropipeta. Se añadieron 50 μ L del mix directo en la membrana dentro de cada columna y se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, se añadieron 200 μ L de DNase Stop Solution y se centrifugó por 1 minuto. Posteriormente, se añadieron 600 μ L, se centrifugó nuevamente durante un minuto. Se agregaron 250 μ L de RNA Wash Solution y se centrifugó durante 2 minutos. Se decantaron los desechos después de cada una de las centrifugaciones. Se llevó nuevamente a centrifugación por 2 minutos. Si las muestras presentaban olor a etanol, se dejaron reposar durante un minuto con la tapadera abierta, de lo contrario, se prosiguió con el procedimiento. Se insertaron las columnas a tubos de elución y se agregaron 50 μ L de agua libre de nucleasas directamente en las membranas. Después de cerrar las tapaderas, se centrifugó por 1 minuto. Una vez transcurrido ese tiempo, se desecharon las columnas. Por último, se transfirieron de inmediato 40 μ L a un tubo para almacenar a -80°C ya que tanto la retrotranscripción como qPCR se realizaron con dicha alícuota y con el resto, se llevó a cabo la cuantificación de RNA.

8.4.1.2 Cuantificación de RNA

Se realizó la cuantificación del RNA extraído en el equipo BioDrop en ng/ μ L y con un volumen de 1 μ L de muestra. El eluyente, agua libre de nucleasas, fue usada como blanco para la lectura.

8.4.1.3 Síntesis de cDNA

Con base en la concentración obtenida de RNA, se calculó el volumen de cada muestra necesario para tener una concentración de 1 μ g/ μ l de RNA. Dicho volumen calculado fue añadido en microtubos para PCR al cual se le agregó 1 μ L de primer (Oligo dT). Se aforó el volumen a 5 μ L con agua libre de nucleasas y se colocaron en el termociclador a 70°C durante 5 minutos, inmediatamente después, se mantuvieron, por al menos, 5 minutos en hielo. Se preparó el mix de reacción de retrotranscripción con las siguientes cantidades:

- 4 μ L GoScript™ 5X Reaction Buffer
- 1.5 μ L MgCl₂ (Concentración final 1.5-5.0 mM)
- 1 μ L PCR Nucleotide Mix (Concentración final 0.5 Mm cada Dntp)
- 0.5 μ L Recombinant RNasin® Ribonuclease Inibitor
- 1 μ L GoScript™ Reverse Transcriptase
- 7 μ L Nuclease-Free Water

*Cantidades por muestra.

Para obtener un volumen final de 15 μ L por muestra. Se añadieron 15 μ L del mix al tubo de PCR de cada muestra y se colocaron nuevamente en el termociclador a 25°C, durante 5 minutos. Después se mantuvieron a 42°C máximo por una hora y, por último, se aumentó la temperatura a 70°C por 15 minutos para inactivar la transcriptasa reversa. Al terminar, las muestras se almacenaron a -20°C.

8.4.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa (qPCR)

El DNA complementario (cDNA) obtenido se utilizó para cuantificar la expresión relativa del RNAm (RNA mensajero) para la citocina proinflamatoria TNF- α . Las muestras fueron

diluidas 1:20 para obtener una concentración de 50 ng de cDNA. Se realizaron las mezclas de reacción en placas de 48 pocillos para qPCR (Applied Biosystems® MicroAmp® -N8010560) de la siguiente manera (se agrega del mayor al menor volumen):

- 1 µL Oligo Forward (1:20) (Uniparts)
- 1 µL Oligo Reverse (1:20) (Uniparts)
- 5 µL SYBR Green (Thermo Scientific #Cat K0221)
- 2 µL agua libre de nucleasas
- 1 µL muestra

*Cantidades por muestra. Se recomienda prepara mix para una muestra extra para evadir el margen de error de pipeteo.

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos TNF- α y 18 s.

Gen	Oligonucleótidos
<i>TNF- α</i>	Fw. 5' TGA CCC CCA TTA CTC TGA CC 3'
	Rv. 5' GGC CAC TAC TTC AGC GTC TC 3'
18 s	Fw. 5' CGG CTA CCA CAT CCA AGG A 3'
	Rv. 5' CCA ATT ACA GGG CCT CGA AA 3'

Después de cargar las placas, se centrifugaron en microcentrífuga (MPS 1000 Mini PCR Plate Spinner-Labnet International®) y se analizaron en el equipo StepOnePlus™ Real Time PCR System. Las condiciones de la PCR se describen a continuación: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 3 minutos, posteriormente 40 ciclos bajo las siguientes condiciones: a) Alineamiento a 95°C durante 45 segundos, 59°C durante 35 segundos; b) Curva Melt: 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y por último 95°C por 15 segundos. Los niveles de expresión relativa se normalizaron contra 18s como un gen interno y las diferencias se determinaron usando el método relativo de $\Delta\Delta Ct$.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ referencia}$$

En donde:

Δ Ct muestra: Valor de cualquier muestra normalizada con el gen constitutivo endógeno.

Δ Ct referencia: Valor de las muestras control también normalizadas con el gen constitutivo endógeno.

Los resultados fueron reportados como veces de inducción de las muestras de interés con respecto a los valores obtenidos de las muestras control.

8.4.2 Expresión proteica de α -SMA a través de Western blot

8.4.2.1 Extracción de proteína

Se pesaron 50 mg de hígado y se colocaron en 600 μ L de RIPA (Sigma Aldrich #Cat R0278) (12 μ L por cada mg de tejido) adicionado con cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail. Roche. #Cat 11836153001). Posteriormente, se homogenizaron las muestras con ayuda de sonicador (Sonics Vibra-Cell VC130 Ultrasonic Processor) y se alicuotaron 300 μ L a -20°C y otros 300 μ L a -80°C .

8.4.2.2 Cuantificación de proteína

Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford y se usó albúmina como estándar a una concentración de 1 mg/mL. Se llevó a cabo una curva patrón con cantidades conocidas de albúmina, cada una de ellas por triplicado en microplacas de 96 pozos de la siguiente manera:

Tabla 6. Curva patrón para cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

<i>H₂O destilada</i> (μ L)	<i>Albúmina</i> (μ L)	<i>Reactivo</i> <i>Bradford</i> (μ L)	<i>Volúmen total</i> (μ L)	<i>Concentración</i> <i>de proteína</i> (mg/mL)
10	0			0
8	2			0.2
6	4	240	250	0.4

4	6	0.6
2	8	0.8
0	10	1

*Los reactivos se agregan en el siguiente orden: Agua → Albúmina → Reactivo de Bradford.

Posteriormente, se colocó 1 µL de muestra por triplicado y reactivo de Bradford (249 µL) en una microplaca (se agrega primero el reactivo de Bradford), se mezcló con pipeta y punta nueva hasta asegurar la homogeneidad de la muestra. Y se realizaron las lecturas en lector de microplacas iMark™ Microplate Absorbance Reader BIO-RAD. Hercules, CA, USA a 595 nm. Con los datos de la curva de calibración, se determinó la ecuación de la recta.

$$y=mx+b$$

Donde “y” es el promedio de la absorbancia de las 3 repeticiones de cada punto de la curva y en donde se despeja “x”, $x = (y-b)/m$; se determina el valor de R².

8.4.2.3 SDS-PAGE

Se prepararon geles de poliacrilamida, los cuales estaban constituidos por una sección concentradora (gel al 4%) y una sección separadora (10%).

Tabla 7. Geles de poliacrilamida para electroforesis de proteínas.

	<i>Gel concentrador 4%</i>	<i>Gel separador 10%</i>
<i>H₂O destilada</i>	3 mL	4 mL
<i>Tris 0.5 M pH 6.8</i>	1.25 mL	
<i>Tris 1.5 M pH 8.8</i>		2.5 mL
<i>SDS</i>	50 µL	100 µL
<i>Acrilamida</i>	650 µL	3.3 mL
<i>PSA</i>	40 µL	100 µL
<i>TEMED</i>	6 µL	4 µL

*Cada una de las preparaciones es para 2 geles. H₂O, agua; buffer TRIS, tris hidroximetil aminometano; SDS, dodecilsulfato sódico; PSA, persulfato de amonio y TEMED, tetrametiletilendiamina.

Debido a que el hígado es un órgano con abundante cantidad de proteínas, las muestras se diluyeron 1:3 con RIPA adicionado con cóctel de proteasas. Asegurándonos de tener 40 µg de proteína en cada uno de los pocillos del gel. Se prepararon 15 µL de volumen de reacción (3 µL muestra + 3 µL de buffer de carga (Sigma Aldrich #Cat S3401) + 9 µL de RIPA adicionado con inhibidores de proteasas) en tubos cónicos de 1.5 mL, las proteínas fueron desnaturalizadas calentando a 90°C durante 5 minutos. Previamente se armó la cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell for Mini Precast Gels, 4-gel #Cat 1658004) y se le agregó buffer de corrida 1X; posteriormente se cargaron 15 µL de cada una de las muestras, así como 1.5 µL del marcador de peso molecular (MPM) (ThermoScientific. Escalera de proteínas PageRuler Plus. 10 a 250 kDa. #Cat 26619). Los geles se sometieron a un voltaje de 80 v durante 15 minutos para permitir la entrada de las proteínas al gel, después a 110 v durante 2 horas o hasta que el MPM y las muestras llegaran al límite inferior del gel. Por último, se desmontaron los geles para continuar con la transferencia.

8.4.2.4 Transferencia a membrana de PVDF

Las muestras fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (BIO-RAD. SEQUI-BLOT PVDF MEMBRANE. #Cat BIO1620184) a 4°C a 12 mA durante toda la noche (12 h) y a 220 mA 1 hora extra. Primeramente, se activa la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) sumergiéndola, por al menos, 10 minutos en metanol absoluto y en agitación. También se equilibraron 4 piezas de papel filtro (BIO-RAD Mini Trans-Blot Accessories # Cat 1703820), 4 esponjas sumergiéndolas en buffer de transferencia 1X (2 por cada gel a transferir), mientras los geles se encontraban en la electroforesis. Al término de ésta, se sacaron los geles de la cámara de electroforesis y se removió y descartó el gel concentrador, mientras que el gel separador se conservó para la realización del sándwich de transferencia, el cual se armó partiendo de la cara oscura del casete de la siguiente manera: esponja, papel filtro, gel, membrana (cuidar la

presencia de burbujas), papel filtro, esponja. Cada uno de los casetes se colocó en la cámara de transferencia de manera adecuada (parte transparente del casete con parte roja del adaptador y parte negra del casete con parte negra del adaptador), colocar un refrigerante y un agitador magnético. Se realizó la transferencia con las condiciones antes mencionadas.

8.4.2.5 Tinción rojo Ponceau

Inmediatamente después de la transferencia, se tiñó la membrana con el colorante rojo Ponceau para evaluar la transferencia de las proteínas del gel a la membrana, observando la presencia o ausencia del bandeo de proteínas y/o de burbujas. Se realizaron cortes de la membrana en los pesos moleculares de las proteínas de interés. Posteriormente, se realizaron tres lavados con TBS-Tween 1X de 10 minutos y utilizando un agitador mecánico hasta eliminar el colorante.

8.4.2.6 Western Blotting

Se bloquearon las fracciones de las membranas en leche libre de grasa Svelty disuelta al 5% en TBS 1X durante 2 horas, posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-1X, en agitador mecánico para eliminar el exceso de buffer de bloqueo. Después, se incubaron las membranas con sus respectivos anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C, los cuales fueron: anti- α -SMA (Merck. #Cat A5228) a una dilución 1: 1,000 y anti-GAPDH (Merck. #Cat G9545) a una dilución 1: 10,000 con leche al 5% en TBS-1X. Transcurrido éste tiempo de incubación, se retiraron los anticuerpos primarios y las membranas se lavaron nuevamente en agitación con TBS-1X en tres ocasiones de 10 minutos cada una, luego se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios: IgG cabra anti-ratón (Invitrogen #Cat 31430) o IgG cabra anti-conejo (ThermoScientific #Cat 31460) conjugados con peroxidasa de rábano picante, ambos a una dilución 1: 5,000 con leche al 5% en TBS-1, durante 2 horas, en agitación y a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se recuperaron los anticuerpos y las membranas se lavaron con TBS-T 1X, dos lavados de 15 minutos, 5 lavados de 5 minutos y por último, dos lavados de 5 minutos con TBS 1X. La detección de la señal de proteína

presente en la membrana se midió mediante quimioluminiscencia utilizando un sustrato ECL Clarity™ Western (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU) y el fotodocumentador Image Studio Digits ver 5.2. Cada una de las muestras se realizaron por triplicado y se realizó el análisis densitométrico de la expresión relativa de cada proteína con el software ImageJ 1.53f51. Se normalizó con la señal de la proteína constitutiva para obtener la expresión de la proteína problema en veces de cambio. Los valores de las veces de cambio $> 1,0$ indican una mayor abundancia en relación con el control, y los valores $< 1,0$ indican una disminución de la abundancia.

8.5 Análisis estadísticos

Los resultados del porcentaje de humedad, se expresaron como media \pm desviación estándar; $n= 3$. El análisis bromatológico se realizó a partir de un pool de 5 frutos y los resultados corresponden a esta muestra analizada. La concentración de betacianinas se expresa como media \pm desviación estándar; $n= 3$. Para compuestos fenólicos y flavonoides se utilizaron diferentes alícuotas del extracto (250 μ L). Los resultados de la determinación de la capacidad antioxidante se expresaron como media \pm desviación estándar; $n= 3$.

Para la determinación de los marcadores bioquímicos de daño hepático, los resultados se analizaron mediante ANOVA de dos vías con la prueba post hoc de Tukey utilizando el software GraphPad Prism 9.0.1. San Diego, CA, EE. UU con una significancia de $p<0,05$. Los resultados representan la media de cada grupo ($n= 4$) \pm error estándar de la media (S.E.M).

Para los marcadores de estrés oxidativo (GSH $n= 4$; MDA $n= 6$) y para la medición de tabiques fibróticos interlobulillares ($n= 9$), los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Tukey utilizando el software GraphPad Prism 9. San Diego, CA, EE. UU con una significancia de $p<0,05$. Los resultados representan la media de cada grupo \pm error estándar de la media (S.E.M).

Los datos de qPCR y Western blot se analizaron mediante ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey utilizando el software GraphPad Prism 9.0.1. San Diego, CA, EE. UU

con una significancia de $p < 0,05$. Los resultados representan la media de cada grupo ($n=6$) \pm error estándar de la media (S.E.M).

IX) RESULTADOS

9.1 Caracterización nutracéutica del fruto de *Opuntia robusta*.

9.1.1 Colecta, extracción y almacenamiento

Tabla 8. Peso total del fruto colectado con cáscara, peso total del fruto sin cáscara y peso a partir del cual se obtuvieron OrP y OrE.

Or colectada (kg)	Or sin cáscara (kg)	OrP sin cáscara (kg)	OrE sin cáscara (kg)
43.7	21.43	11.65	9.78

En la cuarta colecta también se obtuvieron 5 unidades más, las cuales fueron utilizadas para la realización del análisis bromatológico (Tabla 9). En el caso de la colecta del 18 de septiembre, se obtuvo una cantidad considerablemente menor, ya que la temporada de frutos se encontraba en una fase más avanzada, indicando que el mes para tener mayores rendimientos es Agosto.

Un total de 43.7 kg de fruto completo fueron colectados a lo largo las temporadas 2019-2020, de los cuales 24.5 kg fueron destinados para la extracción de OrP y 19.19 kg para la extracción de OrE. Obteniendo 6.35 y 5.2 litros respectivamente. Siendo el promedio del porcentaje de rendimiento de OrP de 47.81% y el promedio del porcentaje de rendimiento del liofilizado de 13.38%.

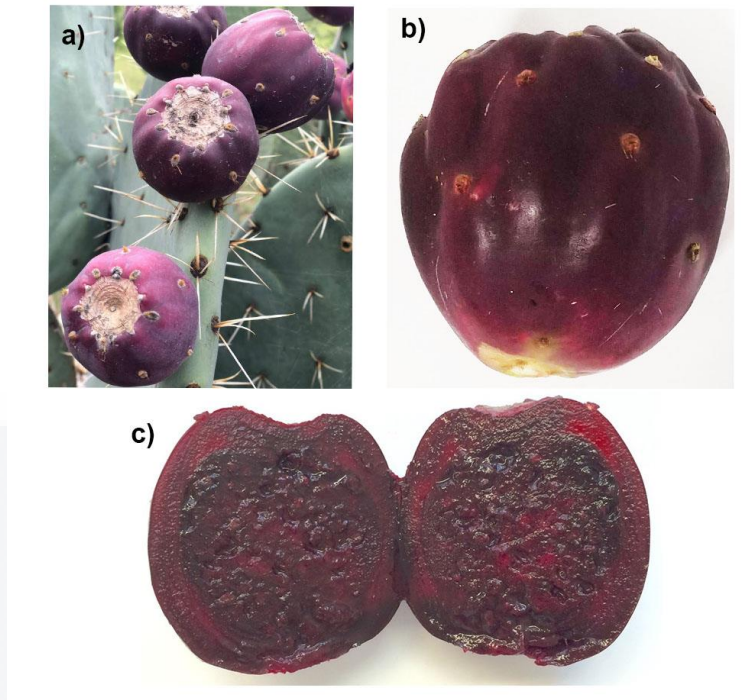


Figura 11. a) Cladodios de *Opuntia robusta* en el medio silvestre donde fueron colectados, con algunos frutos (tunas). Los cladodios son de forma circular y de color azulado. b) y c). Los frutos maduros alcanzan un tamaño de 7 a 11 cm.

9.1.1.1 Análisis bromatológico

Después de haber obtenido OrP y OrE, en primera instancia, se realizó el estudio bromatológico de OrP según la AOAC. 2001 (Karl Fischer, 2001). Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 9. Análisis bromatológico. Los resultados se muestran en dos apartados, BMS (base materia seca) y BMH (base materia húmeda). Metodología de acuerdo con la AOAC 2001 (método oficial 2001.12).

Determinación	OrP BMS	OrP BMH
Humedad (%)	-	62.01
Materia seca (%)	100	37.99
Proteína Cruda (%)	1.18	0.45
Fibra Cruda (%)	2.84	1.08
Grasa Cruda (%)	0.76	0.29

Cenizas (%)	6.75	2.56
ELN (%)	88.47	33.61

9.1.1.2 Determinación del contenido de humedad de OrP

Tabla 10. Porcentaje de humedad de OrP (pulpa del fruto de *Opuntia robusta*).

Muestras (repeticiones)	Porcentaje de agua	Media	Desviación estándar
P1	89.96	89.96	0.01
P2	89.95		
P3	89.97		

*Se realizó la medición por triplicado.

El porcentaje de humedad de OrP se realizó a través de dos métodos oficiales de la AOAC: (Karl Fischer, 2001) y (Horwitz, 2002). El primero de éstos métodos es característico para la determinación del contenido de humedad para tejido vegetal mediante el cual obtuvimos un resultado de 62.01% (Tabla 9), mientras que en el segundo, específico para frutas, resultó un promedio de 89.96% de agua en OrP (Tabla 10).

9.2 Determinación *in vitro* de la capacidad antioxidante de OrP

9.2.1 Determinación del contenido de betacianinas, fenoles solubles totales y flavonoides solubles totales en OrP

Tabla 11. Cuantificación de betacianinas, compuestos fenólicos solubles totales y flavonoides solubles totales en OrP; GAE /g= mg equivalentes de ácido gálico/gramo, base materia seca (dmb); CAE/g= mg equivalentes de catequina/gramo, db.

Betacianinas	Fenoles solubles totales	Flavonoides solubles totales
436.5 ± 57 mg of betacyanin equivalent/L	1118.0 mg GAE/100 g, dmb	793 mg CAE/100 g, dmb

El contenido de betacianinas obtenido de OrP fue de 436.5 ± 57 mg de equivalentes de betacianina/L (Tabla 11). Tomando en cuenta que el peso de 1 litro de OrP es 1032.6 g, su porcentaje de humedad es 89.96% y su porcentaje de sólidos es 10.04%, la cifra de betacianinas en base seca de OrP fue de 4.18 mg de equivalentes de betacianinas por gramo de muestra seca.

Por otra parte, OrP contiene 1118 mg de equivalentes de ácido gálico por cada gramos de muestra seca de fenoles solubles totales (Tabla 11). Dichos compuestos también son conocidos como antioxidantes hidrofílicos y son los metabolitos secundarios más abundantes en frutas (Macheix et al., 1990).

La determinación de flavonoides solubles totales tiene mucha relevancia en tejidos vegetales de los cuales se sospecha una posible capacidad antioxidante, ya que se trata de otro tipo de moléculas neutralizantes. En este caso, se utilizó como flavonoide estándar, la catequina y se obtuvieron 793 mg equivalentes de catequina/100 gramos en OrP (Tabla 11).

9.2.2 Determinación de capacidad antioxidante usando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Por otra parte, para evaluar la capacidad de donar electrones o átomos de hidrógeno de OrP traducida en TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox®) y expresada en micromoles de equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca (ET g/ms), se usó el método DPPH en el cual se utiliza este radical libre cuya reactividad es generada por su electrón impar. A causa de la presencia de dicho electrón, el difenilo presenta una banda de absorción a 515 nm cuando se encuentra en etanol, y sus soluciones poseen un color violeta intenso. A medida que el electrón se aparea, la absorción se desvanece y la decoloración resultante es estequiométrica con respecto al número de electrones absorbidos. OrP donará un átomo de hidrógeno y lo estabilizará. Se obtuvo un promedio de 2.27 mmol TE/L (micromoles de equivalentes de Trolox por litro de muestra) en OrP (Tabla 12), valor que figura dentro de la curva patrón elaborada (Figura 6) con cantidades conocidas de Trolox, lo que indica que el extracto de OrP presenta una capacidad antioxidante importante, comparado con la vitamina E, ya que el Trolox es análogo de ésta vitamina.

9.2.3 Determinación de actividad antioxidante usando el radical ácido 2,2'-azino-bis-3etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS^{•+})

Este método evalúa el mecanismo por el cual, la neutralización del radical libre genera otro radical menos reactivo, es decir, capacidad scavenging (Arnao et al., 2001) de una sustancia potencialmente antioxidante. Es un ensayo de decoloración aplicable a los antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos. Los resultados en OrP fueron $62.2 \pm 5.0 \mu\text{mol TE/g}$ (micromoles de equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca) (Tabla 12), se observa que ésta cifra fluctúa dentro de los valores de la curva patrón (Figura 7) construida con varias cantidades conocidas de Trolox pero sólo una cantidad constante de ABTS^{•+}, lo que indica que el fruto de *Opuntia robusta* posee una considerable capacidad antioxidante que radica en la donación de electrones para estabilizar a los radicales libres.

9.2.4 Determinación de la actividad antioxidante por el método Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP)

El método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) está fundamentado en la reducción de iones férricos a ferrosos (TPTZ-Fe⁺³ se reduce a TPTZ-Fe⁺²) a pH bajo, lo cual impide que entre en la reacción de Fenton que está asociada a la formación del radical hidroxilo (OH⁻), cuyo potencial de oxidación es muy elevado, formándose de ésta manera un complejo ferroso-tripiridiltriazina coloreado (Benzie & Strain, 1996) que se puede medir a 593 nm (Thaipong et al., 2006). Es la transferencia de electrones el mecanismo evaluado por este método. Se obtuvieron 80.2± 11.7 µmol TE/g en extracto de OrP (Tabla 12). Se puede observar que el resultado cae dentro de la curva estándar (Figura 8), indicando la evidente capacidad antioxidante del extracto de OrP.

9.2.5 Capacidad de eliminación de H₂O₂

La capacidad de OrP para eliminar H₂O₂ es de 15 ± 0.8% a una concentración de 100 µg/mL (Tabla 12).

Tabla 12. Determinación cuantitativa de la capacidad antioxidante de OrP por diferentes métodos; µmol TE/g, db= µmol de equivalentes de Trolox® por gramo de muestra seca. Los valores son la media de tres repeticiones.

DPPH	ABTS ^{•+}	FRAP	AAPH	Eliminación de H ₂ O ₂
2.27 mmol TE/L	62.2 ± 5.0 µmol TE/g, db	80.2± 11.7 µmol TE/g, db	247.9 ± 15.6 µmol TE/g, db	15 ± 0.8% at. 100 µg/mL

DPPH: El 2,2-difenil-1-picrilhidracilo; ABTS^{•+}: ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) ;FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power; AAPH: El diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano).

9.2.6 Determinación de la actividad antioxidante del OrP usando AAPH como indicador de daño oxidativo y hemólisis en eritrocitos humanos

9.2.6.1 Análisis Preliminar de Citotoxicidad Conducente a Hemólisis para el Extracto de Muestra Problema

$$\% \text{Hemólisis} = [(0.001-0.012) / (0.189-0.012)] 100 = -6.214\% \text{ Ecuación 5}$$

Considerando las cifras negativas al resolver la ecuación, se infiere que el extracto de OrP no causa hemólisis por sí mismo.

9.2.6.2 Análisis de Citoprotección por el Extracto de OrP contra la Hemólisis Oxidativa Inducida por AAPH

$$\% \text{ de Inhibición de Hemólisis} = 100 - \{[(0.900-0.040) / (1.402-0.040)]100\} = 36.85\%$$

Ec 7

$$\% \text{ de Inhibición de Hemólisis} = 100 - \{[(0.694-0.040) / (1.402-0.040)]100\} = 51.98\%$$

Ec 8

$$\% \text{ de Inhibición de Hemólisis} = 100 - \{[(0.735-0.040) / (1.402-0.040)]100\} = 48.97\%$$

Ec 9

Con una alícuota de 375 μl de una dilución 1:10 del extracto de OrP, se obtuvo un 45.93% de inhibición de hemólisis causada por AAPH.

9.2.6.3 Análisis de la Curva de Calibración de Citoprotección con Trolox^{MR} y con OrP

Valores de Eq. Trolox (Micromoles de equivalentes de Trolox®/gramo de muestra seca)

Alícuotas de 100 μl de muestra sin dilución

$$\text{Eq. Trolox} = \left(\frac{0.167 - 1.2818}{-0.0041} \right) \left(\frac{25\,000\ \mu\text{l}}{100\ \mu\text{l}} \right) \left(\frac{1}{2.5521 \times 10} \right) \left(\frac{1}{100 - 89.96} \right) = 265.29 \text{ Ec 13}$$

$$\text{Eq. Trolox} = \left(\frac{0.260 - 1.2818}{-0.0041} \right) \left(\frac{25\,000\ \mu\text{l}}{100\ \mu\text{l}} \right) \left(\frac{1}{2.5521 \times 10} \right) \left(\frac{1}{100 - 89.96} \right) = 243.2 \text{ Ec 14}$$

$$\text{Eq. Trolox} = \left(\frac{0.294 - 1.2818}{-0.0041} \right) \left(\frac{25\,000\ \mu\text{l}}{100\ \mu\text{l}} \right) \left(\frac{1}{2.5521 \times 10} \right) \left(\frac{1}{100 - 89.96} \right) = 235.1 \text{ Ec 15}$$

Promedio= **247.86** Micromoles de equivalentes de Trolox/ gramo de muestra seca.
 Alícuotas de 375 μl de muestra a una dilución 1:10

$$\text{Eq. Trolox} = \left(\frac{0.620 - 1.2818}{-0.0041} \right) \left(\frac{25\,000\ \mu\text{l}}{100\ \mu\text{l}} \right) \left(\frac{1}{2.5521 \times 10} \right) \left(\frac{1}{100 - 89.96} \right) = 42 \text{ Ec 19}$$

$$\text{Eq. Trolox} = \left(\frac{0.615 - 1.2818}{-0.0041} \right) \left(\frac{25\,000\ \mu\text{l}}{100\ \mu\text{l}} \right) \left(\frac{1}{2.5521 \times 10} \right) \left(\frac{1}{100 - 89.96} \right) = 42.3 \text{ Ec 20}$$

$$\text{Eq. Trolox} = \left(\frac{0.649 - 1.2818}{-0.0041} \right) \left(\frac{25\,000\ \mu\text{l}}{100\ \mu\text{l}} \right) \left(\frac{1}{2.5521 \times 10} \right) \left(\frac{1}{100 - 89.96} \right) = 40.2 \text{ Ec 21}$$

Promedio= **41.5** Micromoles de equivalentes de Trolox/ gramo de muestra seca.

Evidentemente, las muestras sin dilución son más efectivas como antioxidantes ya que presentan mayor cantidad de micromoles de equivalentes de Trolox® aún cuando el volumen de las alícuotas con dilución son más grandes, sin embargo, sus resultados se salen de la curva patrón mientras que los demás si fluctúan dentro de ella.

9.2.7 Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector UV (HPLC- UV) de vitaminas E y C.

Las vitaminas E y C son potentes antioxidantes presentes en OrE en 429,9 $\mu\text{g}/100\ \text{g}$ y 141,14 $\text{mg}/100\ \text{g}$, respectivamente. El contenido de vitamina C fue muy similar al reportado para guayaba, fruta conocida por su importante contenido de vitamina C (136,99 $\text{mg}/100\ \text{g}$) (Musyarofah et al., 2020).

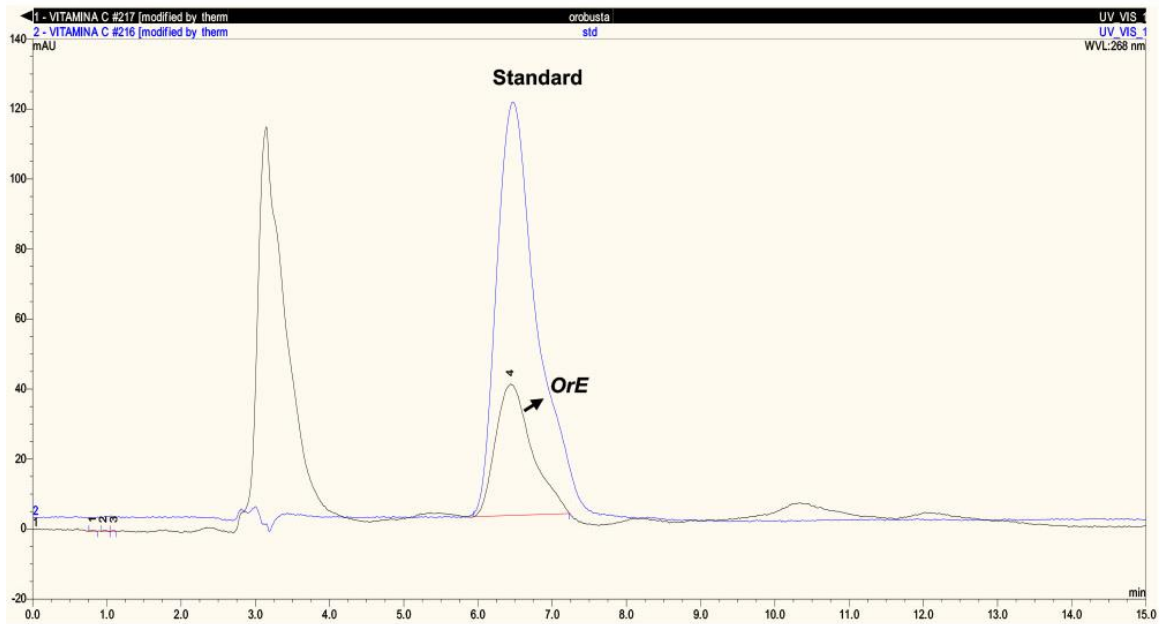


Figura 12. Cromatograma de HPLC-UV de vitamina C en el extracto de *Opuntia robusta* (OrE).

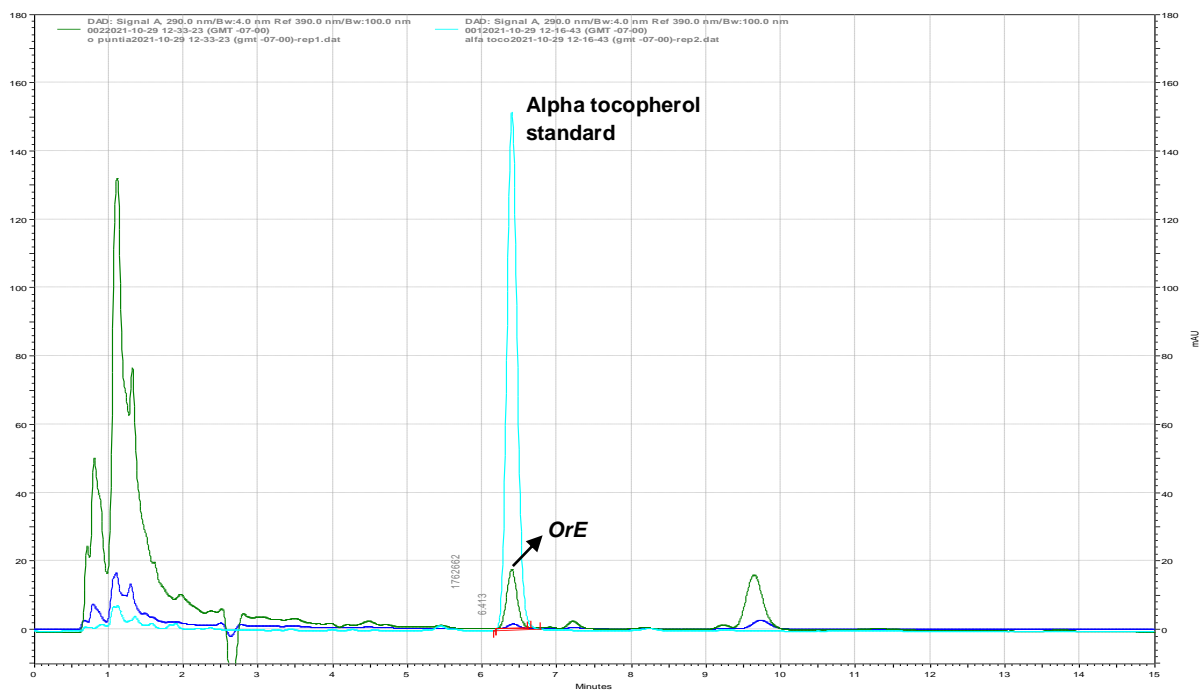


Figura 13. Cromatograma de HPLC-UV del estándar alfa tocoferol y vitamina E en OrE.

9.3 Modelo experimental *in vivo*.

La fibrosis es el resultado del daño crónico del parénquima hepático y se caracteriza por la elevación de las aminotransferasas, aumento del estrés oxidativo y alteraciones en la arquitectura hepática. Usando marcadores para evaluar estos cambios en el hígado, determinamos los efectos de Or sobre la fibrogénesis inducida con TAA.

9.3.1 Marcadores bioquímicos de daño hepático

9.3.1.1 Grupos experimentales hepatoprotectores

Asimismo, evaluamos la concentración de las aminotransferasas para determinar si alguno de los tratamientos hepatoprotectores poseen algún daño a los hepatocitos. Los resultados se muestran en la figura 14 y se puede observar que ninguno de los tratamientos causó daño hepático por sí mismo ya que todos muestran diferencia significativa contra TAA más no contra el grupo control.

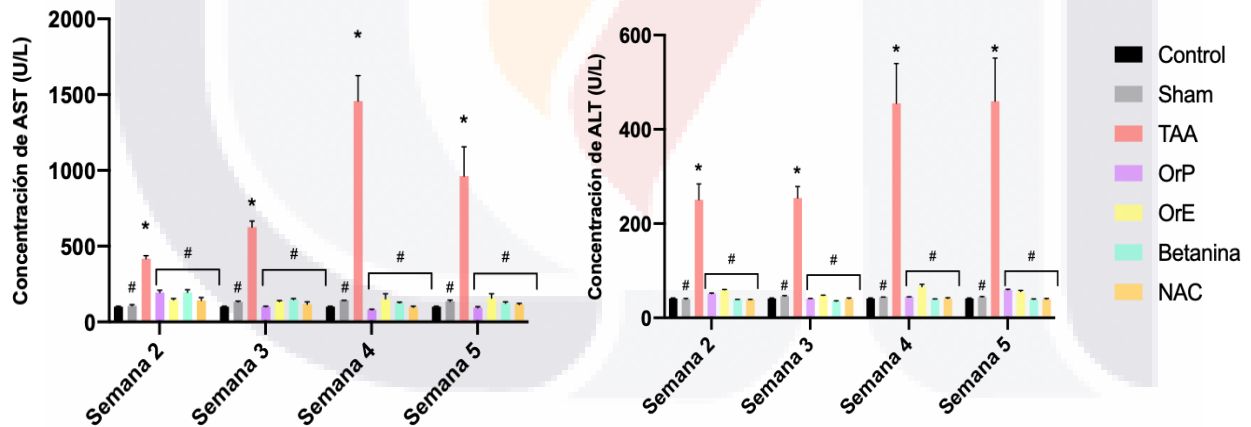


Figura 14. Concentraciones de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) entre los tratamientos hepatoprotectores en diferentes tiempos de evaluación. ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey. * $p < 0,05$ en comparación con el grupo de control, # $p < 0,05$ en comparación con el grupo de tioacetamida.

9.3.1.2 Grupos experimentales concomitantes

Los niveles séricos elevados de ALT y AST son indicadores de daño hepático (Al-Mehdar et al., 2012). La administración crónica de TAA provoca una elevación de las aminotransferasas séricas (Xie et al., 2012). La administración de OrP redujo significativamente los niveles de ALT y AST en animales tratados con TAA, lo que indica una reducción del daño hepático. En la segunda semana de tratamiento, OrP redujo los niveles de ALT más que la betanina (Figura 15). Demostrando que los demás biocomponentes de OrP actúan sinérgicamente con las betacianinas del fruto (Tabla 11), brindando una mayor citoprotección a los hepatocitos.

Durante la tercera semana, los niveles séricos de AST en ratas del grupo OrP/TAA no diferían del grupo control, pero sí del grupo TAA. Los niveles séricos de ALT en el grupo OrP/TAA fueron más bajos que en los grupos OrE/TAA y Betanina/TAA y similares a los niveles de ALT en el grupo NAC/TAA (Figura 15). OrP disminuyó el daño de los hepatocitos de manera muy efectiva en las primeras etapas de la patogénesis de la fibrosis hepática. Después de cuatro semanas de tratamiento, los grupos experimentales OrE/TAA y NAC/TAA mostraron diferencias significativas con respecto al grupo TAA (Figura 15). Por el contrario, la protección proporcionada por OrP es muy limitada en esta etapa.

Finalmente, en la quinta semana, los niveles séricos de AST de todos los grupos de tratamiento demostraron una diferencia significativa en comparación con el grupo TAA (Figura 15), lo que indica una protección significativa contra las lesiones causadas por TAA. OrP y OrE también redujeron significativamente los niveles de ALT en comparación con el grupo TAA (Figura 15), mostrando una marcada protección a los hepatocitos, ya que son las células que principalmente producen esta aminotransferasa.

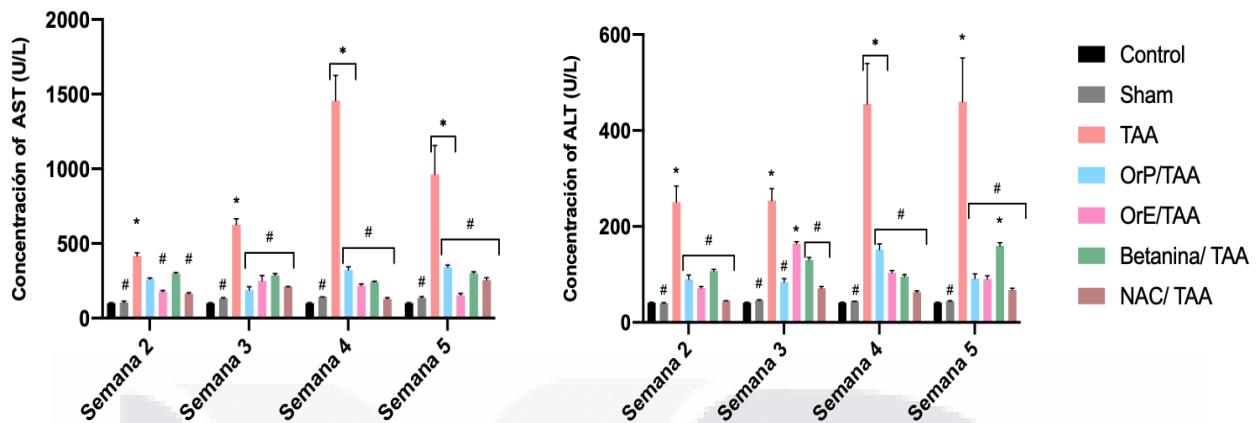


Figura 15. Concentraciones de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) entre los tratamientos concomitantes en diferentes tiempos de evaluación. ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey. * $p < 0,05$ en comparación con el grupo de control, # $p < 0,05$ en comparación con el grupo de tioacetamida.

9.3.2 Biomarcadores de estrés oxidativo

9.3.2.1 Glutatión reducido (GSH)

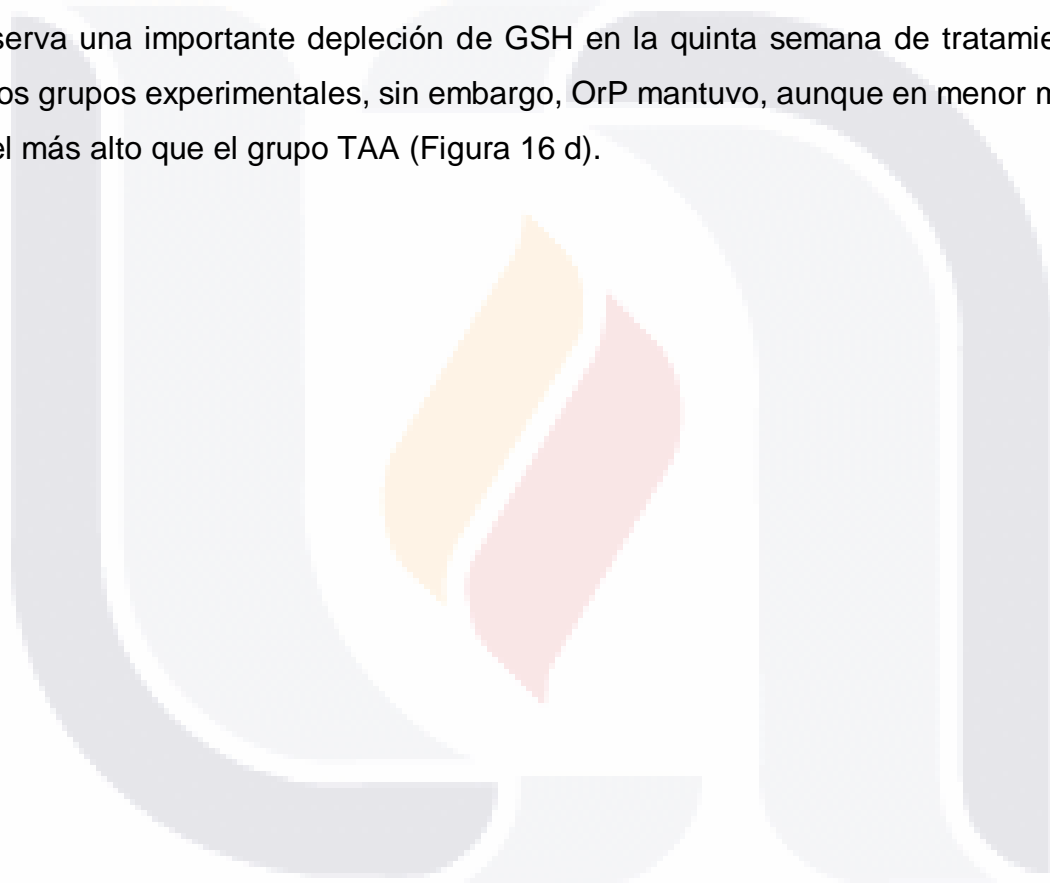
El metabolito tóxico de la tioacetamida $TASO_2$ es directamente neutralizado por el glutatión, es por ello, que una reducción importante en los niveles de esta molécula se observa en todos los cortes de tiempo del tratamiento con TAA cuando es comparado contra el grupo control (Figura 16a-d). Sin embargo, cuando TAA es administrada en conjunto con los agentes hepatoprotectores, se observa una recuperación de la concentración de GSH, incluso mayor que la del grupo control.

Como se muestra en la (Figura 16a, b y c) el tratamiento con betanina restablece los niveles de GSH a los niveles observados en el grupo control, mientras que el tratamiento con Or parece incluso aumentar la concentración de GSH en los tejidos en comparación con el grupo control. Este aumento ocurre en todos los tiempos de tratamiento pero es mayor en la semana 4. OrE, durante la segunda y tercera semana de tratamiento, presentó mayores efectos citoprotectores (Figura 16 a y b), resultados que a su vez,

concuerdan con los datos bioquímicos (Figura 15) e histopatológicos (Figura 19) pero en la semana 4, es el tratamiento con OrP el que promueve la síntesis de GSH (Figura 16 c).

Por otro lado, la dosis de NAC que se empleo en este modelo experimental generó una importante depleción del GSH en comparación con el grupo control, incluso también con el grupo de TAA (Figura 16 a-d). Mientras que los niveles de GSH en los grupos tratados con OrE y OrP fueron más altos que los mostrados por el grupo control (Figura 16 a,b y c).

Se observa una importante depleción de GSH en la quinta semana de tratamiento en todos los grupos experimentales, sin embargo, OrP mantuvo, aunque en menor medida, un nivel más alto que el grupo TAA (Figura 16 d).



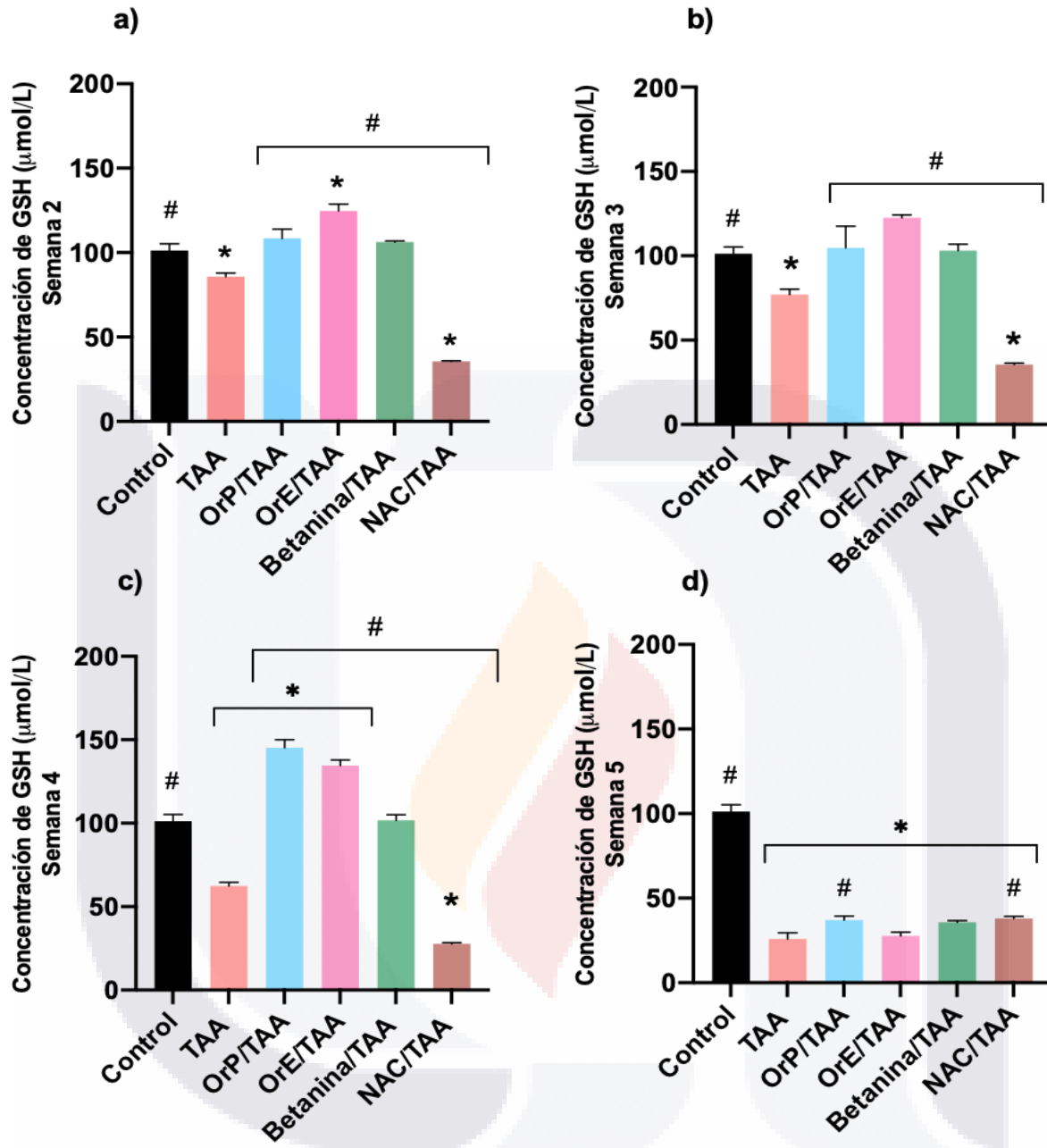


Figura 16. Concentraciones de glutatión reducido (GSH) en tejido hepático de los tratamientos en los diferentes cortes de tiempo. (A-C) OrP y OrE ayudan a reestablecer los niveles de GSH. (D) Una depleción significativa de GSH ha sido generada, el daño oxidativo es severo en el tratamiento crónico y los hepatoprotectores no tienen efecto en este punto. ANOVA de una vía con análisis post hoc de Dunnett. * $p < 0.05$ comparado contra el grupo control, # $p < 0.05$ comparado contra el grupo TAA.

9.3.2.2 Malondialdehído

La formación excesiva de radical superóxido causada por T_{ASO}₂ conduce a la oxidación de los lípidos insaturados de la membrana celular y a la subsiguiente formación de MDA, el cual forma aductos con el ADN, lo que finalmente desencadena la muerte celular. Asimismo, la peroxidación lipídica de la membrana celular de los hepatocitos es una de las principales causas de daño hepático (Bashandy et al., 2020). De acuerdo con ello, en la Figura 17a-c, mostramos que en nuestro modelo experimental hubo un aumento en MDA durante todo el tratamiento con TAA desde la semana 2 en adelante.

OrE ejerció mayor protección que OrP ya que disminuyó los niveles de MDA en las semanas 2, 3 y 4, mientras que OrP no brindó ninguna protección (Figura 17). OrE, en las semanas 3 y 4 (Figura 17 b y c) de tratamiento, demostró ser incluso más eficaz que la betanina.

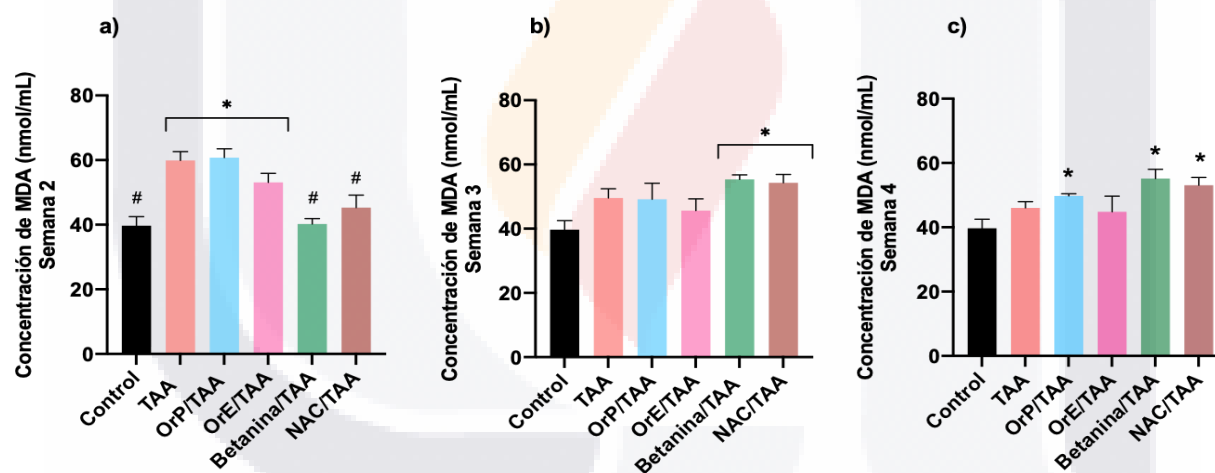


Figura 17. Concentraciones de malondialdehído (MDA) de los tratamientos en los diferentes tiempos de evaluación. (A-C) OrE disminuye los niveles de malondialdehído de manera más eficiente que OrP. ANOVA de una vía con análisis post hoc de Dunnett. * $p < 0.05$ comparado contra el grupo control, # $p < 0.05$ comparado contra el grupo TAA.

9.3.3 Análisis histopatológico de los grupos experimentales

9.3.3.1 Grupos hepatoprotectores

La histología del hígado control mostró arquitectura sinusoidal cordonal característica, morfología poligonal normal de los hepatocitos, relación núcleo/citoplasma adecuada en cuanto al tamaño, ausencia de infiltrado inflamatorio y de zonas fibróticas. Los grupos de hepatoprotectores conservaron la arquitectura normal del parénquima hepático (figura 18).

Grupos hepatoprotectores

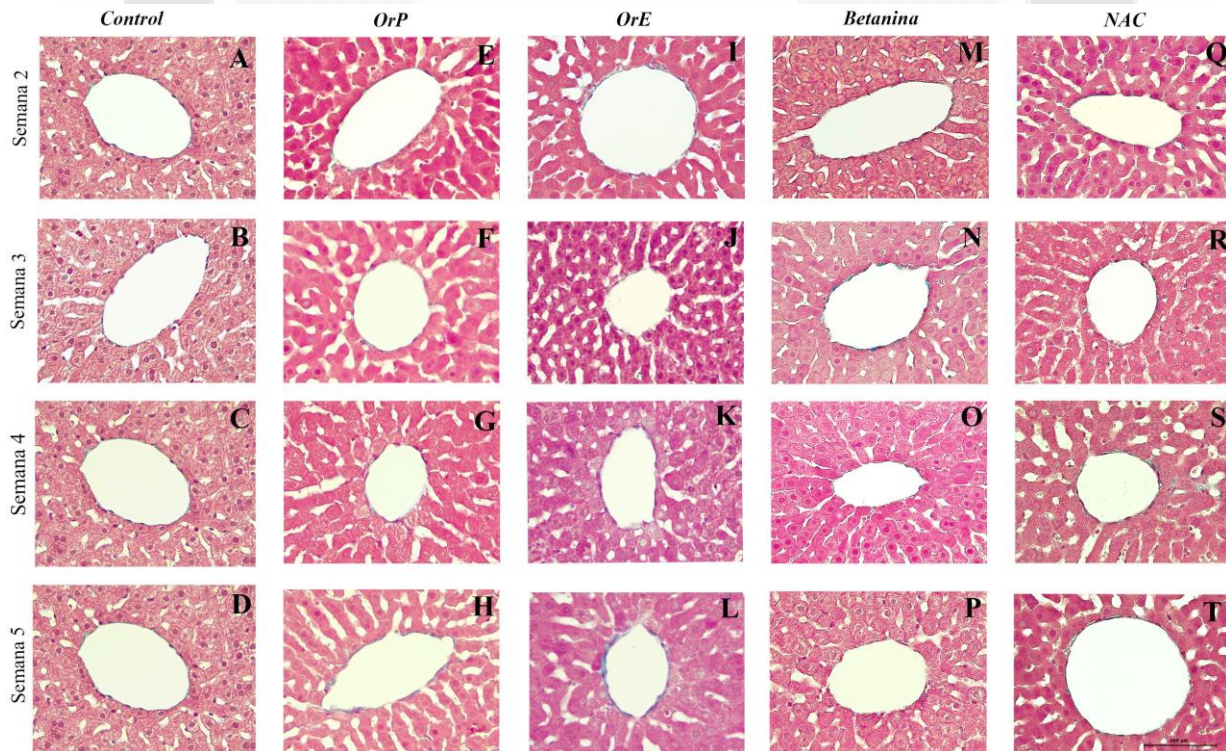


Figura 18. Estudio histopatológico de los grupos tratados con los hepatoprotectores. (A-D) Se muestra la arquitectura normal del parénquima hepático. (E-T) Los tratamientos con OrP, OrE, Betanina y NAC conservaron las características morfológicas del hígado. Tinción tricrómica de Masson. 400x.

9.3.3.2 Grupos concomitantes

En comparación con los controles sanos, los hígados de las ratas tratadas con TAA mostraron extensas áreas de vacuolización, necrosis y fibrosis, especialmente en la zona 3, infiltrado inflamatorio y pérdida de la arquitectura normal del parénquima hepático. Se observó que la administración de Or redujo significativamente los cambios histopatológicos inducidos por TAA (Figuras 19 y 20).

Se observó daño desde la zona 3 hasta los espacios portaes (Figura A-D). Este patrón de daño fue persistente; aunque la administración de OrP durante dos semanas (Figuras 19E, 20E y 21) atenuó el daño (Figura 19 A, 20 A y 21).

A partir de la tercera semana de administración de TAA (Figuras 19B y 20B), se observa un efecto benéfico en el grupo OrP (Figuras 19F y 20F) y OrE (Figuras 19J y 20J), comparable o incluso mayor que el observado con NAC (Figuras 19R y 20R), fármaco hepatoprotector utilizado clínicamente para restaurar los niveles de GSH en enfermedades fibróticas (Yormaz et al., 2012). OrP y OrE disminuyen el daño celular en fases tempranas y reducen la fibrosis en todas las etapas de la patogénesis de la fibrosis hepática (Figura 21). En la semana 4 de tratamiento con OrP/TAA (Figuras 19G y 20G), el proceso fibrótico estaba bien desarrollado; aunque, el área superficial del parénquima hepático dañado fue menor en comparación con el grupo TAA (Figuras 19C y 20C). Tanto OrP como OrE disminuyeron el grosor de los tabiques interlobulillares fibróticos, siendo OrE más efectiva (Figura 21).

Los tabiques fibróticos provocaron la pérdida total de la arquitectura normal en los lobulillos hepáticos en la semana 5 de administración con TAA (Figura 19D y 21). En este momento, histológicamente, OrP disminuyó la necrosis y fibrosis (Figuras 19H, 20H y 21) inducida por TAA. Mientras que el tratamiento con OrE disminuyó considerablemente el grosor de los septos de fibrosis (Figuras 19L, 20L y 21). Or, aunque en menor medida, también ejerce un efecto citoprotector en estadios avanzados de fibrosis hepática, retrasando la formación de tabiques fibróticos.

Los tratamientos con OrP y OrE mitigaron los cambios histopatológicos en el hígado de ratas que recibieron TAA, esto se puede atribuir a sus propiedades antioxidantes, reducción de los niveles de MDA y su influencia en la mejora de los niveles de glutatión reducido.

Grupos concomitantes

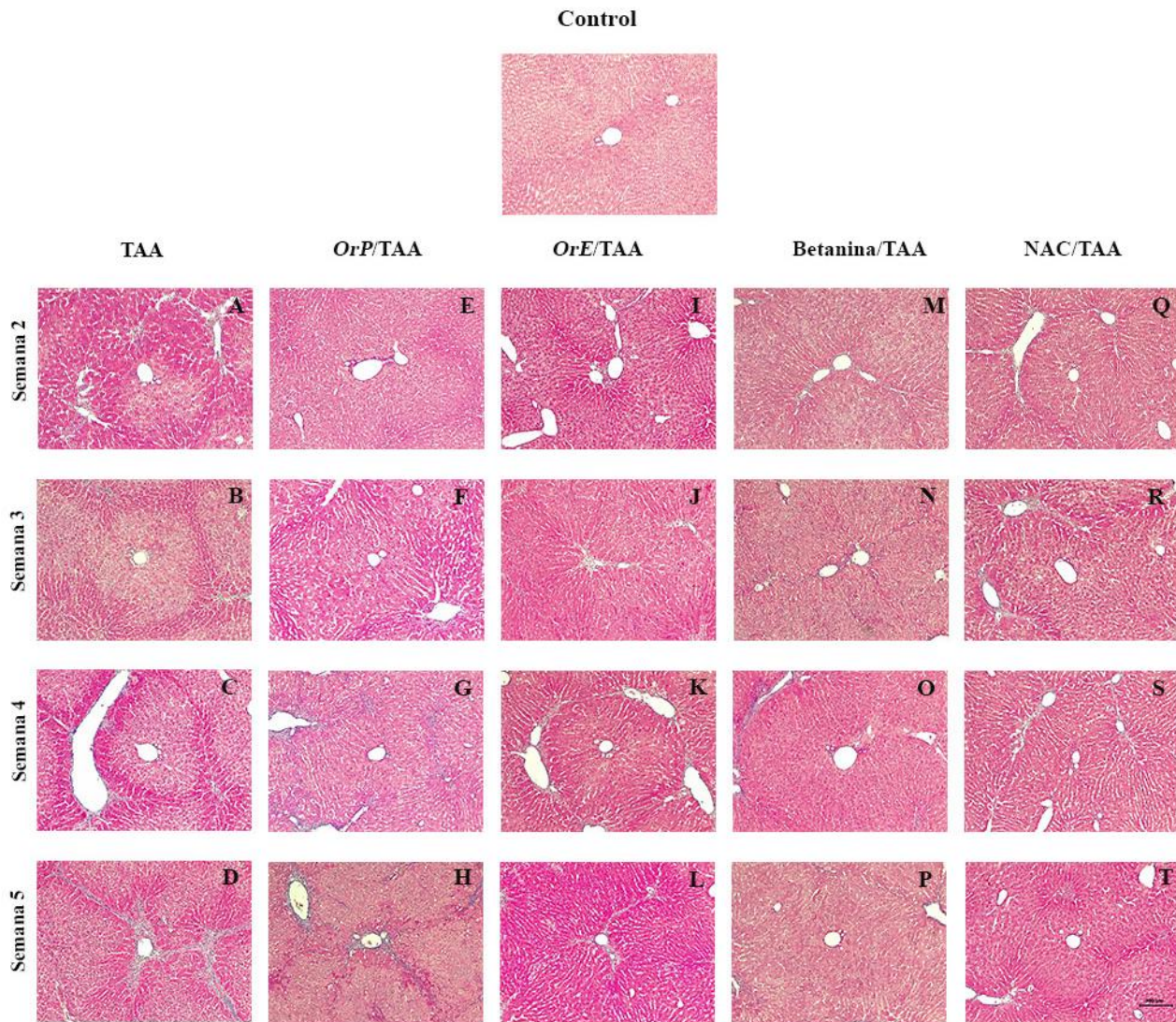


Figura 19. Proyecciones de daño desde la zona 3 hacia los espacios portales. (A–D) El tratamiento con TAA mostró extensas áreas de vacuolización, necrosis y fibrosis. Los tratamientos concomitantes disminuyen la severidad del daño. (E–H) OrP retrasa los cambios morfológicos del proceso fibrótico generado por TAA. (I–T) OrE, Betanin y NAC disminuyen el proceso fibrótico en todas las semanas de tratamiento. Tinción tricrómica de Masson. 100x.

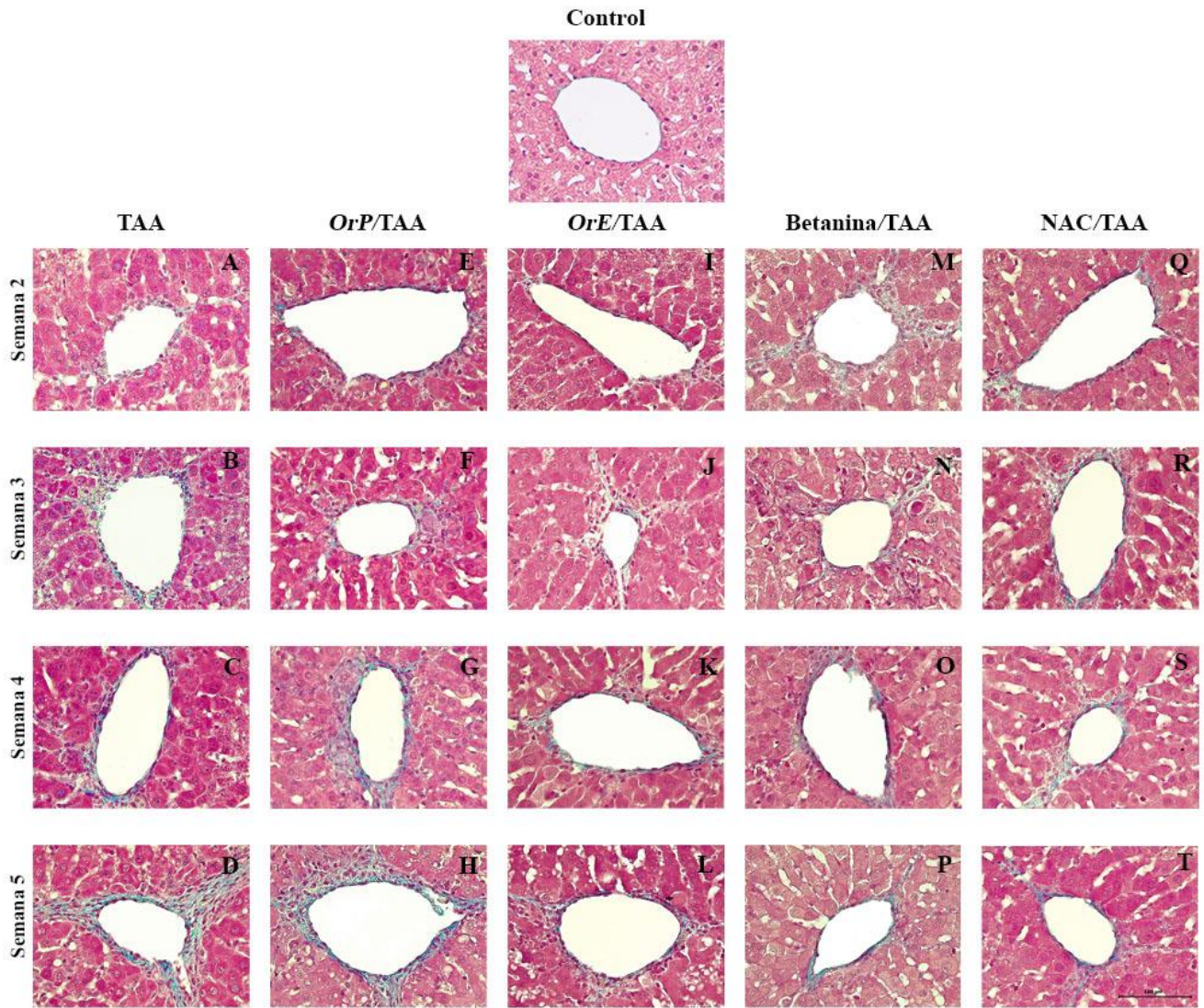


Figura 20. Efecto de los hepatoprotectores en la histopatología del daño hepático inducido con TAA a través del tiempo. (A-D) Se muestra necrosis y septos de fibrosis en la zona 3 del acino hepático con la administración de TAA. (E-T) Los tratamientos con OrP, OrE, Betanina y NAC disminuyeron el número de células dañadas y el grosor de los septos de colágeno. Tinción tricrómica de Masson. Magnificación total (400x).

9.3.3.3 Morfometría

Al realizar las mediciones de los tabiques interlobulillares de colágeno I en los grupos experimentales concomitantes, se evidenció que, en todas las semanas de administración, los tratamientos disminuyeron el proceso fibrótico de manera importante ya que todos muestran diferencia contra el grupo de TAA (Figura 21).

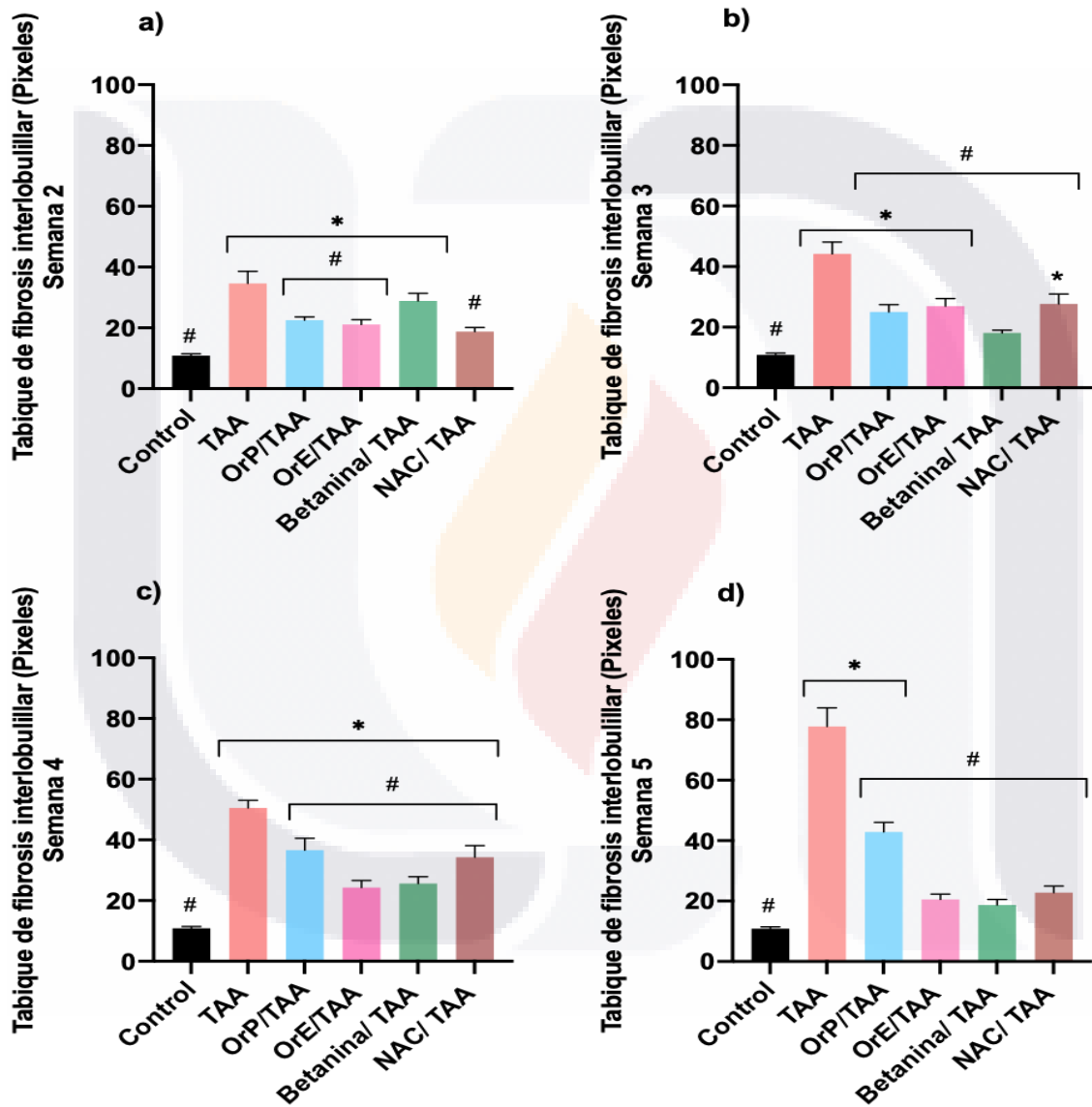


Figura 21. Morfometría de los tabiques fibróticos interlobulillares de los diferentes tratamientos, en los diversos cortes de tiempo. (A-D) En todas las semanas de tratamiento evaluadas, OrP y OrE disminuyen significativamente el grosor de los septos fibróticos de colágeno. ANOVA de una vía con análisis post hoc de Dunnett. * $p < 0.05$ comparado contra el grupo control, # $p < 0.05$ comparado contra el grupo TAA.

9.4 Biomarcadores moleculares de daño hepático

9.4.1. Expresión génica relativa de TNF- α

TNF- α es una citocina asociada con el proceso inflamatorio generado durante la fibrogénesis hepática. En la segunda semana de tratamiento con los hepatoprotectores (Figura 22 a) se pueden observar niveles elevados de TNF- α en los grupos TAA y OrE con 0.3 y 1 veces de inducción del gen sobre el control respectivamente, mientras que los controles Betanina y NAC, los disminuyeron. En las semanas 3 y 4, solamente en el grupo OrE se observa un aumento del doble de inducción sobre la expresión dada por el grupo control (Figura 22 b y c).

Asimismo, en la semana 2 de progresión del daño en los grupos concomitantes, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Figura 23 d). Sin embargo, se observó un aumento en los grupos concomitantes de TAA con OrP y Betanina en las semanas 3 (2.5 y 1.7 veces de inducción sobre la expresión dada en el control, respectivamente) y 4 (1.4 y 2.3 veces de inducción sobre la expresión dada en el control, respectivamente) (Figura 23 e y f). Mientras que el grupo OrE/TAA presentó una vez de inducción sobre el control en las semanas 3 y 4 de tratamiento.

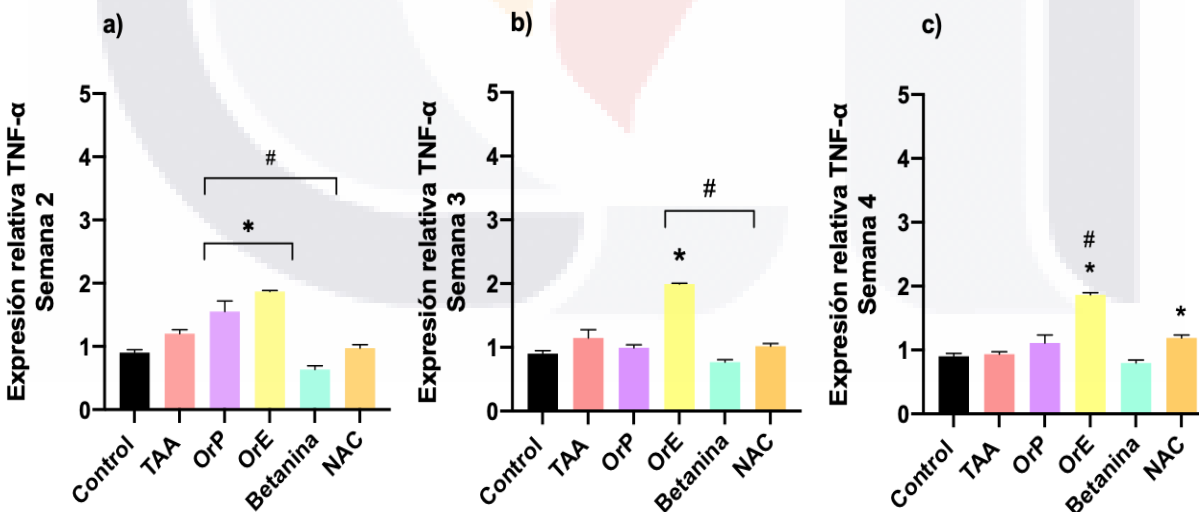


Figura 22. Expresión génica relativa de TNF- α de los grupos hepatoprotectores. Los niveles de expresión relativa se normalizaron contra 18s. Los resultados fueron reportados como veces de inducción de las muestras de interés con respecto a los valores obtenidos de las muestras control.

ANOVA de una vía con análisis post hoc de Dunnett. * $p < 0.05$ comparado contra el grupo control, # $p < 0.05$ comparado contra el grupo TAA.

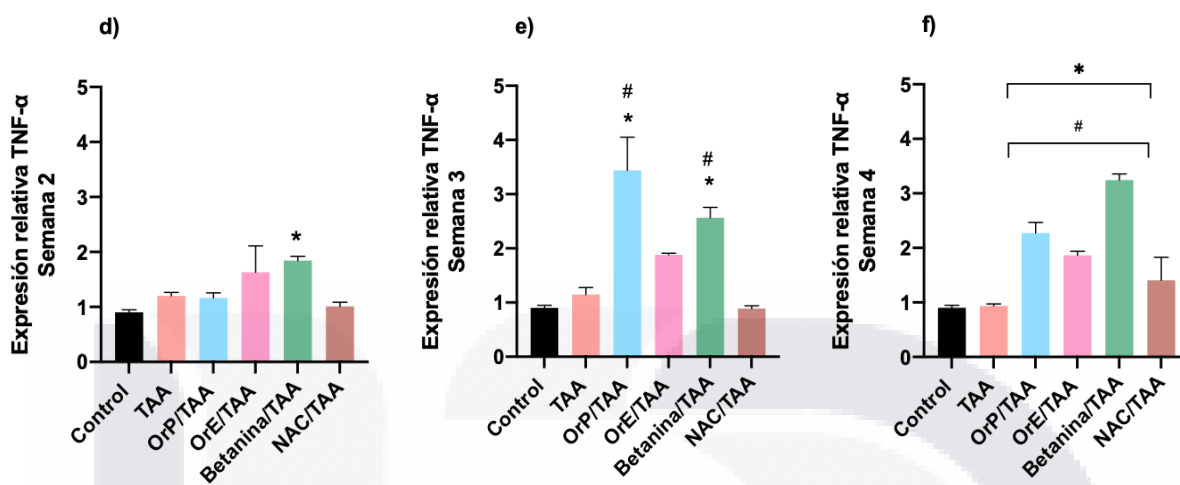


Figura 23. Expresión génica relativa de TNF- α de grupos concomitantes. Los niveles de expresión relativa se normalizaron contra 18s. Los resultados fueron reportados como veces de inducción de las muestras de interés con respecto a los valores obtenidos de las muestras control. ANOVA de una vía con análisis post hoc de Dunnett. * $p < 0.05$ comparado contra el grupo control, # $p < 0.05$ comparado contra el grupo TAA.

9.4.2. Expresión proteica relativa de α -SMA

α -SMA es un marcador de activación de HSC que se ha monitoreado en este estudio con la finalidad de evaluar el efecto de Or sobre la posible regresión de la fibrosis en este nivel. En la figura (Figura 24), se muestra la densitometría de los grupos a los que se les administraron solamente los hepatoprotectores. La ausencia de bandas indica que ninguno de los tratamientos provocó la activación de las HSC en ninguno de los tiempos evaluados.

En contraste con los grupos experimentales concomitantes, en los cuales, en la semana 2 (Figura 25 b) se observa un aumento evidente de la proteína α -SMA en el grupo TAA comparado contra el control, sin embargo, tanto Or como Betanina muestran un aumento incluso mayor; mientras que NAC presentó un nivel de α -SMA disminuido.

En la semana 3 de tratamiento (Figura 25 c), de igual manera, en el grupo TAA se observa un aumento considerable de la proteína α -SMA cuando es comparado contra el grupo control, sin embargo, todos los tratamientos muestran el mismo comportamiento. Mientras que en la semana 4 (Figura 25 d), OrP disminuyó la concentración de α -SMA en tejido hepático, indicando un efecto protector al impedir que las células estelares se activen y den lugar a su fenotipo secretor, responsable en gran medida de la perpetuación de la fibrosis hepática, brindando un efecto antifibrótico incluso mayor que aquel observado en el grupo tratado con Betanina. OrE y NAC se muestran incluso más elevados que TAA. Durante la semana 5 de tratamiento, solamente OrP muestra contención en la activación de las HSC (Figura 25 e).

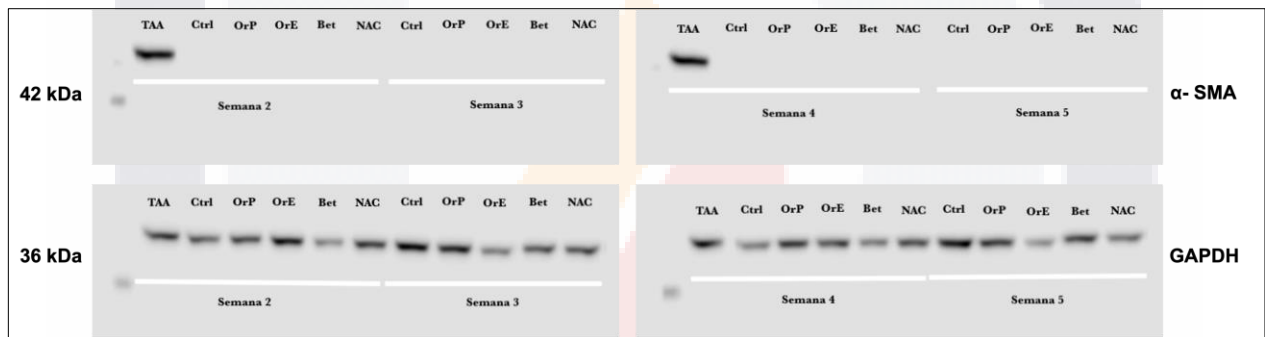


Figura 24. Expresión proteica relativa de α -SMA de los grupos de hepatoprotectores. Se puede observar que ninguno de los tratamientos administrados presentó la proteína. Se utilizaron muestras del grupo experimental TAA para confirmar la correcta realización de la técnica, por lo tanto, la legitimidad de los resultados.

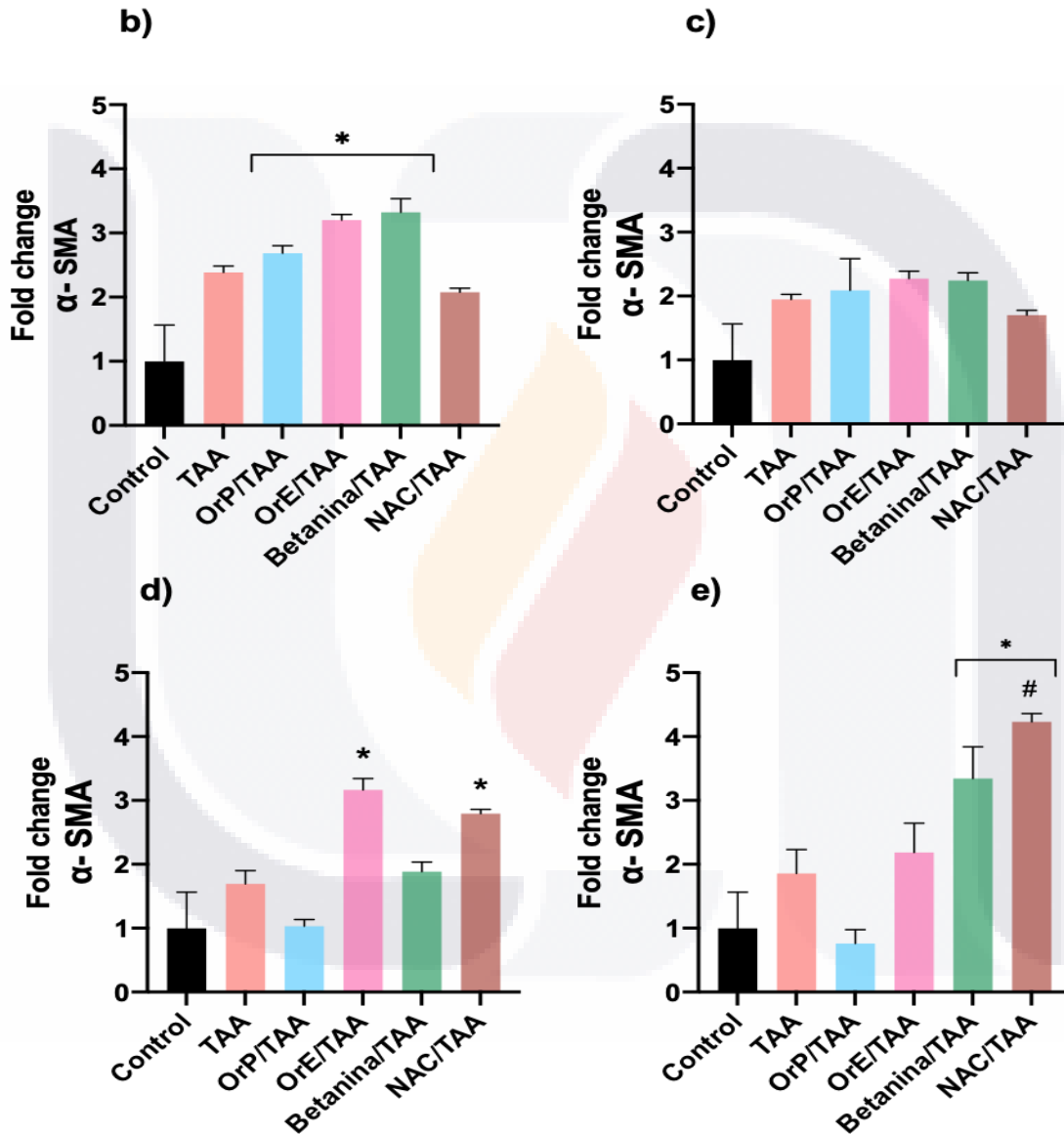
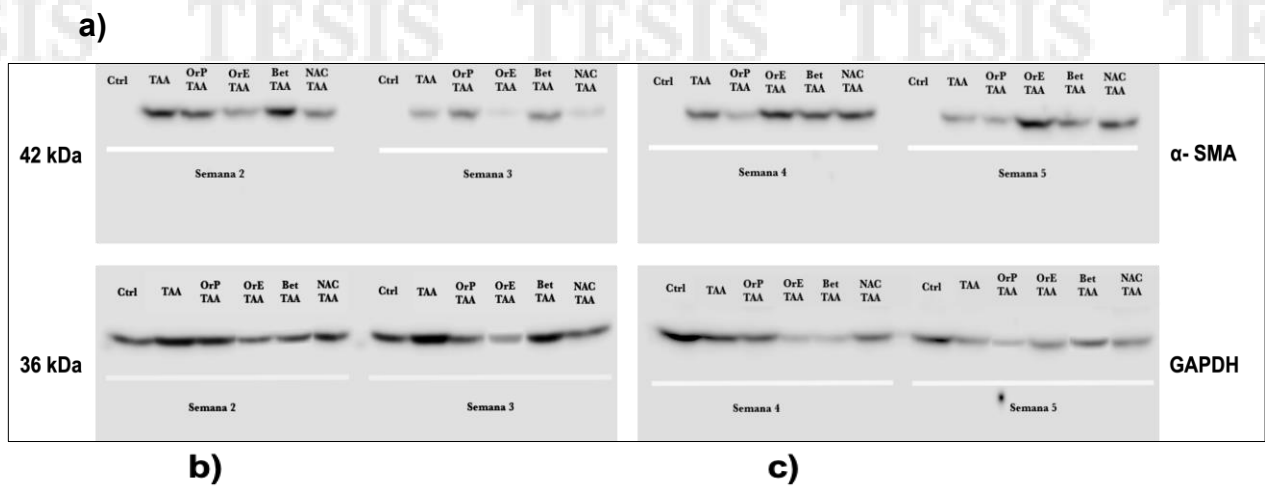


Figura 25. Expresión proteica relativa de α -SMA. a) Densitometría de las bandas obtenidas. Los niveles de expresión relativa se normalizaron contra la proteína constitutiva GAPDH. Análisis estadístico de la densitometría b) Semana 2 c) Semana 3, d) Semana 4 y e) Semana 5 de tratamiento. ANOVA de una vía con análisis post hoc de Dunnett. * $p < 0.05$ comparado contra el grupo control, # $p < 0.05$ comparado contra el grupo TAA.

X) DISCUSIONES

Los frutos del género *Opuntia* forman parte esencial de la cultura mexicana. Además de su gran distribución en el país, su consumo es una práctica emblemática desde épocas antiguas, sin embargo, en los últimos años se ha redirigido el enfoque de su importancia, debido a su efecto benéfico sobre algunas enfermedades. Es por ello, que algunos estudios se han enfocado a conocer la composición de éstos frutos. En el presente estudio analizamos las características bromatológicas, la capacidad nutracéutica y el efecto hepatoprotector de OrP.

Evaluamos los porcentajes obtenidos de OrP y obtuvimos un porcentaje de 47.81%, resultados que concuerdan con los reportados por (Piga, 2004) quien menciona que un 45-67% del peso total del fruto es de pulpa.

Se realizó el estudio bromatológico de OrP el cual consta de varias determinaciones, entre ellas, el contenido de humedad de la muestra, y se obtuvo un porcentaje de 62.01% y 89.96% mediante dos métodos distintos, AOAC 2001.12 (2001) y AOAC 920.151 (2002) respectivamente (Tablas 9 y 10). El primero de éstos métodos es característico para la determinación del contenido de humedad para tejido vegetal, mientras que el segundo para frutas; las diferencias encontradas sugieren que los frutos destinados para cada una de las determinaciones estuvieron expuestos a distintos estímulos externos, lo cual afectó la cantidad de agua contenida en ellos, ya que se sabe que sus compuestos y proporciones, dependen en gran medida del ambiente (Cota-Sánchez et al., 2013). Por otro lado, también se sostiene que la pulpa es la parte comestible del fruto y está compuesta en un 84% a 90% por agua (Piga, 2004). Para el caso particular de OrP, se ha reportado con anterioridad un porcentaje de humedad de 84.10 ± 0.140 (Torres-Bojórquez et al., 2017), cifra muy cercana a las obtenidas en el presente estudio y cuyo método se basa, de igual manera, en métodos oficiales de la AOAC. A su vez, se han analizado otras especies de frutos de *Opuntia*, por ejemplo, *ficus-indica* la cual posee un porcentaje de 85.60% (Sawaya et al., 1983), muy parecido al porcentaje de humedad de Or y determinada bajo el criterio de la AOAC, 1980. Debido a su gran porcentaje de agua, estas especies son bien conocidas por mitigar la escasez de alimentos y agua en áreas propensas a la sequía (Chaouch et al., 2016).

El resto de parámetros determinados en el análisis bromatológico de OrP se muestran en la tabla 9, mismos que han sido analizados en la pulpa del fruto de *Opuntia ficus-indica* (Sawaya et al., 1983), sin embargo, *Opuntia robusta* muestra un mayor porcentaje de proteína, grasa y fibra en comparación con *ficus-indica*. También se analizó el extracto libre de nitrógeno (ELN) obteniendo un porcentaje de 33.61%.

Del análisis bromatológico, podemos inferir que las plantas de las que se recolectaron los frutos son de mediana edad debido a que existe una correlación inversa entre el contenido de fibra cruda, que aumenta con la edad de la planta (van Soest, 1994) y el contenido de proteína bruta que disminuye en las plantas envejecidas. Además, se deduce un importante valor nutricional de OrP, considerando su alto porcentaje de extracto libre de nitrógeno (NFE). NFE representa carbohidratos altamente digeribles, que al igual que los carbohidratos totales, también aumentan con la edad (van Soest, 1994).

También se evaluaron las concentraciones de algunos metabolitos con actividad biológica como los compuestos fenólicos, flavonoides, vitaminas C y E y los pigmentos betalaínas. Las betalaínas son metabolitos secundarios clasificados en dos grupos principales: betacianinas y betaxantinas dependiendo de los grupos conjugados con el precursor ácido betalámico (González Ponce et al., 2018). Las betacianinas se consideran antioxidantes debido a su capacidad para eliminar los radicales libres directamente por la presencia de un grupo amino cíclico, que actúa como donante de hidrógeno o indirectamente a través de factores de transcripción sensibles a redox, como Nrf2, que activa la respuesta antioxidante celular a través de AREs (elementos de respuesta antioxidante). El contenido de betacianinas obtenido de OrP fue de $436,5 \pm 57$ mg de equivalentes de betacianina/L (Tabla 11), valores similares a los reportados previamente (González Ponce et al., 2020), $464,9 \pm 10,87$ mg de equivalentes de betacianina/L y superiores a los encontrados por (González-Ponce et al., 2016) $333,27 \pm 11,46$ mg de equivalentes de betacianina/L. Teniendo en cuenta que el peso de 1 L de OrP es de 1032,6 g, su porcentaje de humedad es del 89,96 % y su porcentaje de sólidos del 10,04 %, la cifra en base seca de betalaínas obtenida fue de 4,18 mg de equivalentes de betacianinas por gramo de OrP seca, cifra significativamente superior a la reportada

por (Castellanos-Santiago & Yahia, 2008) (2.06 ± 0.06 mg/g de pulpa seca) para *Opuntia robusta*, la cual, a su vez, fue comparada con otras especies: *ficus-indica* ($0.39 \pm 0,03$ mg/g pulpa seca), *megacantha* ($0,065 \pm 0,01$ mg/g pulpa seca) y *albi-carpa* ($0,05 \pm 0,02$ mg/g pulpa seca). Esto indica que Or tiene una capacidad antioxidante mayor que otras especies de *Opuntia*, ya que esta capacidad es directamente proporcional a su contenido de betacianinas. La betanina es una betacianina importante y tiene una estructura química que permite la neutralización de los principales radicales libres responsables de la peroxidación lipídica. El potencial redox de la betanina convierte a esta molécula en un reductor eficaz de los radicales peroxilo derivados de los lípidos insaturados de las membranas biológicas (Buettner, 1993). La betanina también actúa como eliminador de dióxido de nitrógeno, el radical iniciador del proceso oxidativo de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). La capacidad antioxidante de la betanina está ligada a su grupo fenol (Livrea & Tesoriere, 2012) e induce la vía antioxidante Nrf2 (Krajka-Kuźniak et al., 2013). Asimismo, la estructura molecular de las betacianinas tiene un sitio donador y un sitio receptor de electrones, unidos por un sistema π conjugado, esto genera un proceso de transferencia de electrones intramoleculares y facilita su flujo dentro de la molécula (Marañón-Ruiz et al., 2011). La potencia antioxidante de las betacianinas se puede atribuir a este mecanismo ya que puede donar o eliminar electrones de especies radicales. Las betacianinas pueden reducir el daño oxidativo presente en la fibrosis hepática inducida por la tioacetamida al neutralizar los radicales superóxido que se generan por su biotransformación.

En cuanto a la estimación de los compuestos fenólicos solubles totales, OrP tiene 1118,0 mg GAE/100 g de fenoles solubles totales (Tabla 11). (Zenteno Ramírez, 2016) comparó frutos de distintas especies de *Opuntia*, *Opuntia ficus-indica* 1.92 mg/g, *Opuntia megacantha* 3.81 mg/g, *Opuntia streptacantha* 1.67 mg/g y *Opuntia robusta* 2.52 mg/g, esta discrepancia podría estar dada por el método de extracción ya que mientras nosotros usamos una solución de metanol acuoso al 50% (v/v) en la primer extracción y acetona acuosa 70% (v/v) en la segunda, ellos usaron metanol acidificado (0.1% ácido clorhídrico), y sonorización en un baño de agua durante 10 min. Por otra parte, (Fernández-López et al., 2010) informaron 218,8 mg/100 g en *ficus-indica* y lo

compararon con *Opuntia stricta* (204,4 mg/100 g) y *ondulata* (164,6 mg/100 g). Or tiene un número importante de compuestos fenólicos, incluso superior a los reportados para estas especies usando el mismo método de Folin-Ciocalteu. Los compuestos fenólicos, también conocidos como antioxidantes hidrófilos, son los metabolitos secundarios más abundantes en las frutas (Macheix et al., 1990). Se ha informado que la pulpa de las frutas de *Opuntia* spp. contienen compuestos fenólicos y otros antioxidantes que tienen un efecto positivo en el equilibrio redox celular, principalmente debido a la reducción de los niveles de LDL (Galati et al., 2002). Or contiene una mayor cantidad de fenoles solubles totales que las otras especies de *Opuntia* que se han estudiado. Sin embargo, también ha indagado en otros frutos la concentración de compuestos fenólicos totales, como en la pitaya roja 166.5 mg/100 g en una alícuota de 100 μ l (García-Cruz et al., 2012) y en el betabel 35.5 mg/g en 200 μ l de muestra (Molina et al., 2014). *Opuntia robusta*, evidentemente presenta una mayor cantidad de fenoles solubles totales que estas frutas. Los polifenoles se caracterizan por quelar metales y así evitar la reacción de Fenton que se asocia al estallido del estrés oxidativo celular (Malireddy et al., 2012b). Además, la inhibición de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados se correlaciona con la capacidad antioxidante de los polifenoles (Cazzola & Cestaro, 2011); en consecuencia, se infiere que Or previene la oxidación de los lípidos de membrana y la necrosis celular.

Al evaluar la concentración de flavonoides se obtuvo que OrP contiene 793 mg de equivalentes de catequina (CAE) por 100 g de fruto en base seca (Tabla 11). Parte de la actividad benéfica de estas especies se atribuye al efecto sinérgico de los flavonoides con las betalaínas (Galati et al., 2002). Esto sugiere que la importante actividad antioxidante de OrP no solo se debe a su considerable cantidad de betacianinas, sino también a su interacción con compuestos fenólicos, incluidos los flavonoides, que tiene efectos sobre el metabolismo de los lípidos (Hwang et al., 2011), aumentando los niveles plasmáticos de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (Toufektsian et al., 2011). Además, el consumo de flavonoides estimula la conversión del ácido alfa-linolénico en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 EPA y DHA (Villasante et al., 2015). La ingesta de flavonoides también se ha asociado con un

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aumento en la concentración de ácidos grasos poliinsaturados al modificar la actividad enzimática o la expresión génica de las enzimas desaturasas de ácidos grasos $\Delta 5$ y $\Delta 6$ (Pérez-Torres et al., 2014); por lo tanto, reduce el daño oxidativo a los lípidos de la membrana. Los flavonoides también atenúan el daño oxidativo al aumentar la actividad de los mecanismos antioxidantes endógenos, como el antes mencionado, factor de transcripción Nrf2 (Miler et al., 2016). Una generación excesiva de ROS provoca la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados que constituyen las membranas biológicas, provocando eventualmente daño y muerte celular. Los flavonoides y la betanina inhiben la formación de radicales alquilo, la entidad molecular asociada con la oxidación de los lípidos (Vargas Mendoza Nancy, 2012). Además, se ha informado que la betanina elimina los aniones superóxido (Esatbeyoglu et al., 2014) y este efecto de eliminación aumenta en presencia de flavonoides (Galati et al., 2002). Or ha demostrado ser la especie con mayor concentración de betalaínas, compuestos fenólicos totales y flavonoides (de Wit et al., 2016; González-Ponce et al., 2016), lo que confirma sus importantes actividades biológicas, principalmente su capacidad antioxidante. Proponemos que su consumo reduce la gravedad de la fibrosis hepática.

Para evaluar el efecto antioxidante y dilucidar los posibles mecanismos de citoprotección de Or, realizamos el ensayo de captación de radicales libres DPPH, obteniendo 2.27 mmol de Trolox® equivalentes (TE)/L para OrP (Tabla 12). (González-Ponce et al., 2016) ha informado cifras más altas ($5,77 \pm 0,33$ mmol eq. Trolox/L) para *robusta*; sin embargo, también reportan una cifra menor para la especie *streptacantha* (1.31 ± 0.94 mmol eq. Trolox/L). Se ha establecido que las especies de frutos de *Opuntia* con los valores más altos en este ensayo son aquellas con pigmentos rojo-púrpura (Sumaya-Martínez et al., 2011). Esto refuerza la evidencia de que la actividad antioxidante está estrechamente relacionada con la presencia de betalaínas y su interacción con otros biocomponentes, como flavonoides, fenoles y vitaminas. DPPH se correlaciona fuertemente con la cantidad de flavonoides y compuestos fenólicos presentes en la fruta (Butera et al., 2002). Mediante el método DPPH se ha evaluado que la capacidad antioxidante de las nanofibras de dióxido de titanio aumenta considerablemente cuando se añade betanina (Amjadi et al., 2019). Por lo tanto, concluimos que OrP tiene una potente actividad de

eliminación de radicales debido a la presencia de múltiples compuestos bioactivos, incluidas las betacianinas (Tabla 11).

La Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC) de OrP evaluada por el método ABTS^{•+} dio como resultado, $62,2 \pm 5,0$ $\mu\text{mol TE/g}$ en base a materia seca (Tabla 12). Los extractos del fruto de *Opuntia streptacantha* ($61,69 \pm 3$ mg eq. ácido ascórbico/100 mL) se han comparado con los de *Opuntia robusta* ($92,62 \pm 5$ mg eq. ácido ascórbico/100 mL) (González-Ponce et al., 2016), confirmando que *O. robusta* tiene una mayor capacidad para eliminar el radical ABTS^{•+} y demostrando su alta capacidad para neutralizar radicales a través de dos mecanismos diferentes: transferencia de un solo electrón (SET) o transferencia de átomo de hidrógeno (HAT) ya que el radical ABTS^{•+} puede ser neutralizado por cualquiera de estas rutas (Prior et al., 2005). En ausencia de compuestos fenólicos, el radical ABTS^{•+} es estable; sin embargo, reacciona con donantes de hidrógeno, como los fenólicos, y genera un metabolito incoloro de ABTS^{•+} (Roginsky & Lissi, 2005), lo que indica que el principal mecanismo detectado en este ensayo es HAT debido a la presencia de compuestos fenólicos en Or (Tabla 11).

El TEAC de OrP determinado por el método FRAP fue de 80.2 ± 11.7 $\mu\text{mol TE/g}$ en base a materia seca (Tabla 12), indica la presencia de compuestos fenólicos (Tabla 11) que pueden disminuir la conversión del ion ferroso Fe^{2+} al ion férrico Fe^{3+} inhibiendo la reacción de Fenton que produce el radical hidroxilo fuertemente oxidante. Se sabe que Or contiene casi tres veces el TEAC ($73,24 \pm 3$ mg eq. de ácido ascórbico/100 ml) que *O. streptacantha* ($28,82 \pm 2$ mg eq. de ácido ascórbico/100 ml) (González-Ponce et al., 2016). El ensayo FRAP es específico para el mecanismo donador de electrones (SET) el cual, después de la neutralización forma radicales libres más estables que los que recién neutralizó (Ou et al., 2002). Por ello es conveniente combinar las técnicas ABTS^{•+} y FRAP para obtener un panorama completo de la capacidad antioxidante de Or (Prior et al., 2005).

En cuanto a la determinación de la actividad antioxidante y citoprotectora usando AAPH como inductor de daño oxidativo y hemólisis en eritrocitos humanos, en su primera etapa, se determinó si el extracto de OrP posee capacidad para lisar los eritrocitos por sí mismo, y al obtener números negativos (ecuación 5) se deduce que, el extracto de OrP no tiene

capacidad lítica. Además, determinamos que el 50% de la peroxidación lipídica de la membrana de los eritrocitos causada por AAPH fue revertida por OrP ecuaciones 7,8 y 9, un porcentaje comparable al reportado para los carotenoides (48%) (Chisté et al., 2014). La capacidad de la betanina y su aglicona betanidina para inhibir la lipoperoxidación y la degradación del grupo hemo *in vitro*, incluso en concentraciones muy bajas, se ha informado anteriormente. Además, se ha proporcionado evidencia de que los eritrocitos humanos incorporan betalaínas de la dieta que pueden proteger las células y evitar la hemólisis oxidativa (Kanner et al., 2001). Asimismo, se sabe que las betalaínas inhiben la nitración de tirosina mediada por peroxinitrito y la división de la cadena de ADN (Sakihama et al., 2011). Así, la capacidad antioxidante de estos pigmentos no se limita a un único mecanismo de acción. En la tercera fase del ensayo, fue necesario diluir el extracto de OrP ya que el extracto concentrado excedía los valores preestablecidos del análogo de vitamina E Trolox (Figura 9), lo que sugiere que la sinergia de múltiples componentes de OrP mejora la acción antioxidante de cada uno de ellos, incluida la vitamina E.

La capacidad de OrP para eliminar H_2O_2 fue de $15 \pm 0,8$ % a $100 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 12), similar a la de los extractos de agua y etanol de *Crataegus monogyna* (15,44–30,13%) (Keser et al., 2012). La capacidad de neutralizar especies reactivas, como el peróxido de hidrógeno, se puede atribuir a la presencia de antioxidantes primarios, como fenoles y flavonoides (Valko et al., 2007), y estos antioxidantes están presentes en concentraciones significativas en OrP (Tabla 11). Además, el pretratamiento con betanina de las células HT29 previene significativamente el daño del ADN causado por el H_2O_2 (Esatbeyoglu et al., 2014) y se ha informado que la betanina protege el ADN contra ROS y RNS (Esatbeyoglu et al., 2014; Sakihama et al., 2011).

Mediante HPLC-UV se determinó la presencia y cuantificación de las vitaminas C y E. La capacidad de estas vitaminas para eliminar las ROS se ha reportado y existe una correlación directa entre su concentración y la preservación de los niveles de GSH (Alkaladi, 2018). Además, la expresión génica de glutatión reductasa y glutatión

peroxidasa aumenta con su ingesta (Alkaladi, 2018; El-Aal et al., 2018). La administración concomitante de OrP u OrE con TAA aumenta los niveles de GSH (Figura 16), lo que indica un efecto benéfico de los componentes de la fruta, incluidas las vitaminas E y C. Los efectos benéficos sobre los niveles de antioxidantes no enzimáticos proporcionados por la ingesta de estas vitaminas E y C se informaron anteriormente en la diabetes mellitus tipo II (DMT2) cuando las vitaminas se usaron como suplemento dietético (El-Aal et al., 2018).

Considerando que la oxidación de los lípidos de membrana generados por la extracción de átomos de hidrógeno es uno de los mecanismos más importantes de daño causado por TAA y que la vitamina E representa uno de los antioxidantes liposolubles más importantes que brinda protección a las lipoproteínas y fosfolípidos de las membranas biológicas y lípidos almacenados (Sumida et al., 2013), esta vitamina podría mitigar el daño hepático causado por TAA a través de la donación de hidrógeno o mecanismo HAT. Utilizando las técnicas DPPH, ABTS^{•+} y AAPH, hemos demostrado en este estudio que OrP tiene la capacidad de reducir la lipoperoxidación a través de estos mecanismos.

La vitamina E reacciona con los radicales peroxilo de los ácidos grasos, productos primarios de la oxidación lipídica, impidiendo su posterior reacción con las macromoléculas. Esta vitamina tiene un efecto benéfico sobre el daño hepático crónico, que se caracteriza por una inflamación sostenida, ya que puede reducir esta respuesta biológica (Al-Mehdar et al., 2012). Con respecto a NAFLD, se ha informado que los pacientes adultos con NASH y tratados con vitamina E mostraron una marcada disminución de la esteatosis y la inflamación (Gliszczynska-Świgło et al., 2006).

Por otro lado, la vitamina C mejora la acción de la insulina al disminuir los niveles de ácidos grasos libres circulantes a través de la inhibición de la lipasa sensible a hormonas que degrada el triacilglicerol en el tejido adiposo (Sumida et al., 2013). Es a través de este mecanismo que la vitamina C reduce el daño hepático asociado con el síndrome metabólico y la resistencia a la insulina. Se ha reportado que la vitamina C también modula la traslocación nuclear de NF-κB y reduce la señalización de la activación de las HSC, la deposición de colágeno y por lo tanto, la fibrosis hepática (Abhilash et al., 2014). Debido a que las vitaminas E y C son micronutrientes exógenos que no se asocian con toxicidad, y a que son eliminadores de radicales libres e inhibidores de la peroxidación

de lípidos, deben incluirse en la dieta. Este estudio demuestra su presencia en los frutos de Or.

Casi todos los ensayos utilizados en este estudio evalúan el mecanismo HAT (excepto ABTS^{•+} que evalúa tanto HAT como SET y FRAP que solo detecta SET). Sin embargo, existe evidencia de que la donación de electrones por parte de la molécula de betanina también es un mecanismo de acción (Gliszczyńska-Świgło et al., 2006), lo que sugiere que es un pigmento con una importante actividad antioxidante y elimina radicales libres y moléculas reactivas a través de varios mecanismos. Uno de estos mecanismos es la extinción de radicales: elimina los radicales de oxígeno singulete y superóxido a través de un mecanismo de eliminación físico (Tada et al., 2010). Cabe señalar que tanto los efectos sinérgicos como los antagónicos se producen entre moléculas con diferentes grados de capacidad antioxidante, como los flavonoides, los fenoles y las vitaminas E y C (Brahmi et al., 2011; Heber, 2004).

Por otro lado, la fibrosis es el resultado del daño crónico del parénquima hepático y se caracteriza por la elevación de las aminotransferasas, aumento del estrés oxidativo y alteraciones en la arquitectura hepática. Usando marcadores para evaluar estos cambios en el hígado, determinamos los efectos de Or sobre la fibrogénesis inducida por TAA.

Los niveles séricos elevados de ALT y AST son indicadores de daño hepático (Al-Mehdar et al., 2012). La administración crónica de TAA provoca una elevación de las aminotransferasas séricas (Xie et al., 2012). La administración de OrP redujo significativamente los niveles de ALT y AST en animales tratados con TAA, lo que indica una reducción del daño hepático. En la segunda semana de tratamiento, OrP redujo los niveles de ALT más que la betanina (Figura 15). Demostrando que los demás biocomponentes de OrP actúan sinérgicamente con las betacianinas del fruto (Tabla 11), brindando una mayor citoprotección a los hepatocitos.

Durante la tercera semana, los niveles séricos de AST en ratas del grupo OrP/TAA no diferían del grupo control, pero sí del grupo TAA. Los niveles séricos de ALT en el grupo OrP/TAA fueron más bajos que en los grupos OrE/TAA y Betanina/TAA y similares a los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

niveles de ALT en el grupo NAC/TAA (Figura 15). OrP disminuyó el daño de los hepatocitos de manera muy efectiva en las primeras etapas de la patogénesis de la fibrosis hepática. Después de cuatro semanas de tratamiento, los grupos experimentales OrE/TAA y NAC/TAA mostraron diferencias significativas con respecto al grupo TAA (Figura 15). Por el contrario, la protección proporcionada por OrP es muy limitada en esta etapa. Finalmente, en la quinta semana, los niveles séricos de AST de todos los grupos de tratamiento demostraron una diferencia significativa en comparación con el grupo TAA (Figura 15), lo que indica una protección significativa contra las lesiones causadas por TAA. OrP y OrE también redujeron significativamente los niveles de ALT en comparación con el grupo TAA (Figura 15), mostrando una marcada protección a los hepatocitos, ya que son las células que principalmente producen esta aminotransferasa.

En cuanto a la determinación de los marcadores de estrés oxidativo, se tiene la evidencia de que la administración con TAA induce estrés oxidativo en el tejido hepático a través de la generación de hidroperóxidos durante la peroxidación lipídica de la membrana, lo que se refleja en la disminución de las concentraciones hepáticas de GSH (Figura 16), así como en el aumento de los valores de MDA (Figura 17) (Ramos-Tovar et al., 2019) y la actividad de la glutatión peroxidasa (El-Latif El-Ghazaly et al., 2020). El metabolito tóxico de TAA (TASO_2) actúa como un compuesto electrofílico que aumenta el estrés oxidativo celular. TASO_2 es neutralizado directamente por el glutatión, por lo que se observa una disminución significativa en los niveles reducidos de glutatión en todos los momentos del tratamiento con TAA (Figura 16 A, B, C y D). Sin embargo, cuando se administra TAA concomitantemente con agentes hepatoprotectores, se muestra una mayor concentración de GSH incluso en comparación con el grupo control. Como se mencionó anteriormente, la betanina es un potente inductor de la síntesis de GSH a través de la vía del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), lo que demuestra la gran capacidad antioxidante de este pigmento, ya que Nrf2 es un importante regulador de la respuesta antioxidante. Como se muestra en las Figuras 16 A, B y C, el tratamiento con betanina restablece los niveles de GSH a los niveles observados en el grupo de control, mientras que el tratamiento con Or parece incluso aumentar la concentración de GSH en los tejidos en comparación con el grupo de control. Este aumento ocurre en todos los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tiempos de tratamiento, pero es mayor en la semana 4. OrE, durante la segunda y tercera semana de tratamiento, presentó mayores efectos citoprotectores (Figura 16), de acuerdo con los datos bioquímicos e histopatológicos (Figura 15. Figuras 19 y 20 I-L), pero en la semana 4 es el tratamiento con OrP el que promueve la síntesis de GSH a través de ciclos redox y/o facilita la unión de GSH a las proteínas celulares para retrasar su oxidación, utilizando de forma prioritaria la maquinaria antioxidante de OrP en lugar de agotar las reservas de glutatión.

La dosis de NAC utilizada en este modelo experimental fue efectiva para reducir el daño hepático como se refleja en los marcadores bioquímicos (Figura 15) e histopatológicos (Figura 19 y Figura 20). Sin embargo, los niveles de GSH hepático mostraron un agotamiento significativo en comparación con los grupos de control y TAA. Hay reportes en los que este fármaco se ha utilizado para el tratamiento de lesiones hepáticas tempranas en dosis más bajas (Gulbahar et al., 2000), lo que indica que la dosis del fármaco es importante para lograr el efecto antioxidante deseado.

En la intoxicación aguda por acetaminofén, hay evidencia de que *Opuntia streptacantha* previene parcialmente el agotamiento de GSH, mientras que *Opuntia robusta* lo hace por completo (González-Ponce et al., 2016). En el mismo estudio, se informó que el tratamiento con *Opuntia* restauró la concentración de GSH muy cerca de los niveles de control. En el presente estudio, los niveles de GSH en los grupos tratados con OrE y OrP fueron más altos que los mostrados por el grupo control (Figura 16). También se ha reportado que la presencia de compuestos fenólicos del fruto de *Opuntia robusta* actúa en sinergia con las betacianinas (Tabla 11), potenciando el efecto antioxidante de los compuestos en comparación con cuando están aislados (Galati et al., 2002).

La formación excesiva de radical superóxido causada por T_{ASO}₂ conduce a la oxidación de los lípidos insaturados de membrana y la subsiguiente formación de MDA, el cual forma aductos con el ADN, lo que finalmente desencadena la muerte celular. Asimismo, la peroxidación lipídica de la membrana celular de los hepatocitos es una de las principales causas de daño hepático (Bashandy et al., 2020). En nuestro modelo experimental hubo un aumento en MDA durante todo el tratamiento con TAA desde la semana 2 en adelante. Se sabe que altas dosis de TAA inducen estrés oxidativo y

oxidación de lípidos, así como una disminución en el estado antioxidante (Abul et al., 2002). OrE muestra mayor protección que OrP ya que disminuyó los niveles de MDA en las semanas 2, 3 y 4, mientras que OrP no brindó ninguna protección (Figura 17), sugiriendo la posibilidad de adhesión de los componentes activos de la fruta a la fibra insoluble, dificultando su disponibilidad y absorción. OrE, en las semanas 3 y 4 (Figura 17 b,c) de tratamiento, demostró ser incluso más eficaz que la betanina. Esto sugiere que la betanina solo muestra protección en las primeras etapas del daño, pero se vuelve más protectora en presencia de otros biocomponentes de OrE (Figura 17A). Además, existe evidencia que respalda que los productos tóxicos juegan un papel importante en la oxidación de betanina (Tesoriere et al., 2009). OrE es probablemente más protector debido a la presencia de betalaínas y flavonoides. Or también es protectora en un modelo de intoxicación por paracetamol en el hígado y esta protección se correlaciona con niveles reducidos de MDA (González Ponce et al., 2020).

En comparación con controles sanos, los hígados de ratas tratadas con TAA mostraron extensas áreas de vacuolización, necrosis y fibrosis, especialmente en la zona 3, infiltrado inflamatorio y pérdida de la arquitectura normal del parénquima hepático (Figura 19 A-D). Se observó que la administración con Or redujo significativamente los cambios histopatológicos inducidos por TAA. Se observó daño desde la zona 3 hasta los espacios portales (Figura 19 A–D); esto se debe a la expresión diferencial de las enzimas del citocromo P450 que son responsables de la biotransformación de TAA en TAAO₂ (Dwivedi & Jena, 2018). Existe evidencia de que la intoxicación crónica con TAA reduce drásticamente la expresión de las proteínas hepáticas CYP1A2, CYP2C6, CYP2E1 y CYP3A2 en un 18, 71, 30 y 21%, respectivamente, en comparación con el grupo control (Xie et al., 2012). Este patrón de daño fue persistente; aunque la administración de OrP durante dos semanas atenuó el daño (Figuras 19E, 20E y 21).

A partir de la tercera semana de administración de TAA (Figuras 19B y 20B), se observa un efecto protector de OrP (Figuras 19F y 20F) y OrE (Figuras 19J y 20J), comparable o incluso mayor que el observado con NAC (Figuras 19R y 20R), un fármaco hepatoprotector utilizado clínicamente para restaurar los niveles de GSH en

enfermedades fibróticas (Yormaz et al., 2012). OrP y OrE disminuyen el daño celular en las primeras etapas y reducen la fibrosis en todas las etapas (Figura 21). En la semana 4 de tratamiento con OrP/TAA (Figuras 19G y 20G), el proceso fibrótico estaba bien desarrollado; aunque, el área superficial del parénquima hepático dañado fue menor en comparación con el grupo TAA (Figuras 19C y 20C). Tanto OrP como OrE disminuyeron el grosor de los tabiques interlobulillares fibróticos, siendo la OrE más efectiva (Figura 21). Los tabiques fibróticos provocaron una pérdida total de la arquitectura normal en los lobulillos hepáticos en la semana 5 de administración de TAA (Figura 19D). En este momento, histológicamente, OrP disminuyó la necrosis y fibrosis (Figura 21) inducida por TAA (Figura 19H). El tratamiento con OrE disminuyó considerablemente el grosor de los septos de fibrosis (Figuras 19L, 20L y 21). Or, aunque en menor medida, también ejerce un efecto citoprotector en estadios avanzados de fibrosis hepática, retrasando la formación de tabiques fibróticos. OrP y OrE mitigaron los cambios histopatológicos en el hígado de ratas que recibieron TAA y esto se puede atribuir a sus propiedades antioxidantes, reducción de los niveles de MDA y mejora de los niveles reducidos de glutatión.

TAA se ha utilizado experimentalmente para producir daño hepático agudo o crónico. En el presente estudio se empleó como hepatotóxico para generar fibrosis y determinar el efecto de los biocomponentes de Or en diversos estadios del daño progresivo.

TNF- α que es una citocina asociada a la fibrosis hepática, medía la señalización autocrina para la activación de las células de Kupffer y paracrina en la activación de las HSC. Recientemente, se ha reportado que esta citocina es multifuncional en el daño hepático, su efecto esta influenciado por la duración del estímulo de daño, agudo o crónico (Wang et al., 2020). En este estudio, evaluamos la expresión relativa de ARNm de TNF- α en los grupos experimentales (Figuras 22 y 23). En nuestro modelo se utilizó una dosis de 250 mg/kg/i.p durante la primera semana y de 200 mg/kg/i.p de la segunda a la quinta y se monitoreo la expresión relativa de TNF- α en cada una de ellas; en el grupo experimental TAA, los resultados obtenidos mostraron un incremento no significativo del 33.47% en la segunda y de 27.18% en la tercera semana de tratamiento, regresando al valor del control a la cuarta semana. En contraste, existen reportes que

indican que la expresión relativa de TNF- α en tejido hepático aumenta con la administración de 200 mg/kg/ip de TAA durante 8 semanas de tratamiento (Lebda et al., 2018). Por otro lado, Salguero Palacios et al., (2008) reportaron en un tratamiento con CCl₄ administrado durante 4 semanas que no incrementa la expresión relativa de TNF- α con respecto al control; en el mismo estudio se administraron 200 mg/L de TAA en el agua para beber durante 16 semanas, explorando la expresión relativa de TNF- α a la sexta, décima, doceava, catorceava y dieciseisava semana. Salguero et al. (2008) reportaron un aumento significativo con respecto al control de TNF- α en todos los tiempos monitoreados. Los resultados de Salguero y Lebda demuestran que el tiempo de exposición al hepatotóxico es un factor determinante para el incremento de la expresión de TNF- α , en congruencia con estos resultados, en nuestro estudio no encontramos incremento en la expresión relativa de TNF- α , debido a que incluimos sólo 4 semanas de tratamiento.

Por otra parte, la disminución de la dosis de TAA pudo provocar una posible recuperación en el nivel de expresión relativa de TNF- α en la semana 4. En este contexto, Cordero-Espinoza & Huch, 2018, establece que la remoción del agente lesivo que provoca el daño crónico hepático es necesario para que el proceso de regeneración tenga lugar. Nuestros resultados demuestran que sólo la disminución de la dosis permitió recuperar el nivel de expresión de TNF- α al nivel del control. Asimismo, existen reportes que demuestran que no hay una relación directa entre los marcadores de inflamación y fibróticos, puesto que, es posible que haya un aumento de marcadores fibrogénicos y no necesariamente del perfil inflamatorio. Se ha establecido que la sobreactivación del inflamasoma NLRP3 (complejo multiproteico citosólico modulador clave de los eventos que desencadenan la fibrosis hepática) *in vivo* a largo plazo da como resultado un aumento de los marcadores relacionados con la fibrogénesis y la secreción de colágeno, sin una elevación significativa del perfil inflamatorio (Ignat et al., 2020). Además, existe evidencia que menciona que las ROS pueden provocar modificaciones post-traduccionales; tomando esto en consideración, el ARNm de TNF- α pudo sufrir modificaciones post-traduccionales a consecuencia de la sobreproducción de ROS generada por TAsO₂, impidiendo la síntesis y función de la proteína proinflamatoria (Urtasun & Nieto, 2007).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

α -SMA y miosina II son proteínas que forman un sistema contráctil, además α -SMA funge como marcador del fenotipo de miofibroblastos; evaluamos su presencia en los grupos experimentales para determinar la activación de HSC y se observó un aumento considerable cuando se analizó su presencia en el grupo experimental TAA (Figura 25), indicando que, a pesar de la disminución de la respuesta inflamatoria, el daño tisular debido a la activación de las HSC está presente.

En contraste, observamos un aumento de TNF- α en los grupos experimentales (Figuras 22 y 23), sin embargo, a través del ensayo de citoprotección con AAPH demostramos que Or no provoca necrosis celular (Tabla 12 y ecuación 5), por lo tanto, este aumento puede ser explicado con evidencia reciente sobre la actividad pleiotrópica de TNF- α en la fibrosis hepática. Wang et al., 2020 menciona que dependiendo del tipo de daño que se esté suscitando, será la vía de señalización celular que se activara, mientras que en el daño agudo se genera la activación del factor de transcripción NF- κ B que conduce a la apoptosis de los hepatocitos y que promueve la proliferación de las HSC, en el daño crónico puede ejercer una función antagónica al activar el receptor de muerte TNF-R1 que conduce a la interacción con la proteína asociada al receptor del TNF con dominio de muerte (TRADD) y forma un complejo con el factor 2 asociado al receptor del TNF- α (TRAF2), el receptor- quinasa interactuante (RIP) y dominio de muerte asociado a Fas de la molécula adaptadora (FADD) que activan la caspasa-8 e inducen la apoptosis (Ignat et al., 2020) de HSC, inhibiendo su proliferación y disminuyendo el proceso fibrótico.

Los resultados de la presencia de α -SMA indican que OrP administrada en concomitancia con TAA muestra una disminución importante de la proteína durante las semanas 4 y 5 (Figura 25d y 25e). Lo que indica una recuperación que permitió que además de que se reestablecieran los antioxidantes endógenos como el GSH (Figura 16) también los propios metabolitos secundarios de OrP tuvieran efecto sobre el estrés oxidativo celular y sus consecuencias a nivel tisular, como lo es la perpetuación del proceso fibrótico.

Estos resultados evidencian una tendencia inversamente proporcional entre la expresión génica de TNF- α y la expresión proteica de α -SMA. En el caso de los grupos experimentales OrP/TAA y Bet/TAA, mientras más alta la expresión de TNF- α (Figura

23f), menor es la presencia de la proteína α -SMA (Figura 25d) y en los grupos OrE/TAA y NAC/TAA, mientras más baja la expresión de TNF- α (Figura 23f), mayor la presencia de α -SMA (Figura 25d). Lo cual confirma el efecto pleiotrópico de TNF- α : En semanas previas, se desencadena su señalización canónica característica del daño agudo, pero en las semanas avanzadas se activa su efecto alternativo característico del daño crónico.

XI) CONCLUSIONES

1. Or contiene biocomponentes con capacidad nutracéutica y antioxidante.
2. TAA generó daño hepático crónico, evidenciado a través de:
 - a. El aumento significativo de los niveles séricos de ALT y AST.
 - b. El incremento del estrés oxidativo celular demostrado con la depleción de GSH y aumento significativo de MDA.
 - c. Cambios histopatológicos como: balonización y necrosis de hepatocitos, infiltrado inflamatorio, incremento de secreción de ECM (tabiques fibróticos).
 - d. El aumento significativo de la expresión y presencia de la proteína α -SMA.
3. Los tratamientos concomitantes (OrP/TAA, OrE/TAA, Bet/TAA, NAC/TAA) y los hepatoprotectores (OrP, OrE, Bet, NAC) disminuyeron las características de la fibrosis hepática a través de:
 - a. El descenso de los niveles séricos de ALT y AST.
 - b. La disminución del estrés oxidativo celular evidenciado con el aumento de la síntesis (OrP/TAA y OrE/TAA) y mantenimiento (Bet/TAA) de GSH y la disminución de MDA.
 - c. Preservar la normalidad de la citoarquitectura hepática.
 - d. La disminución de las HSC activadas observada a través de la expresión y presencia de la proteína α -SMA.
4. Este estudio demuestra que el tratamiento con extracto y pulpa de *Opuntia robusta* atenua las características de la fibrosis hepática.

XII) PROSPECTIVA

Se proponen estudios moleculares posteriores para elucidar los mecanismos hepatoprotectores del fruto de *Opuntia robusta* y se recomienda este fruto como alimento funcional con potencial efecto nutracéutico.

XIII) BIBLIOGRAFÍA

- Abhilash, P. A., Harikrishnan, R., & Indira, M. (2014). Ascorbic acid suppresses endotoxemia and NF- κ B signaling cascade in alcoholic liver fibrosis in guinea pigs: a mechanistic approach. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274(2), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.11.005>
- Abul, H., Mathew, T. C., Dashti, H. M., & Al-Bader, A. (2002). Level of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Uric Acid in Thioacetamide-Induced Cirrhotic Rats. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 31(2), 66–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1439-0264.2002.00359.x>
- Alkaladi, A. (2018). Vitamins E and C ameliorate the oxidative stresses induced by Zinc oxide nanoparticles on liver and gills of *Oreochromis niloticus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.07.001>
- Al-Mehdar, A., ES, E.-D., & Abdel-Wahhab, P. M. (2012). Alpha Lipoic Acid and Alpha-Tocopherol Counteract the Oxidative Stress and Liver Damage in Rats Sub-Chronically Treated with Khat (*Catha edulis*) Extract. *Global Journal of Pharmacology*, 6.
- Amjadi, S., Mesgari Abbasi, M., Shokouhi, B., Ghorbani, M., & Hamishehkar, H. (2019). Enhancement of therapeutic efficacy of betanin for diabetes treatment by liposomal nanocarriers. *Journal of Functional Foods*, 59, 119–128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.05.015>
- Andrés, D., Sánchez-Reus, I., Bautista, M., & Cascales, M. (2003). Depletion of Kupffer cell function by gadolinium chloride attenuates thioacetamide-induced hepatotoxicity: Expression of metallothionein and HSP70. *Biochemical Pharmacology*, 66(6), 917–926. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00443-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00443-X)
- ANIMALES-MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA A LA NMX-Y-093-1976) ANIMAL FOOD-ASH DETERMINATION IN ANIMAL FEED AND INGREDIENTS FOR ANIMAL-TEST METHOD. (n.d.).
- AOAC. (1969). AOAC 968.06 Official method. Protein (crude) in animal feed: Dumas method.
- AOAC. (1971). AOAC 962.09 Official method . Fibre crude in animal feed and pet food .
- AOAC. (1977). AOAC 954.02 Official method. Fat crude or ether extract in pet food .
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239–244. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1)
- Arrese M, & Feldstein A. (2017). NASH-Related Cirrhosis: An Occult Liver Disease Burden. *HEPATOLOGY COMMUNICATIONS*, 1.

- Azeredo, H. (2009). Betalains: Properties, sources, applications, and stability - A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 2365–2376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x>
- Barron, L., & Wynn, T. (2011). Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300, G723-8. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00414.2010>
- Bashandy, S. A. E., el Awdan, S. A., Mohamed, S. M., & Omara, E. A. A. (2020). Allium porrum and Bauhinia Variegata Mitigate Acute Liver Failure and Nephrotoxicity Induced by Thioacetamide in Male Rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 35(2), 147–157. <https://doi.org/10.1007/s12291-018-0803-5>
- Baskaran, Y., Viswanathan, P., & Venkataraman, A. (2010). Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology*, 9, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.12.018>
- Baumgardner, J. N., Shankar, K., Hennings, L., Albano, E., Badger, T. M., & Ronis, M. J. J. (2008). N-acetylcysteine attenuates progression of liver pathology in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *The Journal of Nutrition*, 138(10), 1872–1879. <https://doi.org/10.1093/jn/138.10.1872>
- Benites, J., Gutierrez, E., López, J., Rojas, M., Rojo, L., Costa, M., Vinardell, M., & Calderon, P. (2012). Evaluation of Analgesic Activities of Tremetone Derivatives Isolated from the Chilean Altiplano Medicine *Parastrephia lepidophylla*. *Natural Product Communications*, 7, 611–614. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200700517>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bernardi, P., Petronilli, V., di Lisa, F., & Forte, M. (2001). A mitochondrial perspective on cell death. *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 112–117. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01745-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01745-X)
- Berumen, J., Baglieri, J., Kisseleva, T., & Mekeel, K. (2020). Liver fibrosis: Pathophysiology and clinical implications. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 13, e1499. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1499>
- Betteridge, D. J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, 49(2, Supplement 1), 3–8. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0026-0495(00)80077-3)
- Bonomini, F., Rodella, L. F., & Rezzani, R. (2015). Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging and Disease*, 6(2), 109–120. <https://doi.org/10.14336/AD.2014.0305>
- Brahmi, D., Bouaziz, C., Ayed, Y., ben Mansour, H., Zourgui, L., & Bacha, H. (2011). Chemopreventive effect of cactus *Opuntia ficus indica* on oxidative stress and genotoxicity of aflatoxin B1. *Nutrition & Metabolism*, 8(1), 73. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-73>
- Bravo- Hollis H. (1978). *Las cactáceas de México* (2nd ed., Vol. 1).
- Britton N, L., & Rose J, N. (1919). *Descriptions and Illustrations of Plants of the Cactus Family: Vols. I and II*. Dover Publications.
- Brower, V. (1998). Nutraceuticals: Poised for a healthy slice of the healthcare market? *Nature Biotechnology*, 16(8), 728–731. <https://doi.org/10.1038/nbt0898-728>

- Brown, K., Brunt, E., & Heinecke, J. (2002). Immunohistochemical Detection of Myeloperoxidase and Its Oxidation Products in Kupffer Cells of Human Liver. *The American Journal of Pathology*, 159, 2081–2088. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63059-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63059-3)
- Budinsky, A., Wolfram, R., Oguogho, A., Efthimiou, Y., Stamatopoulos, Y., & Sinzinger, H. (2001). Regular ingestion of opuntia robusta lowers oxidation injury. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 65(1), 45–50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1054/plf.2001.0287>
- Buettner, G. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, a - tocopherol, and ascorbate. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 300, pp. 535–543).
- Butera, D., Tesoriere, L., di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A. M., Kohen, R., & Livrea, M. A. (2002). Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of Its Betalains: Betanin and Indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6895–6901. <https://doi.org/10.1021/jf025696p>
- Campana, L., & Iredale, J. P. (2017). Regression of Liver Fibrosis. *Seminars in Liver Disease*, 37(1), 1–10. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1597816>
- Čanadanović-Brunet, J. M., Savatović, S. S., Četković, G. S., Vulić, J., Djilas, S., Sinisa, M., & Cvetković, D. D. (2011). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Beet Root Pomace Extracts. *Czech Journal of Food Sciences*, 29, 575–585. <https://doi.org/10.17221/210/2010-CJFS>
- Cascales Angosto, M., & Ferrandiz García, F. (1987). *Aspectos bioquímicos y farmacológicos en disfunciones hepáticas* (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ed.).
- Castellanos-Santiago, E., & Yahia, E. M. (2008). Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5758–5764. <https://doi.org/10.1021/jf800362t>
- Cazzola, R., & Cestaro, B. (2011). Red wine polyphenols protect n-3 more than n-6 polyunsaturated fatty acid from lipid peroxidation. *Food Research International*, 44(9), 3065–3071. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.029>
- Cervinkova 1998. (n.d.). *Enteral administration of lipid emulsions protects liver cytochrome c oxidase from hepatotoxic action of thioacetamide*.
- Chang, S.-F., Hsieh, C.-L., & Yen, G.-C. (2008). The protective effect of *Opuntia dillenii* Haw fruit against low-density lipoprotein peroxidation and its active compounds. *Food Chemistry*, 106(2), 569–575. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.017>
- Chaouch, M., Hafsa, J., Rihouey, C., le Cerf, D., & Majdoub, H. (2016). Effect of extraction conditions on the antioxidant and antiglycation capacity of carbohydrates from *Opuntia robusta* cladodes. *International Journal of Food Science & Technology*, 51, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13055>
- Chavez-Santoscoy, A., Gutiérrez-Urbe, J., & Serna-Saldivar, S. (2009). Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and In Vitro Cancer Cell Cytotoxicity of Nine Prickly Pear (*Opuntia* spp.) Juices. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 64, 146–152. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0117-0>

- Chilakapati, J., Korrapati, M. C., Hill, R. A., Warbritton, A., Latendresse, J. R., & Mehendale, H. M. (2007). Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. *Toxicology*, 230(2), 105–116.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.050>
- Chilakapati, J., Shankar, K., Korrapati, M. C., Hill, R. A., & Mehendale, H. M. (2005). SATURATION TOXICOKINETICS OF THIOACETAMIDE: ROLE IN INITIATION OF LIVER INJURY. *Drug Metabolism and Disposition*, 33(12), 1877 LP – 1885.
<https://doi.org/10.1124/dmd.105.005520>
- Chisté, R., Freitas, M., Mercadante, A., & Fernandes, E. (2014). Carotenoids are Effective Inhibitors of in vitro Hemolysis of Human Erythrocytes, as Determined by a Practical and Optimized Cellular Antioxidant Assay. *Journal of Food Science*, 79.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12580>
- Cisneros Garza, L., Ramos Gómez, M., & Flores García, N. (2022). *Tercera hepatotriología 2022. Hepatología de vanguardia* (Asociación Mexicana de Hepatología, Ed.; 1st ed., Vol. 1).
- Cordero-Espinoza, L., & Huch, M. (2018). The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 128, 85–96.
<https://doi.org/10.1172/JCI93562>
- Cota-Sánchez, J. H., Almeida, O. J. G., Falconer, D. J., Choi, H. J., & Bevan, L. (2013). Intriguing thigmonastic (sensitive) stamens in the Plains Prickly Pear *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 208(5), 381–389. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.flora.2013.04.009>
- Cotgreave, I. A. (1996). *N-Acetylcysteine: Pharmacological Considerations and Experimental and Clinical Applications* (H. B. T.-A. in P. Sies, Ed.; Vol. 38, pp. 205–227). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60985-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60985-0)
- Croteau. (2000). *Croteau2000*.
- Crozier, A., Jaganath, I., & Clifford, M. (2007). Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. In *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet* (pp. 1–24). <https://doi.org/10.1002/9780470988558.ch1>
- Czapski, J., Mikołajczyk-Bator, K., & Kaczmarek, M. (2009). Relationship between antioxidant capacity of red beet juice and contents of its betalain pigments. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 59, 119–122.
- de Wit, M., Hugo, A., & Shongwe, N. (2016). Quality Assessment of Seed Oil from Selected Cactus Pear Cultivars (*Opuntia ficus - indica* and *Opuntia robusta*): QUALITY ASSESSMENT OF SEED OIL FROM Q. FICUS-INDICA AND Q. ROBUSTA. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12898>
- Defelice, S. L. (2000). Foundation for Innovation in Medicine Rationale and Proposed Guidelines for the Nutraceutical Research and Education Act. *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods*, 2(1), 43–52. https://doi.org/10.1300/J133v02n01_05
- Diez-Fernandez, C., Sanz, N., & Cascales, M. (1996). *Intracellular calcium concentration impairment in hepatocytes from thioacetamide-treated rats. Implications for the activity of Ca²⁺-dependent enzymes.*
- Dwivedi, D., & Jena, G. (2018). Glibenclamide protects against thioacetamide-induced hepatic damage in Wistar rat: investigation on NLRP3, MMP-2, and stellate cell activation. *Naunyn-*

- Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 391. <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1540-2>
- Dyrorff, M. C., & Neal, R. A. (1981). Identification of the Major Protein Adduct Formed in Rat Liver after Thioacetamide Administration. *Cancer Research*, 41(9 Part 1), 3430 LP – 3435. http://cancerres.aacrjournals.org/content/41/9_Part_1/3430.abstract
- Ebadi, M., Ip, S., Bhanji, R. A., & Montano-Loza, A. J. (2021). Effect of Coffee Consumption on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Incidence, Prevalence and Risk of Significant Liver Fibrosis: Systematic Review with Meta-Analysis of Observational Studies. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/nu13093042>
- Edna B. Prophet. (1992). *Methods in Histotechnology: Vol. Volume I* (Prophet Edna, Ed.; First edition). The Libraries.
- El-Aal, A. A., El-Ghffar, E. A. A., Ghali, A. A., Zughbur, M. R., & Sirdah, M. M. (2018). The effect of vitamin C and/or E supplementations on type 2 diabetic adult males under metformin treatment: A single-blinded randomized controlled clinical trial. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 12(4), 483–489. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.03.013>
- El-Baz, F. K., Salama, A. A. A., & Hussein, R. A. (2020). Dunaliella salina microalgae oppose thioacetamide-induced hepatic fibrosis in rats. *Toxicology Reports*, 7, 36–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.10.017>
- El-Latif El-Ghazaly, M. A., Rashed, E. R., Shafey, G. M., Zaki, H. F., & Attia, A. S. (2020). Amelioration of thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rats by low-dose gamma irradiation. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(1), 334–343. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06934-w>
- El-Mihi, K., Kenawy, H., El-Karef, A., Elsherbiny, N., & Eissa, L. (2017). Naringin attenuates thioacetamide-induced liver fibrosis in rats through modulation of the PI3K/Akt pathway. *Life Sciences*, 187. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.019>
- Elpek, G. (2014). Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20, 7260–7276. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7260>
- Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Motafakkerazad, R., Nakajima, Y., Matsugo, S., & Rimbach, G. (2014). Free radical scavenging and antioxidant activity of betanin: Electron spin resonance spectroscopy studies and studies in cultured cells. *Food and Chemical Toxicology*, 73, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.08.007>
- Fallowfield, J., Mizuno, M., Kendall, T., Constandinou, C., Benyon, R., Duffield, J., & Iredale, J. (2007). Scar-Associated Macrophages Are a Major Source of Hepatic Matrix Metalloproteinase-13 and Facilitate the Resolution of Murine Hepatic Fibrosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178, 5288–5295. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5288>
- Fernandez, M. L., Lin, E. C. K., Trejo, A., & McNamara, D. J. (1992). Prickly Pear (Opuntia sp.) Pectin Reverses Low Density Lipoprotein Receptor Suppression Induced by a Hypercholesterolemic Diet in Guinea Pigs. *The Journal of Nutrition*, 122(12), 2330–2340. <https://doi.org/10.1093/jn/122.12.2330>
- Fernandez, M. L., Lin, E. C. K., Trejo, A., & McNamara, D. J. (1994). Prickly Pear (Opuntia sp.) Pectin Alters Hepatic Cholesterol Metabolism without Affecting Cholesterol Absorption in

- Guinea Pigs Fed a Hypercholesterolemic Diet. *The Journal of Nutrition*, 124(6), 817–824.
<https://doi.org/10.1093/jn/124.6.817>
- Fernández-López, J. A., Almela, L., Obón, J. M., & Castellar, R. (2010). Determination of Antioxidant Constituents in Cactus Pear Fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 253–259. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0189-x>
- Fitzhugh & Nelson. (1948). *Liver Tumors in Rats Fed Thiourea or Thioacetamide*.
- Folin, O. (1912). Tyrosine in proteins as determined by a new colorimetric method. *Journal of Biological Chemistry*, 12, 245–251.
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). ON TYROSINE AND TRYPTOPHANE DETERMINATIONS IN PROTEINS. www.jbc.org
- Frati-Munari, A. C., del Valle-Martínez, L. M., Ariza-Andraca, C. R., Islas-Andrade, S., & Chávez-Negrete, A. (1988). Hypoglycemic action of different doses of nopal (*Opuntia streptacantha* Lemaire) in patients with type II diabetes mellitus. *Archivos de investigacion medica*, 20(2), 197–201. <http://europepmc.org/abstract/MED/2557805>
- Galati, Tripodo, Trovato, Miceli, & Monforte. (2002). Biological effect of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae) waste matter: Note I: diuretic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(1), 17–21. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00337-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00337-3)
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2010). Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta*, 232, 449–460.
<https://doi.org/10.1007/s00425-010-1191-0>
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2012). Purification and Antiradical Properties of the Structural Unit of Betalains. *Journal of Natural Products*, 75(6), 1030–1036. <https://doi.org/10.1021/np200950n>
- García Carmona, F. (2016). *Betalainas 2005-2015: una historia con futuro* (Academia de Ciencias de la Región de Murcia, Ed.).
- García-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y., & Valle-Guadarrama, S. (2012). Betalainas, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en pitaya de mayo (*Stenocereus griseus* H.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(SPE5), 01–05.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802012000500003&lng=es&nrm=iso&tlng=
- Gliszczyńska-Świątło, A., Szymusiak, H., & Malinowska, P. (2006). Betanin, the main pigment of red beet: Molecular origin of its exceptionally high free radical-scavenging activity. *Food Additives & Contaminants*, 23(11), 1079–1087.
<https://doi.org/10.1080/02652030600986032>
- González- Ponce. (2016). *González-Ponce TESIS*.
- González Ponce, H., Martínez-Saldaña, M., Tepper, P., Quax, W., Buist-Homan, M., Faber, K., & Moshage, H. (2020). Betacyanins, major components in *Opuntia* red-purple fruits, protect against acetaminophen-induced acute liver failure. *Food Research International*, 137, 109461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109461>
- González Ponce, H., Rincón-Sánchez, A., Jaramillo-Juárez, F., & Moshage, H. (2018). Natural Dietary Pigments: Potential Mediators against Hepatic Damage Induced by Over-The-Counter Non-Steroidal Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs. *Nutrients*, 10, 117.
<https://doi.org/10.3390/nu10020117>

- González-Ponce, H. A., Martínez-Saldaña, M. C., Rincón-Sánchez, A. R., Sumaya-Martínez, M. T., Buist-Homan, M., Faber, K. N., Moshage, H., & Jaramillo-Juárez, F. (2016). Hepatoprotective Effect of *Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha* Fruits against Acetaminophen-Induced Acute Liver Damage. *Nutrients*, *8*(10), 607. <https://doi.org/10.3390/nu8100607>
- Guerra, E. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna*, *18*, 326–335.
- Gulbahar, O., Karasu, Z., Ersoz, G., Akarca, U., & Musoglu, A. (2000). Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with N-acetylcysteine (Abstract). *Gastroenterology*, *118*. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(00\)81671-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(00)81671-6)
- Gülçin, I. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, *94*. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, *41*(12), 1819–1828. <https://doi.org/10.1093/clinchem/41.12.1819>
- Hadi, S. M., Ullah, M. F., Azmi, A. S., Ahmad, A., Shamim, U., Zubair, H., & Khan, H. Y. (2010). Resveratrol Mobilizes Endogenous Copper in Human Peripheral Lymphocytes Leading to Oxidative DNA Breakage: A Putative Mechanism for Chemoprevention of Cancer. *Pharmaceutical Research*, *27*(6), 979–988. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0055-4>
- Haider, A., Gooren, L., Padungtod, P., & Saad, F. (2009). Improvement of the Metabolic Syndrome and of Non-alcoholic Liver Steatosis upon Treatment of Hypogonadal Elderly Men with Parenteral Testosterone Undecanoate. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes : Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, *118*, 167–171. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1202774>
- Han, J., Gao, C., Yang, S., Wang, J., & Tan, D. (2014). Betanin attenuates carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, *40*(3), 865–874. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9892-5>
- Han, J., Ma, D., Zhang, M., Yang, X., & Tan, D. (2015). Natural Antioxidant Betanin Protects Rats from Paraquat-Induced Acute Lung Injury Interstitial Pneumonia. *BioMed Research International*, *2015*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/608174>
- Han, J., Zongju, Z., Yang, S., Yang, X., & Tan, D. (2014). Betanin attenuates paraquat-induced liver toxicity through a mitochondrial pathway. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *70*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.038>
- Harborne. (1995). The Flavonoids: Advances in Research Since 1986 (Harborne, J. B.). *Journal of Chemical Education*, *72*(3), A73. <https://doi.org/10.1021/ed072pA73.11>
- Heber. (2004). Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. *Journal of Postgraduate Medicine*, *50*, 145–149.
- Hernández, H., Cházaro, M., & Gómez-Hinostrosa, C. (2017). *Opuntia robusta* (versión modificada de la evaluación de 2013). *La Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN 2017*.
- Hernández Marín, D. A. (2018). *Aislamiento e identificación de compuestos de Parthenium incanum y Nothoscordum bivalve con actividad biológica*. Universidad Autónoma de Nuevo León .

- Horwitz, W. (2002). *AOAC Official Method 920. 151. Sólidos (total) en frutas y productos frutales. Official method of analysis of AOAC International.* .
- Hwang, Y. P., Choi, J. H., Han, E. H., Kim, H. G., Wee, J.-H., Jung, K. O., Jung, K. H., Kwon, K., Jeong, T. C., Chung, Y. C., & Jeong, H. G. (2011). Purple sweet potato anthocyanins attenuate hepatic lipid accumulation through activating adenosine monophosphate-activated protein kinase in human HepG2 cells and obese mice. *Nutrition Research*, 31(12), 896–906. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nutres.2011.09.026>
- Ignat, S. R., Dinescu, S., Hermenean, A., & Costache, M. (2020). Cellular Interplay as a Consequence of Inflammatory Signals Leading to Liver Fibrosis Development. In *Cells* (Vol. 9, Issue 2). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9020461>
- Indap, M. A., Susarla, R., Motiwale, L., & Rao, K. V. K. (2006). Anticancer activity of phenolic antioxidants against breast cancer cells and a spontaneous mammary tumor. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.27820>
- Jiménez-Aguilar, D. M., López-Martínez, J. M., Hernández-Brenes, C., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Welti-Chanes, J. (2015). Dietary fiber, phytochemical composition and antioxidant activity of Mexican commercial varieties of cactus pear. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 66–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.01.017>
- Kalra, E. K. (2003). Nutraceutical--definition and introduction. *AAPS PharmSci*, 5(3), E25–E25. <https://doi.org/10.1208/ps050325>
- 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>
- Karl Fischer. (2001). *AOAC Official Method 2001.12. Determinación de agua/ materia seca (humedad) en alimentos para animales, granos y forraje (tejido vegetal). Official method of analysis of AOAC International.* .
- Keser, S., Celik, S., Türkoğlu, S., Yilmaz, O., & Turkoglu, I. (2012). Hydrogen Peroxide Radical Scavenging and Total Antioxidant Activity of Hawthorn. *Chem J*, 2.
- Khan, M. (2015). Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and Bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12185>
- Krajka-Kuźniak, V., Paluszczak, J., Szafer, H., & Baer-Dubowska, W. (2013). Betanin, a beetroot component, induces nuclear factor erythroid-2-related factor 2-mediated expression of detoxifying/antioxidant enzymes in human liver cell lines. *British Journal of Nutrition*, 110(12), 2138–2149. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0007114513001645>
- Krenkel, O., & Tacke, F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*, 17(5), 306–321. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.11>
- Kujawska, M., Ignatowicz, E., Murias, M., Ewertowska, M., Mikołajczyk-Bator, K., & Jodynis-Liebert, J. (2009). Protective Effect of Red Beetroot against Carbon Tetrachloride- and N - Nitrosodiethylamine-Induced Oxidative Stress in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2570–2575. <https://doi.org/10.1021/jf803315d>
- Lakshmi, G., Smitha, N., Ammu, S. v, Priya, C., & Rao, B. (2014). Phytochemical profile, in vitro antioxidant and hemolytic activities of various leaf extract of *Nymphaea Nouchali* Linn: An in vitro study. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 548–552.

- Lebda, M. A., Sadek, K. M., Abouzed, T. K., Tohamy, H. G., & El-Sayed, Y. S. (2018). Melatonin mitigates thioacetamide-induced hepatic fibrosis via antioxidant activity and modulation of proinflammatory cytokines and fibrogenic genes. *Life Sciences*, *192*, 136–143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.036>
- Limbach, J. R., Espinosa, C. D., Perez-Calvo, E., & Stein, H. H. (2021). Effect of dietary crude protein level on growth performance, blood characteristics, and indicators of intestinal health in weaning pigs. *Journal of Animal Science*, *99*(6), skab166. <https://doi.org/10.1093/jas/skab166>
- Livrea, M. A., & Tesoriere, L. (2012). *Lipoperoxyl Radical Scavenging and Antioxidative Effects of Red Beet Pigments BT - Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications* (B. Neelwarne, Ed.; pp. 105–124). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3458-0_6
- Lotková, H., Červinková, Z., Kučera, O., Roušar, T., & Křiváková, P. (2007). S-Adenosylmethionine Exerts a Protective Effect against Thioacetamide-induced Injury in Primary Cultures of Rat Hepatocytes. *Alternatives to Laboratory Animals*, *35*(3), 363–371. <https://doi.org/10.1177/026119290703500309>
- Low, T., Leow, C. K., Salto-Tellez, M., & Chung, M. (2004). A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers. *Proteomics*, *4*, 3960–3974. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400852>
- Luedde, T., & Schwabe, R. (2011). NF-κB in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *8*, 108–118. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.213>
- Luster, M. I., Simeonova, P. P., Gallucci, R. M., Matheson, J. M., & Yucesoy, B. (2000). Immunotoxicology: role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity. *International Journal of Immunopharmacology*, *22*(12), 1143–1147. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0192-0561\(00\)00073-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0192-0561(00)00073-4)
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990). *Fruit Phenolics* (1 st). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351072175>
- Malireddy, S., Kotha, S. R., Secor, J. D., Gurney, T. O., Abbott, J. L., Maulik, G., Maddipati, K. R., & Parinandi, N. L. (2012a). Phytochemical antioxidants modulate mammalian cellular epigenome: Implications in health and disease. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 17, Issue 2, pp. 327–339). <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4600>
- Malireddy, S., Kotha, S., Secor, J., Gurney, T., Abbott, J., Maulik, G., Maddipati, K. R., & Parinandi, N. (2012b). Phytochemical Antioxidants Modulate Mammalian Cellular Epigenome: Implications in Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, *17*, 327–339. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4600>
- Mangipudy, R. S., Chanda, S., & Mehendale, H. M. (1995). Tissue Repair Response as a Function of Dose in Thioacetamide Hepatotoxicity. *Environmental Health Perspectives*, *103*(3), 260–267. <https://doi.org/10.2307/3432546>
- Mann, J. P., de Vito, R., Mosca, A., Alisi, A., Armstrong, M. J., Raponi, M., Baumann, U., & Nobili, V. (2016). Portal inflammation is independently associated with fibrosis and metabolic syndrome in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, *63*(3), 745–753. <https://doi.org/10.1002/hep.28374>

- Marañón-Ruiz, V. F., Rizo de la Torre, L. del C., & Chiu-Zarate, R. (2011). Caracterización de las propiedades ópticas de Betacianinas y Betaxantinas por espectroscopía Uv-Vis y barrido en Z. *Superficies y vacío*, 24(4), 113–120.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=94221480002>
- Marcellin, P., & Kutala, B. (2018). Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver International*, 38, 2–6.
<https://doi.org/10.1111/liv.13682>
- McCann, M., Gill, C., O'Brien, G., Rao, J., McRoberts, W. C., Hughes, P., McEntee, R., & Rowland, I. R. (2007). Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 224–230.
- Mehendale, H. M. (2005). Tissue Repair: An Important Determinant of Final Outcome of Toxicant-Induced Injury. *Toxicologic Pathology*, 33(1), 41–51.
<https://doi.org/10.1080/01926230590881808>
- Méndez-Sánchez, N., Zamarripa-Dorsey, F., Panduro, A., Purón-González, E., Coronado-Alejandro, E. U., Cortez-Hernández, C. A., Higuera de la Tijera, F., Pérez-Hernández, J. L., Cerda-Reyes, E., Rodríguez-Hernández, H., Cruz-Ramón, V. C., Ramírez-Pérez, O. L., Aguilar-Olivos, N. E., Rodríguez-Martínez, O. F., Cabrera-Palma, S., & Cabrera-Álvarez, G. (2018). Current trends of liver cirrhosis in Mexico: Similitudes and differences with other world regions. *World Journal of Clinical Cases*, 6(15), 922–930.
<https://doi.org/10.12998/wjcc.v6.i15.922>
- Miler, M., Zivanovic, J., Ajdžanović, V., Oreščanin-Dušić, Z., Milenkovic, D., Konic Ristic, A., Blagojević, D., Milošević, V., & Šošić-Jurjević, B. (2016). Citrus flavanones naringenin and hesperetin improve antioxidant status and membrane lipid compositions in the liver of old-aged Wistar rats. *Experimental Gerontology*, 84.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.08.014>
- Molina, G. A., Hernández-Martínez, A. R., Cortez-Valadez, M., García-Hernández, F., & Estevez, M. (2014). Effects of Tetraethyl Orthosilicate (TEOS) on the Light and Temperature Stability of a Pigment from Beta vulgaris and Its Potential Food Industry Applications. In *Molecules* (Vol. 19, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/molecules191117985>
- Möller, B., & Dargel, R. (1985). Functional impairment of mitochondria from rat livers acutely injured by thioacetamide. *Experimental Pathology*, 28(1), 55–57.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0232-1513\(85\)80032-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0232-1513(85)80032-3)
- Moreira, E., Fontana, L., Periago, J. L., Sanchez, F., Medina, D. E., & Gil, A. (1995). *Changes in Fatty Acid Composition of Plasma, Liver Microsomes, and Erythrocytes in Liver Cirrhosis Induced by Oral Intake of Thioacetamide in Rats*.
- Moronvalle-Halley, V., Sacré-Salem, B., Sallez, V., Labbe, G., & Gautier, J.-C. (2005). Evaluation of cultured, precision-cut rat liver slices as a model to study drug-induced liver apoptosis. *Toxicology*, 207(2), 203–214.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.09.014>
- Muriel, P., Ramos-Tovar, E., Montes-Páez, G., & Buendía-Montaño, L. D. (2017). *Chapter 40 - Experimental Models of Liver Damage Mediated by Oxidative Stress* (P. B. T.-L. P. Muriel, Ed.; pp. 529–546). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804274-8.00040-0>

- Musyarofah, N., Susanto, S., Aziz, S. A., Suketi, K., & Dadang. (2020). The diversity of 'kristal' guava (*Psidium guajava*) fruit quality in response to different altitudes and cultural practices. *Biodiversitas*, *21*(7), 3310–3316. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210755>
- Natarajan, S. kumar, Thomas, S., Ramamoorthy, P., Basivireddy, J., Pulimood, A., Ramachandran, A., & Balasubramanian, K. (2006). Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: A comparison of two different experimental models. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *21*, 947–957. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04231.x>
- Nishikawa, K., Osawa, Y., & Kimura, K. (2018). Wnt/ β -Catenin Signaling as a Potential Target for the Treatment of Liver Cirrhosis Using Antifibrotic Drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*, 3103. <https://doi.org/10.3390/ijms19103103>
- Novo, E., Busletta, C., Bonzo, L., Povero, D., Paternostro, C., Mareschi, K., Ferrero, I., David, E., Bertolani, C., Caligiuri, A., Cannito, S., Tamagno, E., Compagnone, A., Sebastiano, C., Marra, F., Fagioli, F., Pinzani, M., & Parola, M. (2010). Intracellular reactive oxygen species are required for directional migration of resident and bone marrow-derived hepatic pro-fibrogenic cells. *Journal of Hepatology*, *54*, 964–974. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.09.022>
- Okuyama, H., Nakamura, H., Shimahara, Y., Uyama, N., Kwon, Y.-W., Kawada, N., Yamaoka, Y., & Yodoi, J. (2005). Overexpression of thioredoxin prevents thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Journal of Hepatology*, *42*, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.09.020>
- Oliveira, C., Cotrim, H., Stefano, J. T., SIQUEIRA, A., SALGADO, A., & Parise, E. (2019). N-acetylcysteine and/or ursodeoxycholic acid associated with metformin in non-alcoholic steatohepatitis: An open-label multicenter randomized controlled trial. *Arquivos de Gastroenterologia*, *56*, 184–190. <https://doi.org/10.1590/s0004-2803.201900000-36>
- Oliveira, V., Carneiro, A., Cauper, G., & Pohlit, A. (2009). In vitro screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. *Acta Amazonica*, *39*, 973–980. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672009000400026>
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(11), 3122–3128. <https://doi.org/10.1021/jf0116606>
- Pamuk, G., & Sonsuz, A. (2003). N-Acetylcysteine in The Treatment Of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *18*, 1220–1221. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2003.03156.x>
- Patel, S. (2012). Reviewing the prospect of Opuntia pears as low cost functional foods. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *12*. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9295-6>
- Pérez-Torres, I., Zúñiga Muñoz, A., Beltrán-Rodríguez, U., Díaz-Díaz, E., Martínez-Memije, R., & Guarner Lans, V. (2014). Modification of the liver fatty acids by *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus (Malvaceae) infusion, its possible effect on vascular reactivity in a metabolic syndrome model. *Clinical and Experimental Hypertension*, *36*(3), 123–131. <https://doi.org/10.3109/10641963.2013.789046>

- Piga, A. (2004). Cactus Pear: a Fruit of nutraceutical and functional importance. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 9–22.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Ramachandran, P., Pellicoro, A., Vernon, M., Boulter, L., Aucott, R., Ali, A., Hartland, S., Snowdon, V., Cappon, A., Gordon-Walker, T., Williams, M., Dunbar, D., Manning, J., van Rooijen, N., Fallowfield, J., Forbes, S., & Iredale, J. (2012). PNAS Plus: Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119964109>
- Ramírez-Ramos, M., García-Mateos, M., Corrales Garcia, J., Ybarra-Moncada C, & Castillo-González M. (2015). Compuestos antioxidantes en variedades pigmentadas de tuna (*Opuntia* sp.). *Revista Fitotecnica Mexicana Publ. Por La Sociedad Mexicana de Fitogenética*, 38, 349–357. <https://doi.org/10.35196/rfm.2015.4.349>
- Ramos-Tovar, E., Casas-Grajales, S., Hernández-Aquino, E., Flores-Beltrán, R. E., Galindo-Gómez, S., Vera-Aguilar, E., Diaz-Ruiz, A., Montes, S., Camacho, J., Tsutsumi, V., & Muriel, P. (2019). Cirrhosis induced by thioacetamide is prevented by stevia. Molecular mechanisms. *Journal of Functional Foods*, 52, 552–564. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.039>
- Reddy, M., Alexander-Lindo, R., & Nair, M. (2005). Relative Inhibition of Lipid Peroxidation, Cyclooxygenase Enzymes, and Human Tumor Cell Proliferation by Natural Food Colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9268–9273. <https://doi.org/10.1021/jf051399j>
- Reyes-Agüero, J. A., Rivera, J. R., & Flores, J. (2005). Variación morfológica de “Opuntia” (“Cactaceae”) en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. *Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América*, ISSN 0378-1844, Vol. 30, Nº. 8, 2005, Pags. 476-484.
- Rinella, M. E. (2015). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *JAMA*, 313(22), 2263–2273. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.5370>
- Roehlen, N., Crouchet, E., & Baumert, T. F. (2020). Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. In *Cells* (Vol. 9, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/cells9040875>
- Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2), 235–254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.004>
- Ross & Pawlina. (2015). *Histología texto y atlas. Correlación con biología molecular y celular.* (LWW, Ed.; 7th ed.).
- Ruch, R., Cheng, S., & Klaunig, J. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese Green Tea. *Carcinogenesis*, 10, 1003–1008. <https://doi.org/10.1093/carcin/10.6.1003>
- Sakihama, Y., Maeda, M., Hashimoto, M., Tahara, S., & Hashidoko, Y. (2011). Beetroot betalain inhibits peroxynitrite-mediated tyrosine nitration and DNA strand cleavage. *Free Radical Research*, 46(1), 93–99. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.641157>

- Salguero Palacios, R., Roderfeld, M., Hemmann, S., Rath, T., Atanasova, S., Tschuschner, A., Gressner, O. A., Weiskirchen, R., Graf, J., & Roeb, E. (2008). Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Laboratory Investigation*, *88*(11), 1192–1203.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.91>
- Sanz, N., Díez-Fernández, C., Andrés, D., & Cascales, M. (2002). Hepatotoxicity and aging: endogenous antioxidant systems in hepatocytes from 2-, 6-, 12-, 18- and 30-month-old rats following a necrogenic dose of thioacetamide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1587*(1), 12–20. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(02\)00048-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-4439(02)00048-0)
- Sarem, M., Znaidak, R., Macías, M., & Rey, R. (2006). Las células estrelladas del hígado: su importancia en condiciones normales y patológicas. *Elsevier*, *2*.
- Sawaya, W. N., Khatchadourian, H. A., Safi, W. M., & Al-Muhammad, H. M. (1983). Chemical characterization of prickly pear pulp, *Opuntia ficus-indica*, and the manufacturing of prickly pear jam. In *J. Fd Techno* (Vol. 18).
- Shahidi, F. (2004). Functional Foods: Their Role in Health Promotion and Disease Prevention. *Concise Reviews in Food Science*, *69*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10727.x>
- Shahidi, F. (2009). Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. *Trends in Food Science & Technology*, *20*(9), 376–387.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.08.004>
- Shahidi, F., & Wanasundara, P. (1992). Phenolic Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *32*, 67–103. <https://doi.org/10.1080/10408399209527581>
- Shi, L., Zhang, X., Liu, X., Jiang, Y., Deng, Y., & Liu, J. (2021). Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) phytochemicals inhibit hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Food Bioscience*, *42*, 101176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101176>
- Singh, G., Mohanty, B. P., & Saini, G. S. S. (2016). Structure, spectra and antioxidant action of ascorbic acid studied by density functional theory, Raman spectroscopic and nuclear magnetic resonance techniques. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *155*, 61–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.11.005>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. B. T.-M. in E. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Oxidants and Antioxidants Part A* (Vol. 299, pp. 152–178). Academic Press.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Siriwardhana, N., Shahidi, F., & Jeon, Y.-J. (2006). Potential antioxidative effects of cactus pear fruit (*Opuntia ficus-indica*) extract on radical scavenging and DNA damage reduction in human peripheral lymphocytes. *Journal of Food Lipids*, *13*, 445–458.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2006.00065.x>
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(1), 19–38.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.07.004>
- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C. C., Bunch, R., & 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. <https://doi.org/10.1021/jf048751y>

- Sulaiman, A., & Hussain, S. (2013). *Concentration and time dependent cytoprotective effects of anthocyanins against oxidative hemolysis induced by water and lipid soluble free radical initiators: an in vitro study* Corresponding Author.
- Sumaya-Martínez, M. T., Cruz-Jaime, S., Madrigal-Santillán, E., García-Paredes, J. D., Cariño-Cortés, R., Cruz-Cansino, N., Valadez-Vega, C., Martínez-Cardenas, L., & 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(10), 6452–6468. <https://doi.org/10.3390/ijms12106452>
- Sumida, Y., Niki, E., Naito, Y., & Yoshikawa, T. (2013). Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. In *Free Radical Research* (Vol. 47, Issue 11, pp. 869–880). <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.837577>
- Szaefer, H., Krajka-Kuźniak, V., Ignatowicz, E., Adamska, T., & Baer-Dubowska, W. (2014). Evaluation of the Effect of Beetroot Juice on DMBA-induced Damage in Liver and Mammary Gland of Female Sprague-Dawley Rats. *Phytotherapy Research : PTR*, 28. <https://doi.org/10.1002/ptr.4951>
- Tacke, F., & Zimmermann, H. W. (2014). Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *Journal of Hepatology*, 60(5), 1090–1096. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.12.025>
- Tada, M., Kohno, M., & Niwano, Y. (2010). Scavenging or Quenching Effect of Melanin on Superoxide Anion and Singlet Oxygen. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 46(3), 224–228. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.09-84>
- Taira, J., Tsuchida, E., Katoh, M., Uehara, M., & Ogi, T. (2015). Antioxidant capacity of betacyanins as radical scavengers for peroxy radical and nitric oxide. *Food Chemistry*, 166C, 531–536. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.102>
- Tan, D., Wang, Y., Bing, B., Yang, X., & Han, J. (2015). Betanin attenuates oxidative stress and inflammatory reaction in kidney of paraquat-treated rat. *Food and Chemical Toxicology*, 78. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.01.018>
- Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D., & Livrea, M. (2004). Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: Potential health effects of betalains in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 941–945. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.4.941>
- Tesoriere, L., Allegra, M., Gentile, C., & Livrea, M. (2009). Betacyanins as phenol antioxidants. Chemistry and mechanistic aspects of the lipoperoxyl radical-scavenging activity in solution and liposomes. *Free Radical Research*, 43, 706–717. <https://doi.org/10.1080/10715760903037681>
- Tesoriere, L., Butera, D., D'Arpa, D., di Gaudio, F., Allegra, M., Gentile, C., & Livrea, M. A. (2003). Increased Resistance to Oxidation of Betalain-enriched Human Low Density Lipoproteins. *Free Radical Research*, 37(6), 689–696. <https://doi.org/10.1080/1071576031000097490>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6), 669–675. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>

- Torres-Bojórquez, A. E., García, O., Miranda-Lopez, R., & Anaberta, C.-M. (2017). Evaluation of antioxidant capacity, physicochemical characteristics and sensory profile of *Opuntia robusta* and *O. ficus-indica*. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 67.
- Toufeksian, M.-C., Salen, P., Laporte, F., Tonelli, C., & de Lorgeril, M. (2011). Dietary Flavonoids Increase Plasma Very Long-Chain (n-3) Fatty Acids in Rats. *The Journal of Nutrition*, 141(1), 37–41. <https://doi.org/10.3945/jn.110.127225>
- Traber, M. G., & Stevens, J. F. (2011). Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 1000–1013. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.017>
- Uchiyama, M., & Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86(1), 271–278. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1)
- Urtasun, R., & Nieto, N. (2007). Células estrelladas hepáticas y estrés oxidativo . In *Revista Española de Enfermedades Digestivas* (Vol. 99, pp. 223–230). scieloes .
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- van Soest. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant* (2nd ed.).
- Vargas Mendoza Nancy. (2012). *Efecto hepatoprotector y antioxidante del extracto y los principios activos de Geranium shiedeanum* [Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo]. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/1803>
- Villa-Jaimes, G. S., Aguilar-Mora, F. A., González-Ponce, H. A., Avelar-González, F. J., Martínez Saldaña, Ma. C., Buist-Homan, M., & Moshage, H. (2022). Biocomponents from *Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha* fruits protect against diclofenac-induced acute liver damage in vivo and in vitro. *Journal of Functional Foods*, 89, 104960. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104960>
- Villasante, A., Patro, B., Chew, B., Becerra, M., Wacyk, J., Overturf, K., Powell, M., & Hardy, R. (2015). Dietary Intake of Purple Corn Extract Reduces Fat Body Content and Improves Antioxidant Capacity and n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Profile in Plasma of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46. <https://doi.org/10.1111/jwas.12206>
- Vinjamuri, S., Shanker, D., Ramesh, R. S., & Nagarajan, S. (2015). In vitro evaluation of hemolytic activity and cell viability assay of hexanoic extracts of *Bridelia ferruginea* Benth. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (WJPPS)*, 4(7), 1263–1268.
- Vulić, J., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Tumbas, V., Djilas, S., Četojević-Simin, D., & Čanadanović, V. (2012). Antioxidant and cell growth activities of beet root pomace extracts. *Journal of Functional Foods*, 4(3), 670–678. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.04.008>
- Vulić, J., Ćebović, T. N., Čanadanović-Brunet, J. M., Četković, G. S., Canadanovic, V., Djilas, S. M., & Tumbas Šaponjac, V. (2014). In vivo and in vitro antioxidant effects of beetroot pomace extracts. *Journal of Functional Foods*, 6, 168–175.

- Wang, W., Xu, X., & Miao, C. (2020). Kupffer Cell-Derived TNF- α Triggers the Apoptosis of Hepatic Stellate Cells through TNF-R1/Caspase 8 due to ER Stress. *BioMed Research International*, 2020, 8035671. <https://doi.org/10.1155/2020/8035671>
- Wettasinghe, M., Bolling, B., Plhak, L., Xiao, H., & Parkin, K. (2002). Phase II Enzyme-Inducing and Antioxidant Activities of Beetroot (*Beta vulgaris* L.) Extracts from Phenotypes of Different Pigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6704–6709. <https://doi.org/10.1021/jf020575a>
- Wolfram, R. M., Budinsky, A., Efthimiou, Y., Stomatopoulos, J., Oguogho, A., & Sinzinger, H. (2003). Daily prickly pear consumption improves platelet function. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 69, 61–66. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(03\)00057-7](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(03)00057-7)
- Wolfram, R. M., Kritz, H., Efthimiou, Y., Stomatopoulos, J., & Sinzinger, H. (2002). Effect of prickly pear (*Opuntia robusta*) on glucose- and lipid-metabolism in non-diabetics with hyperlipidemia--a pilot study. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 114(19–20), 840–846. <http://europepmc.org/abstract/MED/12503475>
- Xie, Y., Wang, G., Wang, H., Yao, X., Jiang, S., Kang, A., Zhou, F., Xie, T., & Hao, H. (2012). Cytochrome P450 Dysregulations in Thioacetamide-Induced Liver Cirrhosis in Rats and the Counteracting Effects of Hepatoprotective Agents. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(4), 796 LP – 802. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.043539>
- Xu, F., Liu, C., Zhou, D., & Zhang, L. (2016). TGF/SMAD Pathways and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 64. <https://doi.org/10.1369/0022155415627681>
- Xu, J., Wang, X., Su, G., Yue, J., Sun, Y., Cao, J., Zhang, X., & Zhao, Y. (2018). The antioxidant and anti-hepatic fibrosis activities of acorns (*Quercus liaotungensis*) and their natural galloyl triterpenes. *Journal of Functional Foods*, 46, 567–578. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.031>
- Yahia, E., & Mondragon Jacobo, C. (2011). Nutritional components and anti-oxidant capacity of ten cultivars and lines of cactus pear fruit (*Opuntia* spp.). *Food Research International - FOOD RES INT*, 44, 2311–2318. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.042>
- Yi, W., Fischer, J., & Akoh, C. C. (2005). Study of Anticancer Activities of Muscadine Grape Phenolics in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8804–8812. <https://doi.org/10.1021/jf0515328>
- Ying, H., Chen, Q., Zhang, W., Zhang, H., Ma, Y., Zhang, S., Fang, J., & Yu, C. (2017). PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review). *Molecular Medicine Reports*, 16. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7641>
- Yormaz, S., Bulbuloglu, E., Kurutas, E., Ciralik, H., Yuzbasioglu, F., Yildiz, H., Coskuner, I., Silay, E., Kantarceken, B., Göksu, M., Senoglu, N., & Kale, I. (2012). The comparison of the effects of hepatic regeneration after partial hepatectomy, silybum marinaum, propofol, N-acetylcysteine and vitamin E on liver. *Bratislavské Lekárske Listy*, 113, 145–151. https://doi.org/10.4149/BLL_2012_035
- Yuan, L., & Kaplowitz, N. (2013). Mechanisms of Drug-induced Liver Injury. *Clinics in Liver Disease*, 17(4), 507–518. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cld.2013.07.002>
- Zaragoza, A., Andrés, D., Sarrión, D., & Cascales, M. (2000). Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by phenobarbital pretreatment in rats. Inducibility of FAD monooxygenase

system and age effect. *Chemico-Biological Interactions*, 124, 87–101.

[https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(99\)00147-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(99)00147-7)

Zeghib, W., Boudjouan, F., Vasconcelos, V., & Lopes, G. (2022). Phenolic Compounds' Occurrence in *Opuntia* Species and Their Role in the Inflammatory Process: A Review. *Molecules*, 27, 4763. <https://doi.org/10.3390/molecules27154763>

Zenteno Ramírez, G. (2016). *Evaluación de la pulpa de variantes de tuna como alimento funcional*.

Zhou, W. C., Zhang, Q. B., & Qiao, L. (2014). Pathogenesis of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(23), 7312–7324. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7312>

Zielińska-Przyjemska, M., Olejnik, A., Dobrowolska-Zachwieja, A., Luczak, M., & Baer-Dubowska, W. (2016). DNA damage and apoptosis in blood neutrophils of inflammatory bowel disease patients and in Caco-2 cells in vitro exposed to betanin. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 70, 265–271. <https://doi.org/10.5604/17322693.1198989>

XIV) ANEXOS

CURVAS DOSIS- RESPUESTA

Curva tiempo respuesta tioacetamida

Se administró el hepatotóxico tioacetamida (TAA) vía intraperitoneal a 12 ratas Wistar macho de 90 a 110 gramos, dos días a la semana (lunes y jueves) por 7 semanas; durante la primera a una dosis de 250 mg/ kg y en las semanas consecuentes 200 mg/ kg (El-Mihi et al., 2017). Los animales fueron tratados bajo las condiciones establecidas por la NOM-062-200-1995. Se realizaron las cirugías de 4 ratas en las semanas 0, 5, 6 y 7 las cuales se anestesiaron con pentobarbital sódico (Pisabental Pisa agropecuaria) en una dosis de 40 mg/kg y se llevó a cabo la perfusión con ayuda de bomba de vacío Kd Scientific, con solución de lavado (NaCl, procaína, heparina); por medio de punción cardíaca se obtuvieron, en promedio, 2 mL de sangre que posteriormente se sometieron a centrifugación en microcentrífuga Hanil-Micro-12 a 3500 rpm durante 15 minutos para obtener el suero. También se extrajo el hígado y se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4% (paraformaldehído, NaOH, agua destilada) hasta su procesamiento.

Mientras que las muestras de suero se emplearon para monitorear la actividad de las enzimas hepáticas aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), así como los niveles séricos de albúmina para evaluar la capacidad del hígado para sintetizar proteínas mediante química sanguínea seca en el equipo VITROS® System Integrated 5600 Ortho Clinical Diagnostics Johnson & Johnson Company. Las muestras de tejido hepático fueron requeridas para evaluar el daño morfológico a nivel celular y tisular al aplicar la técnica histológica (Edna B. Prophet, 1992), haciendo uso del procesador de tejidos o histoquinete Leica Biosystems TP1020 para realizar los pasos inclusión, deshidratación, aclarado y parafinización y posteriormente, realizar cortes histológicos de 5 micras en microtomo rotativo Leica Biosystems. Por último, a las muestras se les aplicó la tinción tricrómica de Masson (Edna B. Prophet, 1992). El análisis de datos se realizó con el paquete estadístico Prisma ($p < 0.05$).

Curva tiempo- respuesta tioacetamida

a) Análisis histopatológico

Desde la quinta semana se presentó daño celular identificado por la presencia de esteatosis, balonización y necrosis (zonas eosinófilas) y tisular, caracterizado por cambios en la arquitectura lobulillar del parénquima hepático y presencia de fibras de colágeno (zonas púrpura) (Figura 1). Indicando que los cambios morfológicos del proceso fibrótico, se instalan en el hígado desde la quinta semana de administración con tioacetamida.

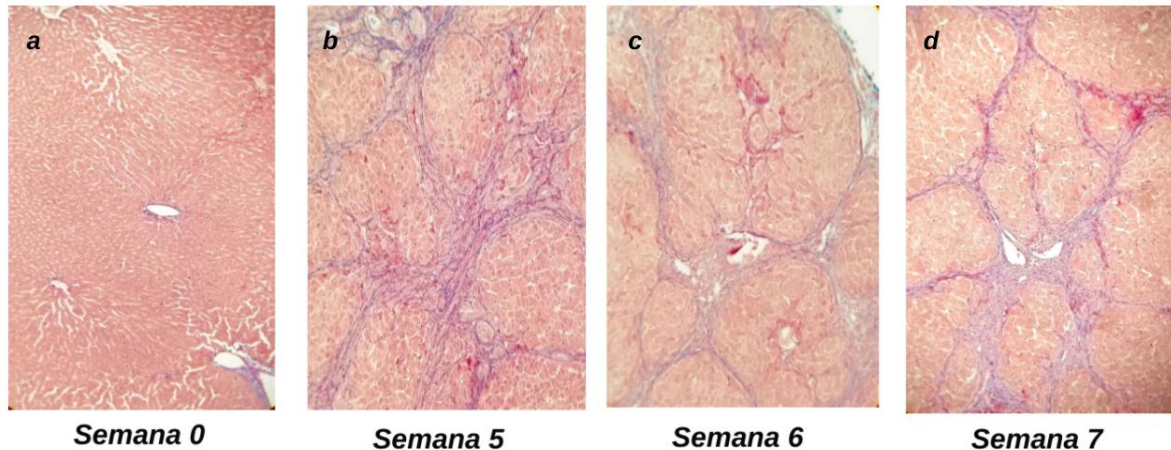


Figura 1. Cambios microscópicos en función al tiempo con la administración de TAA. Tinción tricrómica de Masson. 10x.

b) Biomarcadores de daño hepático

Los resultados de las concentraciones de AST y ALT muestran diferencias significativas en todas las semanas monitoreadas cuando son comparadas contra el control (Figuras 2 y 3). Mientras que en el caso de la albúmina, a pesar de que se presenta una tendencia a disminuir, no se observa diferencia significativa en la concentración de albúmina en suero en ninguna de las semanas (Figura 4).

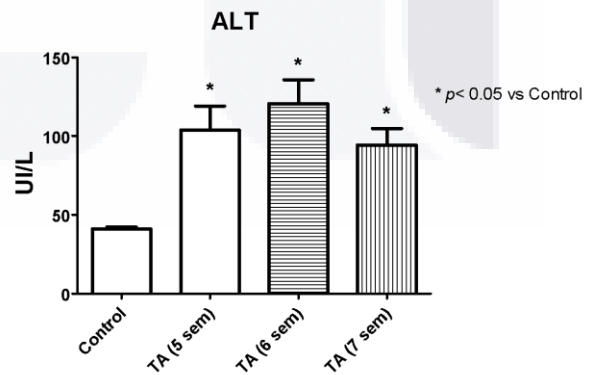
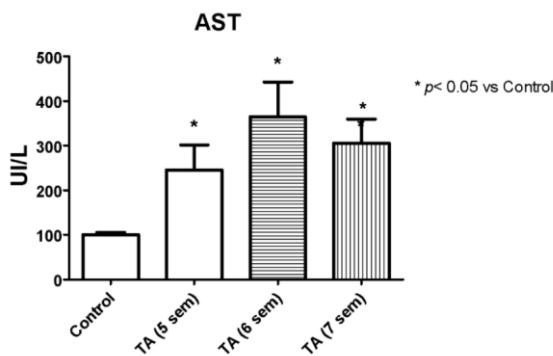


Figura 2. Se observa una elevación significativa de la enzima AST desde la semana 5 que aumenta en la semana 6 y alcanza una meseta

Figura 3. Se observa una elevación estadísticamente significativa de la enzima ALT en suero desde la semana 5 que aumenta en la

en la séptima. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba T-student. $p < 0.05$ (*)

semana 6 y disminuye en la séptima. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba T-student. $p < 0.05$ (**)

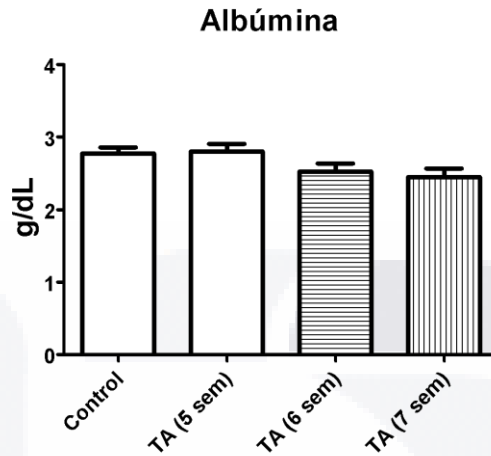


Figura 4. No se observa diferencia estadísticamente significativa en la concentración de albúmina en suero en ninguna de las semanas monitoreadas. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba T-student.

Con esta curva dosis- respuesta se determinó, mediante los marcadores de daño bioquímico e histológico, que es durante la quinta semana cuando el daño de interés (fibrosis hepática) se instala. Además se descartó la concentración de albúmina en plasma como marcador de daño hepático, ya que al analizar los datos no se obtuvo una relación significativa.

La curva tiempo- respuesta del xenobiótico TAA se realizó con el objetivo de saber en qué semana del tratamiento se instala la fibrosis hepática y desde la quinta semana esto sucedió, ya que la tinción tricrómica de Masson reveló necrosis hepática e infiltración periportal inflamatoria crónica (Figura 1), dicha necrosis involucra las zonas acinares 1 y 3, y ello confirma lo descrito por (P. Muriel et al., 2017) ya que afirma que este tóxico dañan dichas zonas, causando un daño periportal más acentuado que con el uso de otros xenobióticos. Además se identificó la acumulación de colágeno alrededor de las áreas focales la cual se acentuó en las semanas 7 y 8. Este daño está fuertemente relacionado con la activación de las células de Kupffer (Andrés et al., 2003; Luster et al.,

2000), ya que la lesión inicial causada por los metabolitos tóxicos de la TAA activan a estas células, generando una actividad incrementada de la enzima mieloperoxidasa (MPO) y liberando citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α (Baskaran et al., 2010). Una lesión previa es dirigida hacia los hepatocitos y esta, causa la activación de las células adyacentes no parenquimatosas, como las ya mencionadas células de Kupffer y las células estrelladas, resultando en la producción de citocinas proinflamatorias. MPO también representa un marcador de infiltración por macrófagos (Brown et al., 2002) y su elevación indica posible infiltración por neutrófilos y linfocitos que las citocinas suelen confinar en el sitio de la lesión; un estrés oxidativo podría desarrollar un círculo vicioso que genere fibrogénesis (Baskaran et al., 2010). El daño histopatológico fue confirmado mediante marcadores bioquímicos ALT, AST y albúmina; las enzimas ALT y AST se mostraron tan elevadas que en todas las semanas hubo diferencia significativa comparadas contra el control (Figura 2 y 3), indicando que inminentemente hay daño hepatocelular, sin embargo, la función de los hepatocitos no se encuentra mermada debido a que los niveles de albúmina no presentan diferencias significativas contra el control (Figura 4). Se han reportado elevaciones en proporciones muy similares en daño agudo con TAA (Baskaran et al., 2010). Los cambios necróticos son resultados de la liberación de las enzimas hepáticas que marcan daño en este órgano (Baskaran et al., 2010). Debido a ello, se concluye que la tioacetamida es un agente citotóxico ya que estos generan necrosis celular, por lo tanto, tienen efecto en el parénquima hepático. Las aminotransferasas plasmáticas se elevan a sobremanera (Cascales Angosto & Ferrandiz García, 1987), específicamente alanina aminotransferasa (ALT).

Ajuste de dosis de N- acetilcisteína.

Para determinar las dosis hepatoprotectora del fármaco N-acetilcisteína se trabajaron dosis de 50 mg/ kg y 75 mg/kg, las cuales se administraron diariamente durante 4 semanas a un total de 24 ratas con un peso promedio de 130 gramos. Se realizaron las perfusiones en las semanas 0, 2, 3 y 4 y mediante la aplicación de pentobarbital sódico intraperitoneal, se adormeció hasta la inconsciencia, mientras que la perfusión se realizó con solución lavadora (NaCl, procaína y heparina). Se obtuvieron muestras tanto de

sangre como de tejido hepático; a partir del suero sanguíneo se realizaron determinaciones de transaminasas (ALT y AST). Asimismo, la fijación de tejidos se realizó por inmersión con paraformaldehído al 4% y se procesaron mediante la técnica histológica de inclusión en parafina, además se aplicó la tinción tricrómica de Masson para identificar el daño celular y tisular. El análisis de datos se realizó con el paquete estadístico Prisma ($p < 0.05$).

Ajuste de dosis de N- acetilcisteína

a) Análisis histopatológico

Con ambas dosis, desde la segunda semana, se presentaron lesiones celulares como balonización y necrosis pero, a diferencia de la dosis de 50 mg/ kg, con 75 mg/ kg también se presentaron escasas zonas fibróticas (áreas azules). Durante la tercera semana, la cantidad de células en proceso de necrosis aumentó en ambos casos y en la cuarta semana la disposición sinusoidal normal del hígado se perdió (Figura 5).

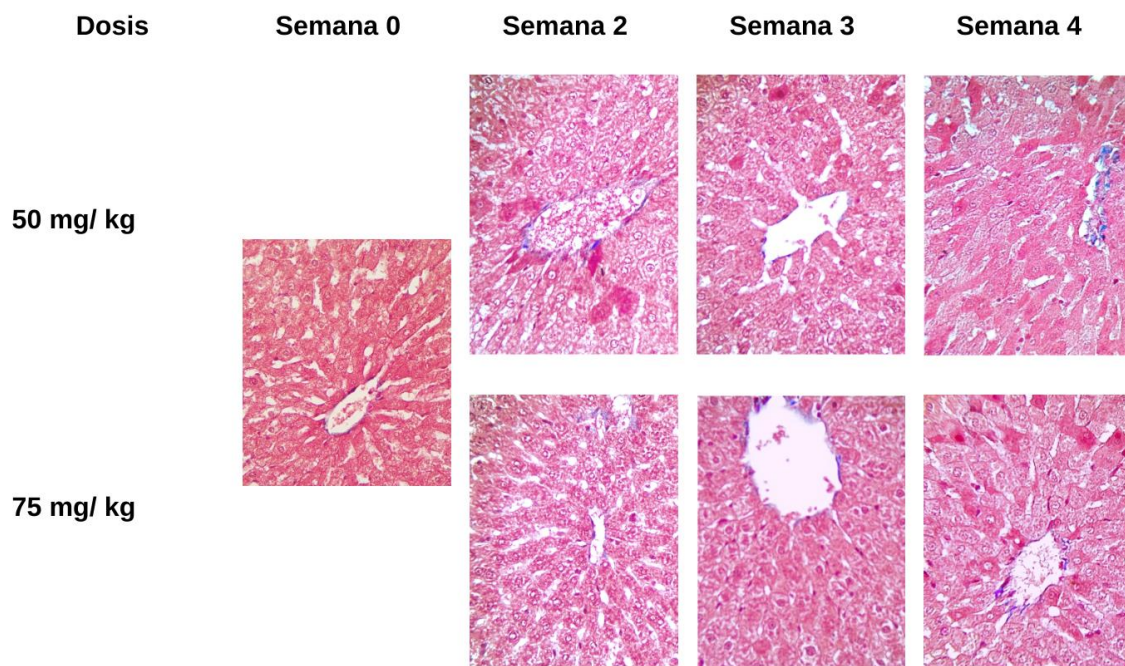


Figura 5. Hepatopatología hepática con diversas dosis de NAC y en distintos cortes de tiempo.

Tinción tricrómica de Masson. 40x.

b) Biomarcadores de daño hepático

Las diferencias más evidentes se observan para AST (Figura 6) ya que para ALT no se presentó diferencia significativa en ninguna de las semanas (Figura 7), considerando las dosis empleadas.

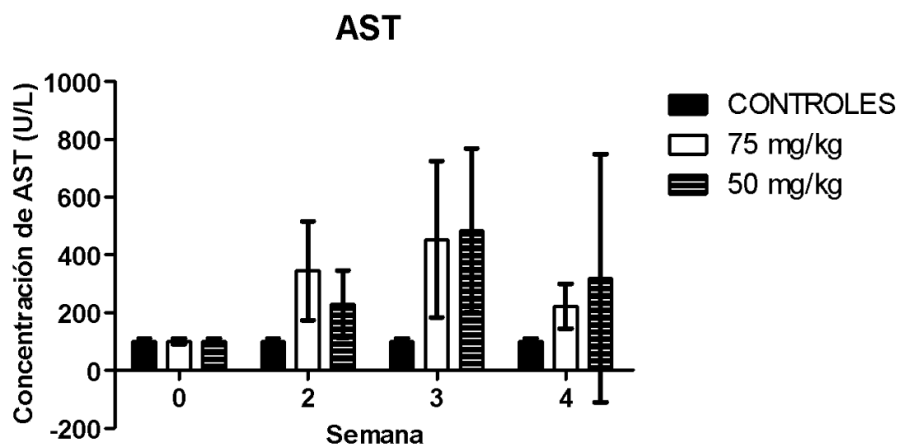


Figura 6. Se observa que desde la segunda semana hubo un incremento en la concentración de AST en suero con ambas dosis y en comparación con el control, indicando daño desde etapas tempranas con la NAC e incluso con la dosis más baja (50 mg/kg).

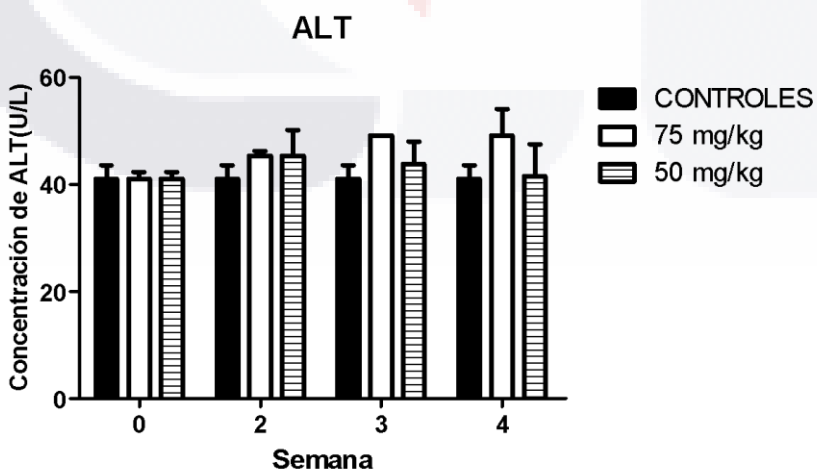


Figura 7. No se observa ningún cambio significativo en la concentración de ALT en ninguno de los tiempos monitoreados.

Se montaron los grupos experimentales N-acetilcisteína (NAC), Tioacetamida (TAA) y su uso concomitante (NAC/TAA). Se logró evaluar el efecto protector de NAC en el modelo de fibrosis hepática no alcohólica, pues tanto los resultados bioquímicos como histológicos mostraron un daño menor en comparación con los grupos tratados solo con TAA, ya que estos muestran valores mayores de ALT y AST (Figuras 6 y 7), así como una cantidad anormal de colágena en tejido (Figura 5). NAC es precursor del antioxidante intracelular más importante, el glutatión, y ha sido tratado en estudios piloto en humanos para el tratamiento de NASH, mostrando una mejora en los niveles de aminotransferasas en suero (Baumgardner et al., 2008). NAC es un donador de grupos sulfhidrilos que cruzan la membrana celular y restauran los niveles de GSH al proporcionar cisteína para su síntesis (Cotgreave, 1996). Este hepatoprotector se ha usado en la clínica para tratar varias condiciones asociadas al estrés oxidativo y/o la deficiencia de GSH (C. Oliveira et al., 2019), es por ello que el efecto que presentó en el daño causado por TAA es evidente, ya que uno de los principales mecanismos de éste último es exponer a la célula a estrés oxidativo. Se han demostrado decrementos significativos en los niveles de ALT y AST (Gulbahar et al., 2000), después del tratamiento de 4 semanas con NAC (Pamuk & Sonsuz, 2003), lo cual concuerda con los resultados encontrados en este ensayo que duró 5 semanas, en los cuales durante todas las semanas se presenta una diferencia significativa entre las barras representadas por TAA y las de NAC (Figuras 6 y 7), excepto AST durante la segunda semana, indicando que el daño hasta ese momento aún no era severo.

Sin embargo, en comparación con los controles, los marcadores histológicos y bioquímicos del grupo NAC se vieron alterados y mostraron lesión en los hepatocitos (balonamiento y necrosis), por lo que se ha considerado que la dosis administrada no es la apropiada, lo que permitirá realizar modificaciones pertinentes en estudios posteriores para lograr el efecto antioxidante deseado de NAC.

Se exploraron dosis pequeñas en comparación a la previa de NAC, 50 y 75 mg/kg y aunque se presentó daño celular (Figura 5) y alteración de las enzimas hepáticas (Figuras 6 y 7), estos cambios no son suficientes para considerar que el daño causado es irreversible. Ya que se presentan zonas con células balonizadas y necrosadas pero

éstas no son suficientes para causar daño severo, es por ello que se validó la dosis de 50 mg/kg como control positivo.

Curva dosis- respuesta betanina

Para identificar la dosis efectiva del pigmento betanina (Sigma-Aldrich 901266-5G, St. Louis, MO, USA) se realizó una curva dosis- respuesta con 50, 75, 100, 125 y 150 mg/kg (Han et al., 2015; Han, Zongju, et al., 2014; Tan et al., 2015) con 4 repeticiones por dosis. Fueron empleadas ratas Wistar macho con un peso promedio de 150- 200 gramos administradas vía oral con cánula bucoesofágica curva de acero inoxidable (Cadence Science calibre 18x3”), diariamente durante 5 días consecutivos. Se realizaron las perfusiones en el sexto día; mediante la aplicación de pentobarbital sódico intraperitoneal, se adormeció hasta la inconsciencia, mientras que la perfusión se realizó con solución lavadora (NaCl, procaína y heparina). Se obtuvieron muestras tanto de sangre como de tejido hepático; a partir del suero sanguíneo se realizaron determinaciones de transaminasas (ALT y AST) mediante química sanguínea seca en el equipo VITROS® System Integrated 5600 Ortho Clinical Diagnostics Johnson & Johnson Company. Asimismo, la fijación de tejidos se llevó a cabo con formalina neutra *in situ* y se procesaron mediante la técnica histológica de inclusión en parafina, además se aplicó la tinción tricrómica de Masson (Edna B. Prophet, 1992) (Figura 8) para identificar el daño celular y tisular. El análisis de datos se realizó con el paquete estadístico Prisma ($p < 0.05$).

Curva dosis- respuesta Betanina

a) Análisis histopatológico

La histología del hígado control mostró arquitectura sinusoidal cordonal característica y morfología poligonal normal de los hepatocitos (Fig. 8a); mientras que con las dosis empleadas de betanina se presentó daño mayormente en la zona 1 del acino hepático. Con 50 mg/kg se identificó edema celular, pérdida de la organización cordonal, además

de neutrófilos marginados en vasos capilares (Fig. 8b). Con la dosis de 75 mg/ kg a los cambios anteriormente descritos se le sumó la presencia de infiltrado inflamatorio (Fig. 8c): mientras que con 100 mg/ kg hubo incremento de edema celular y extensión del daño celular a la zona 3 del acino hepático (Fig. 8d). Por último, con las dosis 125 mg/ kg y 150 mg/ kg el daño se hizo más severo e incluso se identificaron hepatocitos en proceso necrótico (Figuras 8e y 8f).

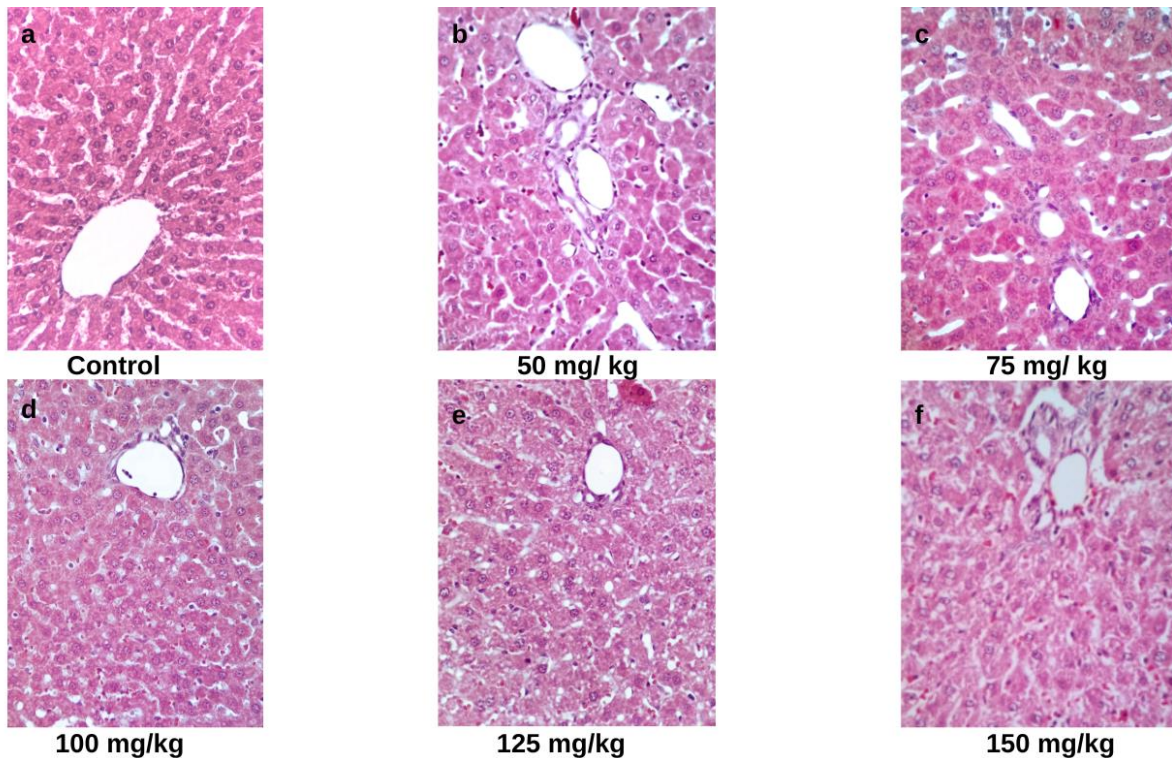


Figura 8. Cambios estructurales y morfológicos con cada una de las dosis de betanina administradas. Tinción H&E. 40x.

b) Biomarcadores de daño hepático

Al comparar los niveles séricos de la enzima AST de todas las dosis usadas para la curva dosis respuesta, resultó que con 75 mg/ kg hay una mayor liberación de dicha enzima a suero (Figura 9) ya que la diferencia estadística es significativa ($p < 0.05$) cuando es comparado contra el control. Sin embargo, en el caso de ALT, es la dosis de 50 mg/ kg la que representa la diferencia más significativa ($p < 0.01$) cuando es, de igual manera, comparada contra el control (Figura 10). Las concentraciones de la proteína albúmina no

tienen importancia estadística ya que no se presentó diferencia significativa comparada contra el control (Figura 11).

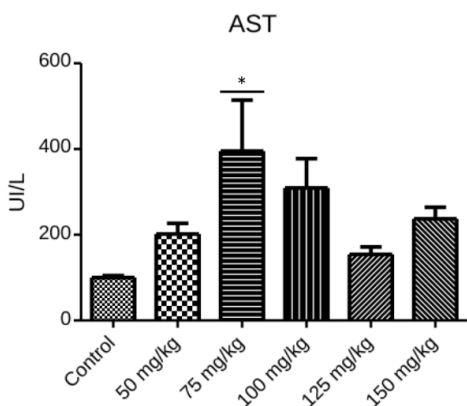


Figura 9. Se observa un incremento significativo de las concentraciones de AST en plasma en cada una de las dosis en comparación contra el control. Sin embargo, es con la dosis de 75 mg/kg que se presenta mayor concentración de esta enzima en plasma. Anova de una vía. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (***)

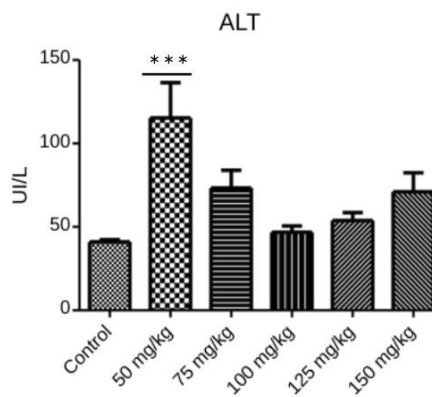


Figura 10. Se observa un incremento significativo de las concentraciones de ALT en plasma en cada una de las dosis en comparación contra el control. Sin embargo, es con la dosis de 50 mg/kg que se presenta mayor concentración de esta enzima en plasma. Anova de una vía. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (***)

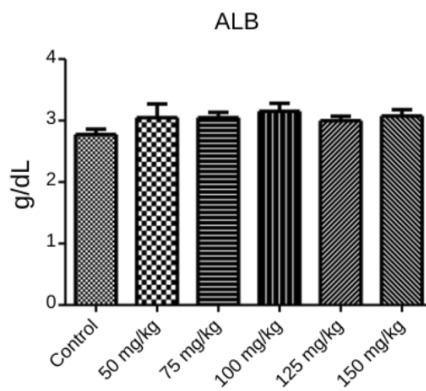


Figura 11. No se observa diferencia significativa en las concentraciones de albúmina sérica con ninguna de las dosis administradas. Anova de una vía.

Ampliación de la curva dosis- respuesta de betanina.

Debido al daño encontrado en la curva dosis- respuesta de betanina, se exploraron dosis más pequeñas de las usadas en la curva anterior, las cuales fueron 25, 40 y nuevamente

50 mg/ kg, ya que en la literatura se maneja desde 20 mg/ kg hasta 100 mg/ kg hasta por 28 días (Han et al., 2015; Han, Zongju, et al., 2014; Tan et al., 2015). Se usaron 4 repeticiones por dosis. Fueron empleadas ratas Wistar macho con un peso promedio de 150- 200 gramos administradas vía oral con cánula bucoesofágica curva de acero inoxidable (Cadence Science calibre 18x3”), diariamente durante 5 días consecutivos. Se realizaron las perfusiones en el sexto día; mediante la aplicación de pentobarbital sódico intraperitoneal se adormeció hasta la inconsciencia, mientras que la perfusión se realizó con solución lavadora (NaCl, procaína y heparina). Se obtuvieron muestras tanto de sangre como de tejido hepático; a partir del suero sanguíneo se realizaron determinaciones de transaminasas (ALT y AST) mediante química sanguínea seca en el equipo VITROS® System Integrated 5600 Ortho Clinical Diagnostics Johnson & Johnson Company. Asimismo, la fijación de tejidos se llevó a cabo con formalina neutra *in situ* y se procesaron mediante la técnica histológica de inclusión en parafina, además se aplicó la tinción tricrómica de Masson (Edna B. Prophet, 1992) (Figura 12) para identificar el daño celular y tisular. El análisis de datos se realizó con el paquete estadístico Prisma ($p < 0.05$).

Ampliación curva dosis- respuesta Betanina

a) Análisis histopatológico

El tejido hepático del grupo control (Fig. 12a) mostró morfología celular y tisular normales muy similar al tejido perteneciente a la dosis de 25 mg/ kg (Fig. 12b). Con 40 mg/ kg se identifican algunos hepatocitos con tumefacción y cambios en la organización cordonal hepática (Fig. 12c). Mientras que con 50 mg/ kg existe mayor daño en los hepatocitos y la organización sinusoidal normal es casi inapreciable (Fig. 12d).

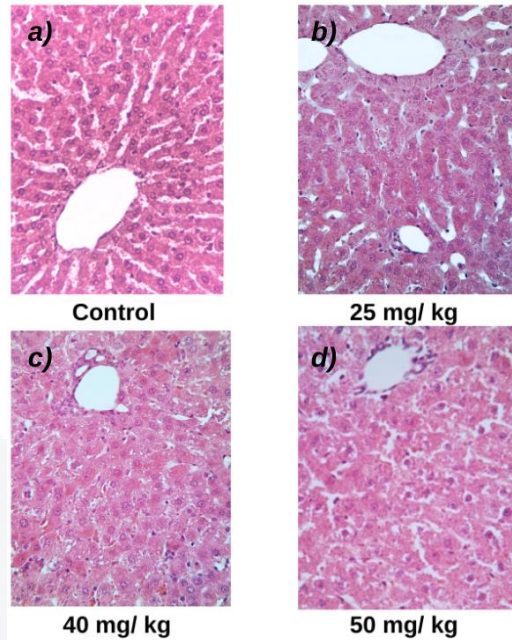


Figura 12. Hepatología de hígado con diversas dosis de betanina. Tinción H&E. 40x.

b) Biomarcadores de daño hepático.

La dosis de 40 mg/ kg causó la mayor concentración de AST y ALT en suero ya que, comparadas contra el control presentan una diferencia estadísticamente significativa (Figuras 13 y 14). Sin embargo, la concentración de albúmina sérica no presentó diferencias significativas cuándo es comparada contra el control (Figura 15).

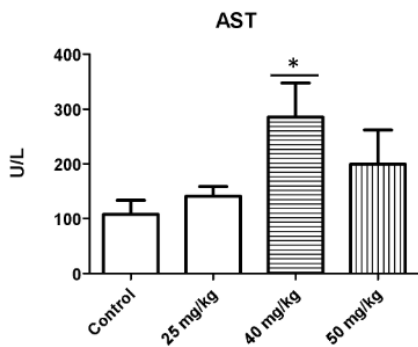


Figura 13. Se observan diferencias significativas con la dosis de 40 mg/kg respecto al control. Anova de una vía. $p < 0.05$ (*). Prisma Graphpad, versión 5.

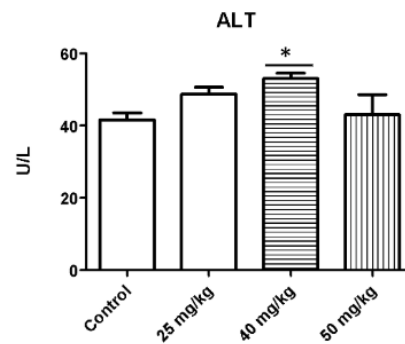


Figura 14. Se observan diferencias significativas con la dosis de 40 mg/kg respecto al control. Anova de una vía. $p < 0.05$ (*). Prisma Graphpad, versión 5.

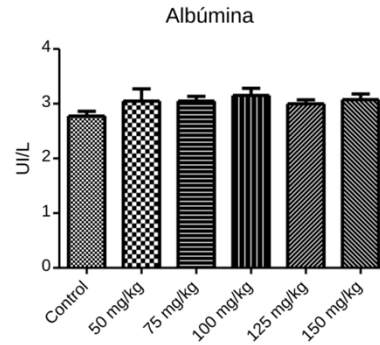


Figura 15. No se observan diferencias significativas con ninguna dosis respecto al control. Anova de una vía. $p < 0.05$ (*). Prisma Graphpad, versión 5.

Para validar otro control positivo, la betanina, se realizó una curva dosis respuesta y se analizaron los marcadores histopatológicos (Figuras 8 y 12) y bioquímicos (Figuras 9-11, 13-15). Esto partiendo de la premisa que los antioxidantes naturales a ciertas dosis pueden comportarse como prooxidantes, ya que en presencia de metales de transición como el cobre catalizan la degradación del ADN (Hadi et al., 2010). Por ejemplo, se ha estudiado la posibilidad de que la betanina esté relacionada con mecanismos que tienen como resultado la liberación de ROS a través de la reducción Cu^{2+} a Cu^+ , particularmente en polimorfonucleares en enfermedades inflamatorias del intestino (Zielińska-Przyjemska et al., 2016). Pero es necesario que se regularicen las dosis antes de emplearse ya que se han descubierto capacidades de la betanina para inducir apoptosis mediante la activación de procaspasa y caspasa-3, para reducir el daño al ADN celular al acelerar el proceso de eliminación del H_2O_2 , aunque también se ha observado una pérdida moderada del potencial mitocondrial como resultado del tratamiento con betanina, sin embargo, se sabe que este efecto relativamente moderado podría estar relacionado con las dosis aplicadas (Zielińska-Przyjemska et al., 2016). Al confirmar que el pigmento betanina es capaz de causar efectos celulares adversos (edema celular, pérdida de la organización cordonal, neutrófilos marginados en vasos capilares e infiltrado inflamatorio), se realizó una ampliación de la curva dosis respuesta, concluyendo de una manera satisfactoria la dosis benéfica.

XV) ARTÍCULO PUBLICADO



Article

Hepatoprotective Effect of *Opuntia robusta* Fruit Biocomponents in a Rat Model of Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis

Nayeli Amalinalli Pulido-Hornedo ¹, Javier Ventura-Juárez ¹ , Fidel Guevara-Lara ², Herson Antonio González-Ponce ³ , Esperanza Sánchez-Alemán ^{1,4}, Manon Buist-Homan ^{5,6}, Han Moshage ^{5,6} and Ma. Consolación Martínez-Saldaña ^{1,*}

- ¹ Basic Sciences Center, Department of Morphology, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Mexico
 - ² Basic Sciences Center, Department of Chemistry, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Mexico
 - ³ Instituto Tecnológico de Aguascalientes, Aguascalientes 20256, Mexico
 - ⁴ Unidad de Medicina Familiar 8, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Aguascalientes 20180, Mexico
 - ⁵ Department of Gastroenterology and Hepatology, University Medical Center of Groningen, University of Groningen, 9713 Groningen, The Netherlands
 - ⁶ Department Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen, University of Groningen, 9713 Groningen, The Netherlands
- * Correspondence: mcmtzsal@correo.uaa.mx



Citation: Pulido-Hornedo, N.A.; Ventura-Juárez, J.; Guevara-Lara, F.; González-Ponce, H.A.; Sánchez-Alemán, E.; Buist-Homan, M.; Moshage, H.; Martínez-Saldaña, M.C. Hepatoprotective Effect of *Opuntia robusta* Fruit Biocomponents in a Rat Model of Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis. *Plants* **2022**, *11*, 2039. <https://doi.org/10.3390/plants11152039>

Academic Editor: Vanessa Steenkamp

Received: 7 July 2022

Accepted: 29 July 2022

Published: 4 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Liver fibrosis is a chronic disease associated with oxidative stress that has a great impact on the population mortality. Due to their antioxidant capacity, we evaluated the protective effect of *Opuntia robusta* fruit (*Or*) on liver fibrosis. A nutraceutical characterization of *Or* was performed and a model of fibrosis was induced with thioacetamide (TAA) in Wistar rats. Aminotransferases, reduced glutathione (GSH) and histopathology were evaluated. *Or* contained 436.5 ± 57 mg of Betacyanins equivalents/L., 793 mg of catechin equivalents (CAE)/100 g for flavonoids, 1118 mg of gallic acid equivalents (GAE)/100 g for total phenols, 141.14 mg/100 g for vitamin C and 429.9 µg/100 g for vitamin E. The antioxidant capacity of *Or* was: 2.27 mmol of Trolox[®] equivalents (TE)/L (DPPH), 62.2 ± 5.0 µmol TE/g (ABTS^{•+}), 80.2 ± 11.7 µmol TE/g (FRAP), 247.9 ± 15.6 µmol TE/g (AAPH) and 15.0% of H₂O₂ elimination. An increase ($p < 0.05$) of aminotransferases and a decrease ($p < 0.05$) of hepatic GSH was observed in the TAA group compared to the control and the concomitant groups. Histopathology showed changes in the normal architecture of the liver treated with TAA compared to the concomitant treatments. *Or* contains bioactive components with antioxidant capacity, which can reduce fibrotic liver damage.

Keywords: antioxidants; liver fibrosis; biocompounds; functional foods; oxidative stress; liver injury

1. Introduction

Fibrosis is an inadequate adaptative response to chronic tissue damage. Oxidative stress is a key factor in the development of liver fibrosis, as it damages hepatocytes and promotes the release of proinflammatory mediators [1]. Liver fibrosis is associated with significantly increased rates of morbidity and mortality worldwide and there are currently no adequate therapies to treat its progression [2].

Liver fibrosis is a dynamic process characterized by an imbalance between extracellular matrix secretion and degradation in response to continuous exposure of the liver to noxious agents. Chronic exposure to certain chemical substances generates oxidative stress that induces secretion of soluble inflammatory and fibrogenic mediators, such as TNF- α , TGF- β , IL1, and IL6, eventually causing hepatocellular damage [3]. These cytokines activate different populations of hepatic cells and cause a sustained inflammatory reaction. One

of the cell populations that is activated are hepatic macrophages (Kupffer cells). Once activated they cause the activation of quiescent hepatic stellate cells (qHSC) triggering an imbalance of synthesis and degradation of extracellular matrix components (EMC).

Due to the increase in the incidence and prevalence of liver fibrosis and the relative ineffectiveness of currently used treatments, there is a need for new therapeutic strategies to reduce damage, and thus prevent its progression.

Thioacetamide (TAA) is a compound widely used to simulate the damage generated in the pathogenesis of liver fibrosis. TAA increases reactive oxygen species (ROS) formation via its metabolite, thioacetamide sulf dioxide (TASO₂), which causes severe oxidative stress along with lipid peroxidation and generation of protein carbonyls and DNA adducts [4]. Oxidative stress in the liver causes activation of hepatic stellate cells (HSCs) due to ROS produced during TAA metabolism. ROS provides paracrine activation signals that induce transdifferentiation of HSCs into myofibroblast-like cells causing an imbalance in EMC synthesis and degradation [5], perpetuating the fibrotic process.

Species of the *Opuntia* genus have great cultural and nutritional importance in Mexico. Eighty three of the 189 species that comprise the genus are found in the north-central zone of this country, in the states of Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas and Aguascalientes [6]. *Opuntia* species have many benefits, and their widespread distribution has prompted research on the nutritional properties of their fruits, the prickly pears [7,8], which have been proposed as functional foods. Concentrations of various bioactive compounds have been reported before, mainly betacyanins, total phenols and flavonoids in seeds [9], peel [9–11], pulp [9,11], and juice [12] of different species of this genus. However, the fruits of each harvest have different concentrations of secondary metabolites since these depend on external environmental conditions and stimuli, such as humidity, temperature, season, altitude, pollution, etc. [9,12,13] Thus, it is important to perform a nutraceutical characterization each time a new study is carried out in order to determine if the biological effect observed is due to the concentrations obtained from the biocomponents.

The bioactive compounds of *Opuntia robusta* fruit (*Or*) have been studied due to its potential beneficial effect on intestinal, cardiovascular, and liver health as well as for having antioxidant and even anticancer properties [14–16]. Likewise, this fruit has been used to treat degenerative and metabolic diseases caused by oxidative stress [17].

Previously, the antioxidant and hepatoprotective effects of *Or* extracts on oxidative stress-induced acute liver damage induced by acetaminophen [12,18] and diclofenac intoxication [19] have been reported. Because oxidative stress is a common phenomenon in acute and chronic liver damage caused by different noxious agents, including drugs, chemicals and viruses that can lead to fibrosis, the aim of this study was to determine the nutraceutical properties and the antioxidant, hepatoprotective and antifibrotic effects of *Or* in a rat model of hepatic fibrosis induced with TAA.

2. Results and Discussion

2.1. Nutraceutical Characterization

2.1.1. Fruit Material

A total of 42.6 kg of prickly pears (Figure 1) were collected, of which 24.5 kg were destined for the extraction of *Or* pulp (*OrP*) and 18.1 kg for the extraction of *Or* extract (*OrE*), obtaining 6.35 and 4.96 L, respectively. The average weight yield of *OrP* obtained was 47.81% (data not shown) and the percentage of lyophilization yield was 13.38% on average.

It has been reported that 28 to 58% of the entire weight of the *Opuntia* fruits is pulp [20], which is consistent with our results.

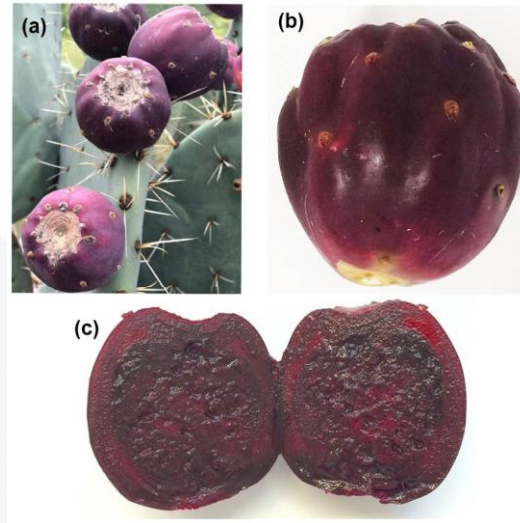


Figure 1. (a) Cladodes of *Opuntia robusta* in the wild where they were collected, with some fruits (prickly pears). The cladodes are circular in shape and bluish in color. (b,c) Ripe fruits reach a size of 7 to 11 cm.

2.1.2. Determination of Moisture Content

The moisture content of *OrP* was found to be $89.96 \pm 0.1\%$ according to the AOAC protocols [21]. The edible portion of the fruit, *OrP*, is composed of 84 to 90% water [20]. A moisture percentage of 84.10 ± 0.14 has been reported previously for *OrP* [22] a figure very close to the one obtained in the present study and determined following AOAC protocols. These species are well known for mitigating food and water shortages in drought-prone areas [23].

2.1.3. Bromatological Analysis of *OrP*

The bromatological analysis of *OrP* is presented in Table 1. We infer from this analysis that the plants from which the fruits were collected are middle-aged because there is an inverse correlation between the crude fiber content, which increases with the age of the plant [24] and the crude protein content that decreases in ageing plants. Moreover, an important nutritional value is inferred from *OrP*, considering its high percentage of nitrogen-free extract (NFE). NFE represents highly digestible carbohydrates, which, like total carbohydrates, also increase with age [24]. All these determinations were made both on dry matter basis (DMB) and on wet matter basis (WMB).

Table 1. *OrP* (*Opuntia robusta* pulp) bromatological analysis.

Component (%)	DMB	WMB
Dry matter	100	37.99
Crude protein	1.18	0.45
Crude fiber	2.84	1.08
Crude fat	0.76	0.29
Ashes	6.75	2.56
Nitrogen free extract	88.47	33.61

The percentages are given on dry matter basis (DMB) and wet matter basis (WMB).

2.1.4. Betacyanins

Betalains are secondary metabolites classified into two main groups: betacyanins and betaxanthins depending on the groups conjugated to the precursor betalamic acid [25]. Betacyanins are considered as antioxidants due to their capability to scavenge free radicals directly by the presence of a cyclic amino group, which acts as a hydrogen donor or indirectly via redox-sensitive transcription factors, such as Nrf2, which activates the cellular antioxidant response via AREs (antioxidant response elements). The content of betacyanins obtained from *OrP* was 436.5 ± 57 mg of betacyanin equivalents/L (Table 2) similar to the values previously reported by González-Ponce et al. (2020) [18], 464.9 ± 10.87 mg of betacyanin equivalents/L and higher than those found by González-Ponce et al. (2016) [12] 333.27 ± 11.46 mg of betacyanin equivalents/L. Taking into account that the weight of 1 L of *OrP* is 1032.6 g, its percentage of humidity is 89.96% and its percentage of solids is 10.04%, the dry basis figure of betalains obtained was 4.18 mg of equivalents of betacyanins per gram of dry *OrP*, a figure significantly higher than that reported by Castellanos-Santiago and Yahia (2008) [7] (2.06 ± 0.06 mg/g dry pulp) for *Opuntia robusta*, which, in turn, was compared with other species: *ficus-indica* (0.39 ± 0.03 mg/g dry pulp), *megacantha* (0.065 ± 0.01 mg/g dry pulp) and *albi-carpa* (0.05 ± 0.02 mg/g dry pulp) species. This indicates that *Or* has a higher antioxidant capacity than some other fruits studied and even higher than other *Opuntia* species because this capacity is directly proportional to their content of betacyanins.

Table 2. Quantification of betacyanins, total phenolic compounds and flavonoids in *OrP* (*Opuntia robusta* pulp); GAE/g = mg gallic acid equivalents/gram, dry matter basis (dmb); CAE/g = mg catechin equivalents/gram, db.

Betacyanins	Total Phenols	Flavonoids
436.5 ± 57 mg of betacyanin equivalents/L	1118.0 mg GAE/100 g, dmb	793 mg CAE/100 g, dmb

Betanin is an important betacyanin and has a chemical structure that allows the neutralization of free radicals that are mainly responsible for lipid peroxidation. The redox potential of betanin makes this molecule an efficient reducer of peroxy radicals derived from unsaturated lipids of biological membranes [26]. Betanin also acts as a scavenger of nitrogen dioxide, the radical initiator of the oxidative process of low-density lipoproteins (LDL). The antioxidant capacity of betanin is linked to its phenol group [27] and induces the antioxidant Nrf2 pathway [28]. The molecular structure of betacyanins has an electron-donating site, rich in electrons and an electron-accepting site, which is deficient in electrons, bound by a conjugated π system. This generates an intramolecular electron transfer process and facilitates the flux of electrons within the molecule [29]. The antioxidant potency of betacyanins can be attributed to this mechanism since it can donate or remove electrons from radical species. Betacyanins can reduce the oxidative damage present in hepatic fibrosis induced by thioacetamide by neutralizing superoxide radicals that are generated by its biotransformation.

2.1.5. Total Soluble Phenols

OrP has 1118.0 mg GAE/100 g of total soluble phenols (Table 2). Fernández-López et al. (2010) [30] reported 218.8 mg/100 g in *ficus-indica* and compared it with *Opuntia stricta* (204.4 mg/100 g) and *ondulata* (164.6 mg/100 g). *Or* has a significant number of phenolic compounds, even higher than those reported for these species using the same Folin-Ciocalteu method. Phenolic compounds, also known as hydrophilic antioxidants, are the most abundant secondary metabolites in fruits [31]. It has been reported that the pulp of the *Opuntia* spp. fruits contains phenolic compounds and other antioxidants that have a positive effect on the cellular redox balance, mainly due to the reduction of LDL levels [32]. *Or* contains a higher quantity of total soluble phenols than the other *Opuntia* species that

have been studied. Moreover, the inhibition of peroxidation of polyunsaturated fatty acids correlates with the antioxidant capacity of polyphenols [33]; consequently, it is inferred that *Or* prevents the oxidation of membrane lipids and, consequently, cell necrosis.

2.1.6. Total Soluble Flavonoids

OrP contained 793 mg of catechin equivalents (CAE) per 100 g of fruit on dry basis (Table 2). Part of the beneficial activity of these species is attributed to the synergistic effect of flavonoids with betalains [32]. This suggests that the important antioxidant activity of *OrP* is not only due to its considerable amount of betacyanins, but also from their interaction with phenolic compounds, including flavonoids, which has effects on lipid metabolism [34], increasing plasma levels of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) [35]. Furthermore, the consumption of flavonoids stimulates the conversion of alpha-linolenic acid into long-chain polyunsaturated fatty acids n-3 EPA and DHA [36]. Flavonoids intake has also been associated with an increase in the concentration of polyunsaturated fatty acids by modifying the enzymatic activity or gene expression of the fatty acid desaturase enzymes Δ5 and Δ6 [37]; thus, reducing oxidative damage to membrane lipids. Flavonoids also attenuate oxidative damage by increasing the activity of endogenous antioxidant mechanisms, such as the transcription factor Nrf2 [38].

An excessive generation of ROS, causes oxidation of polyunsaturated fatty acids that constitute biological membranes, eventually causing cell damage and cell death. Flavonoids and betanin inhibit the formation of alkyl radicals, the molecular entity associated with the oxidation of lipids [39]. In addition, betanin has been reported to scavenge superoxide anions [40] and this scavenging effect is augmented in the presence of flavonoids [32].

Or has proven to be the species with the highest concentration of betalains, total phenolic compounds and flavonoids [11,12], which confirms its important biological activities, mainly its antioxidant capacity. We propose that their consumption reduces the severity of liver fibrosis.

2.1.7. Antioxidant Capacity

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

To evaluate the antioxidant effect and elucidate the possible mechanisms of cytoprotection of *Or*, we performed the DPPH free radical scavenging assay, obtaining 2.27 mmol of Trolox[®] equivalents (TE)/L for *OrP* (Table 3). González-Ponce et al. (2016) [12] has reported higher figures (5.77 ± 0.33 mmol eq. Trolox/L) for *robusta*; however, they also report a lower figure for the *streptacantha* species (1.31 ± 0.94 mmol eq. Trolox/L).

Table 3. TEAC (Trolox Equivalents Antioxidant Capacity) of *OrP* by different methods and its capacity to scavenge H₂O₂; μmol TE/g, db = μmol of Trolox[®] equivalents per gram of dry sample. Values are the means of three repetitions.

DPPH	ABTS ⁺⁺	FRAP	AAPH	Capacity to Scavenge H ₂ O ₂
2.27 mmol TE/L	62.2 ± 5.0 μmol TE/g, db	80.2 ± 11.7 μmol TE/g, db	247.9 ± 15.6 μmol TE/g, db	15 ± 0.8% at: 100 μg/mL

DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS⁺⁺: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt; FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power; AAPH: 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride.

It has been established that the *Opuntia* fruit species with the highest values in this assay are those with red-purple pigments [41]. This strengthens the evidence that antioxidant activity is closely related to the presence of betalains and their interaction with other biocomponents, such as flavonoids, phenolics and vitamins. In support, DPPH correlates strongly with the amount of flavonoids and phenolic compounds present in the fruit [42].

Using the DPPH method, it has been evaluated that the antioxidant capacity of titanium dioxide nanofibers increases considerably when betanin is added [43]. Therefore, we conclude that *OrP* has a potent radical scavenging activity due to the presence of multiple bioactive compounds, including betacyanins (Table 2).

ABTS^{•+} (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) Diammonium Salt)

The Trolox Equivalents Antioxidant Capacity (TEAC) of *OrP* evaluated by the ABTS^{•+} method is 62.2 ± 5.0 $\mu\text{mol TE/g}$ on dry matter basis (Table 3). The extracts of the fruit of *Opuntia streptacantha* (61.69 ± 3 mg eq. ascorbic acid/100 mL) have been compared with those of *Opuntia robusta* (92.62 ± 5 mg eq. ascorbic acid/100 mL) [12], confirming that *O. robusta* has a greater capacity to eliminate ABTS^{•+} radical and demonstrating its high capacity to neutralize radicals via two different mechanisms: single electron transfer (SET) or hydrogen atom transfer (HAT) since the ABTS^{•+} radical can be neutralized by any of these routes [44]. In the absence of phenolic compounds, the ABTS^{•+} radical is stable; however, it reacts with hydrogen donors, such as phenolics, and generates a colorless metabolite of ABTS^{•+} [45], indicating that the major mechanism detected in this assay is HAT (Table 2) due to the presence of phenolic compounds in *Or*.

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

The TEAC of *OrP* determined by this method, 80.2 ± 11.7 $\mu\text{mol TE/g}$ on dry matter basis (Table 3), indicates the presence of phenolic compounds (Table 2) that can diminish the conversion of ferrous ion Fe^{2+} to the ferric ion Fe^{3+} inhibiting the Fenton reaction that yields the strongly oxidizing hydroxyl radical. *Or* is known to contain almost three times the TEAC (73.24 ± 3 mg eq. ascorbic acid/100 mL) than *O. streptacantha* (28.82 ± 2 mg eq. ascorbic acid/100 mL) [12]. The FRAP assay is specific for the electron donor mechanism (SET) [46]. That is why it is convenient to combine ABTS^{•+} and FRAP techniques to obtain a complete picture of antioxidant capacity of *Or* [44].

AAPH (2,2-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride)

We determined that 50% of the erythrocyte membrane lipid peroxidation caused by AAPH was reversed by *OrP*, a percentage comparable to that reported for carotenoids (48%) [47]. The capacity of betanin and its aglycone betanidin to inhibit lipoperoxidation and the degradation of the heme group in vitro, even at very low concentrations, has been reported before [48]. Furthermore, betalains are known to inhibit peroxy-nitrite-mediated tyrosine nitration and DNA chain division [49]. Thus, the antioxidant capacity of these pigments is not limited to a single mechanism of action.

In the third phase of the assay, it was necessary to dilute the *OrP* extract since the concentrated extract exceeded the pre-established values of the vitamin E analogue Trolox (Table 3), suggesting that the synergy of multiple components of *OrP* enhances the antioxidant capacity of each of them, including vitamin E.

Capacity to Scavenge H_2O_2

The capacity of *OrP* to scavenge H_2O_2 was $15 \pm 0.8\%$ at 100 $\mu\text{g/mL}$ (Table 3) similar to that of *Crataegus monogyna* water and ethanol extracts (15.44–30.13%) [50]. The ability to neutralize reactive species, such as hydrogen peroxide, can be attributed to the presence of primary antioxidants, such as phenols and flavonoids [51], and these antioxidants are present at significant concentrations in *OrP* (Table 2). Furthermore, betanin pretreatment of HT29 cells significantly prevents DNA damage caused by H_2O_2 [40] and it has been reported that betanin protects DNA against ROS and RNS [40,49].

Vitamins E and C

Vitamins E and C are potent antioxidants present in *OrE* at 429.9 $\mu\text{g}/100$ g and 141.14 mg/100 g, respectively (Figures 2 and 3). The content of vitamin C was very similar to that reported for guava, a fruit known for its significant content of vitamin C (136.99 mg/100 g) [52].

The ability of these vitamins to eliminate ROS has been reported and there is a direct correlation between their concentration and the preservation of reduced glutathione (GSH) levels [53]. Furthermore, the gene expression of glutathione reductase and glutathione peroxidase are increased by their intake [53,54]. The concomitant administration of *OrP* or

OrE with TAA increases GSH levels (F indicating a beneficial effect of the components of the fruit, including vitamins E and C. The beneficial effects on the levels of non-enzymatic antioxidants provided by the intake of vitamins E and C have been reported previously in type II diabetes mellitus (DMT2) when the vitamins were used as dietary supplement [54].

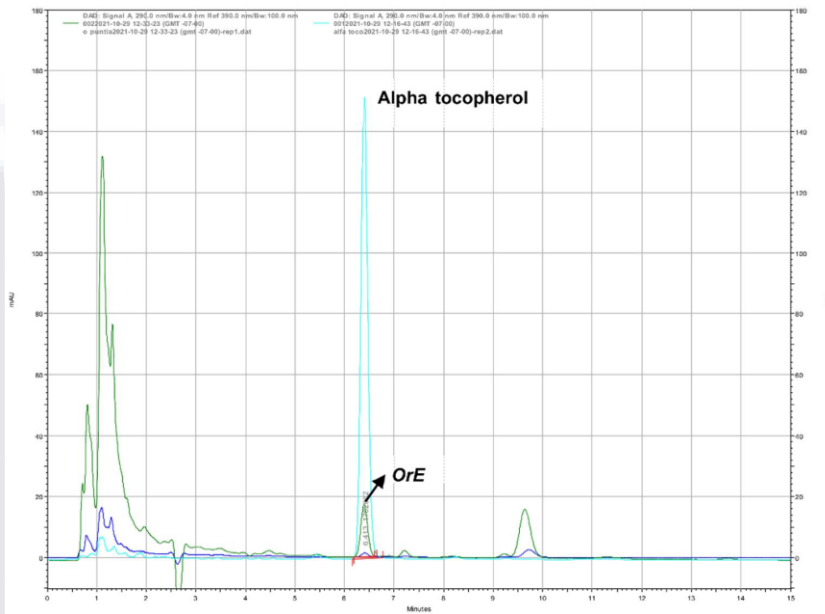


Figure 2. HPLC-UV chromatogram of alpha tocopherol standard and vitamin E in *Opuntia robusta* extract (*OrE*).

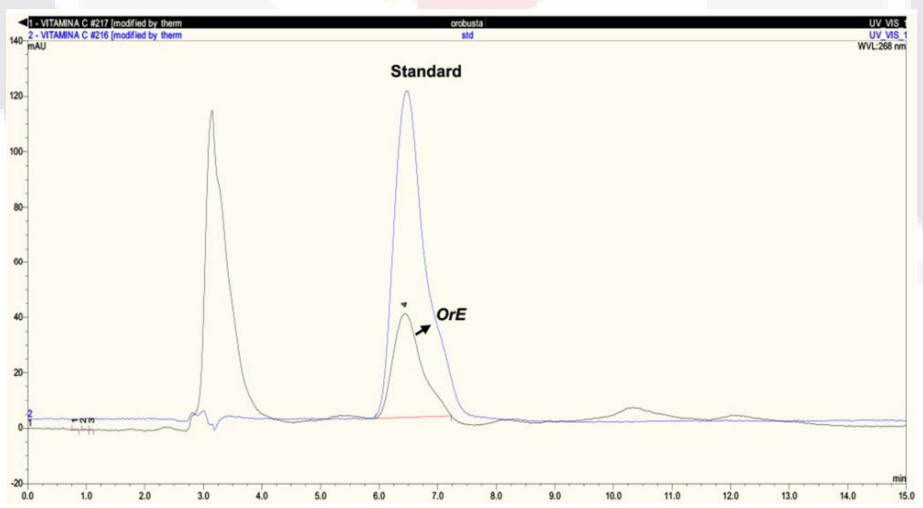


Figure 3. HPLC-UV chromatogram of vitamin C in *OrE*.

Considering that the oxidation of membrane lipids generated by the abstraction of hydrogen atoms is one of the most important mechanisms of damage caused by TAA and that vitamin E represents one of the most important fat-soluble antioxidants that provides protection to lipoproteins and phospholipids of biological membranes and stored lipids [55], this vitamin could mitigate the hepatic damage caused by TAA via hydrogen donation or HAT mechanism. Using the DPPH, ABTS^{•+} and AAPH techniques, we have demonstrated in this study that *OrP* has the capacity to reduce lipoperoxidation via these mechanisms.

Vitamin E reacts with peroxy radicals of fatty acids, primary products of lipid oxidation, preventing their subsequent reaction with macromolecules. This vitamin has a beneficial effect on chronic liver damage, which is characterized by sustained inflammation, since it can reduce this biological response [56].

On the other hand, vitamin C modulates NF- κ B nuclear translocation and reduces the signaling cascade that leads to HSC activation, collagen deposition and, ultimately, liver fibrosis [57].

Because vitamins E and C are exogenous micronutrients not associated with toxicity, as well as free radical scavengers and lipid peroxidation inhibitors, they should be included in the diet. This study demonstrates their presence in *Or* fruits.

Almost all the assays used in this study evaluate the HAT mechanism (except ABTS^{•+} that evaluates both HAT and SET and FRAP that only detects SET). However, there is evidence that electron donation by the betanin molecule is also a mechanism of action [58], which suggests that betanin is a compound that scavenges free radicals and reactive molecules via various mechanisms. One of these mechanisms is radical quenching: it removes superoxide and singlet oxygen radicals via a physical scavenging mechanism [59]. It should be noted that both synergistic and antagonistic effects occur among molecules with different degrees of antioxidant capacity, such as flavonoids, phenolics and vitamins E and C [60].

2.2. Animal Studies with Thioacetamide

2.2.1. Animals and Treatments

Fibrosis is the result of chronic damage to the liver parenchyma and is characterized by the elevation of aminotransferases, increased oxidative stress and alterations in hepatic architecture. Using markers to assess these changes in the liver, we determined the effects of *Or* on fibrogenesis induced by TAA.

2.2.2. Liver Damage Markers

High serum levels of ALT and AST are indicators of liver damage [56]. Chronic administration of TAA causes elevation of serum aminotransferases [61]. The administration of *OrP* significantly reduced ALT and AST levels in TAA-treated animals, indicating reduced liver damage. In the second week of treatment, *OrP* reduced ALT levels more than betanin (Figure 4). Showing that the other biocomponents of *OrP* act synergistically with the betacyanins in the fruit (Table 2), providing increased cytoprotection to hepatocytes.

During the third week, serum AST levels in rats from the *OrP*/TAA group did not differ from the control group, but did differ from the TAA group. The serum levels of ALT in the *OrP*/TAA group were lower than in the *OrE*/TAA and betanin/TAA groups and similar to the ALT levels in the NAC/TAA group (Figure 4). *OrP* decreased hepatocyte damage very effectively in the early stages of the pathogenesis of liver fibrosis. After four weeks of treatment, the experimental groups *OrE*/TAA and NAC/TAA showed significant differences compared to the TAA group (Figure 4). In contrast, the protection provided by *OrP* is very limited at this stage.

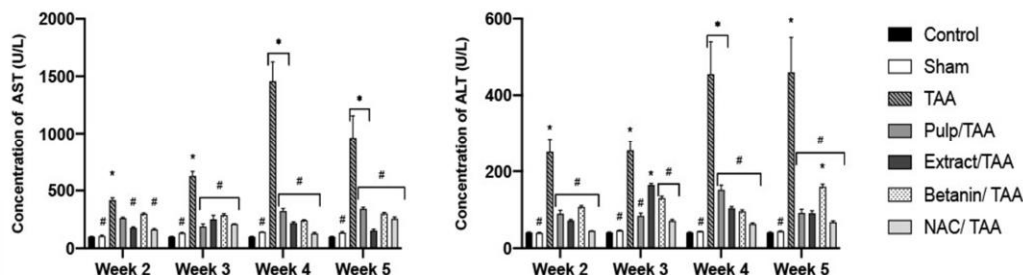


Figure 4. Aspartate aminotransferase (AST) and Alanine aminotransferase (ALT) concentrations for different treatments at different evaluation times. Two-way ANOVA with Tukey’s post hoc test. * $p < 0.05$ compared to control group, # $p < 0.05$ compared to thioacetamide group.

Finally, in the fifth week, the serum AST levels of all the treatment groups demonstrated a significant difference compared to the TAA group (Figure 4), indicating significant protection against the lesions caused by TAA. *OrP* and *OrE* also significantly reduced ALT levels compared to the TAA group (Figure 4), showing a marked protection to hepatocytes, since they are the cells that mainly produce this aminotransferase.

2.2.3. Oxidative Stress Markers GSH (Reduced Glutathione)

Administration of TAA induces oxidative stress in liver tissue via the generation of hydroperoxides during membrane lipid peroxidation, which is reflected in the decrease of hepatic GSH concentrations (Figure 5) as well as the increase in the MDA values (Figure 6) [62] and the activity of glutathione peroxidase [63]. The toxic metabolite of TAA (TASO₂) acts as an electrophilic compound that increases cellular oxidative stress. TASO₂ is directly neutralized by glutathione, which is why a significant decrease in reduced glutathione levels is observed at all time points of treatment with TAA (Figure 5A–D). However, when TAA is administered concomitantly with hepatoprotective agents, a higher concentration of GSH is shown even compared to the control group. As mentioned before, betanin is a potent inducer of GSH synthesis via the erythroid nuclear factor 2 (Nrf2) pathway, which demonstrates the important antioxidant capacity of this pigment, since Nrf2 is an important regulator of the antioxidant response. As shown in Figure 5A–C, treatment with betanin restores GSH levels to the levels observed in the control group, while treatment with *Or* seems to even increase tissue concentration of GSH compared to the control group. This increase occurs at all time points of treatment but is greater at week 4. *OrE*, during the second and third weeks of treatment, presented greater cytoprotective effects (Figure 5), in accordance with biochemical and histopathological data (Figures 4, 7 and 8I–L), but at week 4, it is the treatment with *OrP* that promotes synthesis of GSH through redox cycles and/or facilitates the binding of GSH to cellular proteins to delay their oxidation, using *OrP* antioxidant machinery as a priority rather than depleting glutathione stores.

The dose of NAC used in this experimental model was effective in reducing liver damage as reflected in biochemical (Figure 4) and histopathological markers (Figures 7 and 8). However, hepatic GSH levels showed a significant depletion in comparison to the control and TAA groups. There are reports in which this drug has been used for the treatment of early liver injury at lower doses [64] indicating that the dose of the drug is important to achieve the desired antioxidant effect.

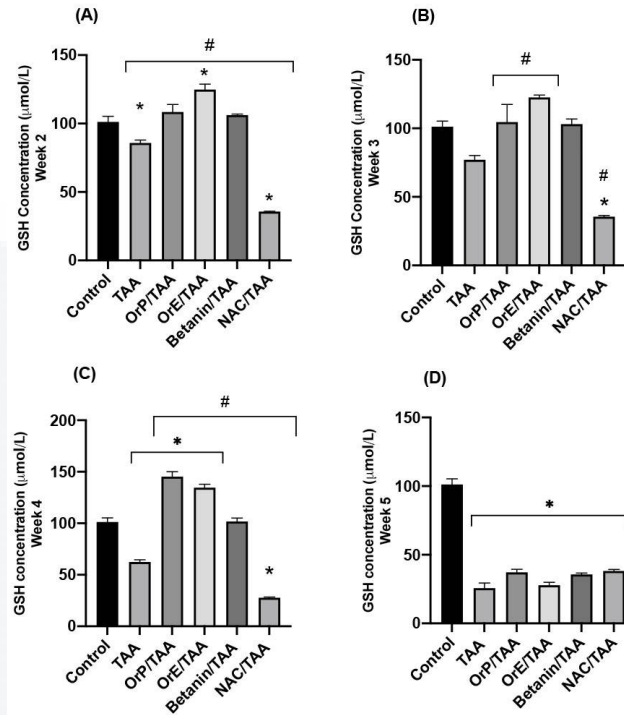


Figure 5. Concentrations of reduced glutathione (GSH) in liver tissue for the different treatments at different evaluation times. (A–C) *OrP* and *OrE* help to restore GSH levels. (D) A significant depletion of GSH is generated, the oxidative damage is severe in chronic treatment and hepatoprotectors have no effect at this point. One-way ANOVA with Tukey’s post hoc test. * $p < 0.05$ compared to control group, # $p < 0.05$ compared to TAA group.

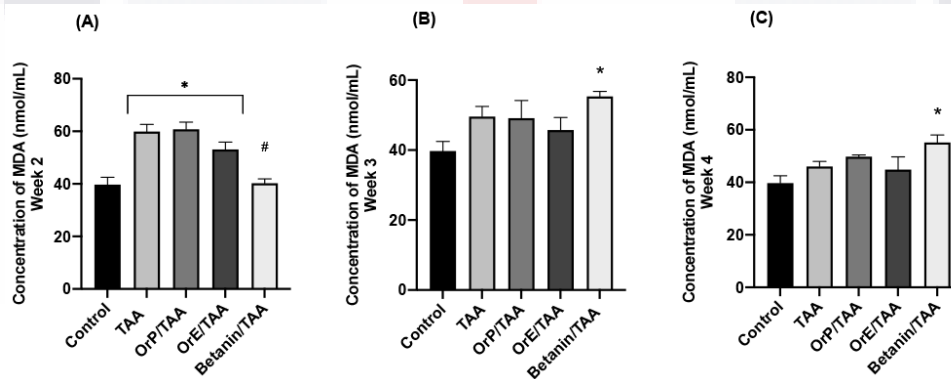


Figure 6. Concentrations of malondialdehyde (MDA) for the different treatments at different evaluation times. (A–C) *OrE* lowers malondialdehyde levels more effectively than *OrP*. One-way ANOVA with Tukey’s post hoc test. * $p < 0.05$ compared to control group, # $p < 0.05$ compared to TAA group.

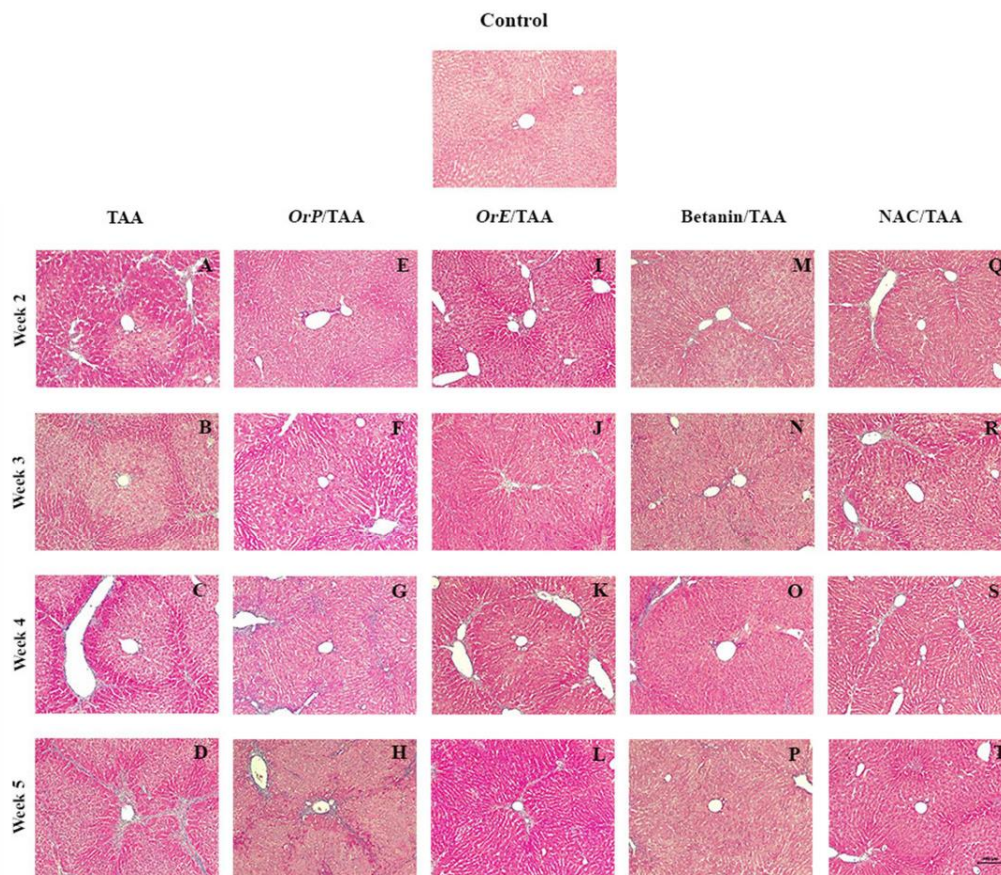


Figure 7. Damage projections from zone 3 to portal spaces. (A–D) Treatment with TAA showed extensive areas of vacuolation, necrosis, and fibrosis. Concomitant treatments decrease the severity of the damage. (E–H) *OrP* delays the morphological changes of the fibrotic process generated by TAA. (I–T) *OrE*, Betanin and NAC decrease the fibrotic process in all weeks of treatment. Masson’s trichrome staining. Magnification (100×).

In acute acetaminophen intoxication, there is evidence that *Opuntia streptacantha* partially prevents GSH depletion, while *Opuntia robusta* does it completely [12]. In the same study, it was reported that the treatment with *Opuntia* restored GSH concentration very close to the control levels. In the present study, GSH levels in the groups treated with *OrE* and *OrP* were higher than those shown by the control group (Figure 5). It has also been reported that the presence of phenolic compounds from the fruit of *Opuntia robusta* acts in synergy with betacyanins (Table 2), potentiating the antioxidant effect of the compounds compared to when they are isolated [32].

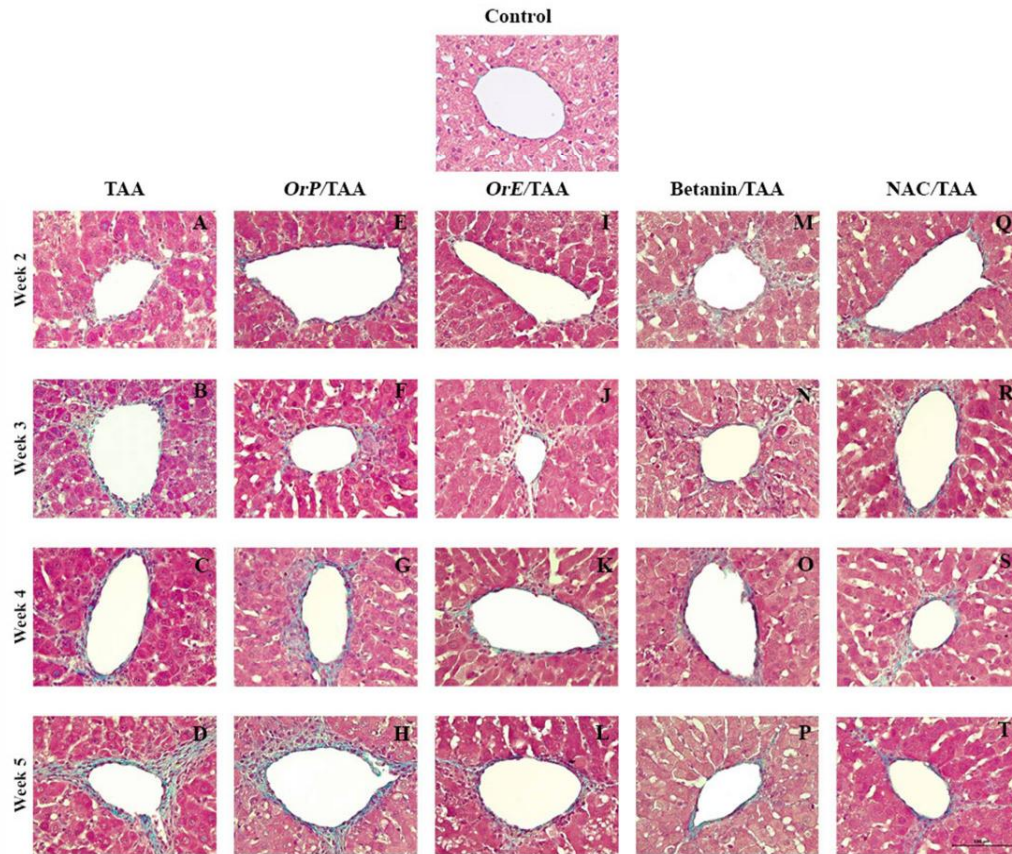


Figure 8. Effect the hepatoprotectors on histopathology in TAA-induced liver damage through time. (A–D) Necrosis and fibrosis septa are shown in zone 3 of the hepatic acinus with TAA administration. (E–T) Treatments with *OrP*, *OrE*, Betanin, and NAC decrease the number of damaged cells and the thickness of collagen septa. Masson’s trichrome staining. Magnification: 400×.

MDA (Malondialdehyde)

The excessive formation of superoxide radicals caused by TAA leads to the oxidation of unsaturated membrane lipids and the subsequent formation of MDA, which forms adducts with DNA, eventually triggering cell death. Likewise, lipid peroxidation of the cell membrane of hepatocytes is one of the main causes of liver injury [65]. Accordingly, in Figure 6A–C, we show that in our experimental model there was an increase in MDA throughout the treatment with TAA from week 2 onwards. High doses of TAA are known to induce oxidative stress and lipid oxidation as well as a decrease in antioxidant status [66].

OrE is more protective than *OrP* since it decreased the MDA levels on weeks 2, 3, and 4, while *OrP* did not provide any protection (Figure 6), suggesting the possibility of adhesion of the active components of the fruit to the insoluble fiber, making their availability and absorption more difficult. *OrE*, at weeks 3 and 4 (Figure 6B,C) of treatment, proved to be even more effective than betanin. This suggests that betanin alone only shows protection in the early stages of damage but becomes more protective in the presence of other biocomponents of *OrE* (Figure 6A). In addition, there is evidence to support that toxic products play an important role in betanin oxidation [67]. *OrE* is probably more protective

because of the presence of both betalains and flavonoids. *OrE* is also protective in a model of acetaminophen intoxication in the liver and this protection correlates with reduced MDA levels [18].

2.2.4. Histopathological Study

Compared to healthy controls, the livers of rats treated with TAA showed extensive areas of vacuolation, necrosis, and fibrosis, especially in zone 3, inflammatory infiltrate and loss of the normal architecture of the liver parenchyma (Figure 7A–D). It was observed that the administration of *Or* significantly reduced the histopathological changes induced by TAA.

Damage was observed from zone 3 to the portal spaces (Figure 7A–D); this is due to the differential expression of cytochrome P450 enzymes that are responsible for the biotransformation of TAA into TAAO₂ [68]. There is evidence that chronic intoxication with TAA drastically reduces the expression of the hepatic proteins CYP1A2, CYP2C6, CYP2E1, and CYP3A2 by 18, 71, 30, and 21%, respectively, compared to the control group [61]. This pattern of damage was persistent; although, the administration of *OrP* for two weeks (Figures 7E, 8E and 9) attenuated the damage (Figures 7A, 8A and 9).

From the third week of administration of TAA (Figures 7B and 8B), a beneficial effect is observed for *OrP* (Figures 7F and 8F) and *OrE* (Figures 7J and 8J), comparable or even more than observed with NAC (Figures 7R and 8R), a hepatoprotective drug used clinically to restore GSH levels on fibrotic diseases [69]. *OrP* and *OrE* decreases cell damage at the early stages and reduced fibrosis at all stages (Figure 9). At week 4 of *OrP*/TAA treatment (Figures 7G and 8G), the fibrotic process was well developed; although, the surface area of damaged liver parenchyma was less compared to the TAA group (Figures 7C and 8C). Both *OrP* and *OrE* decreased the thickness of the fibrotic interlobular septa, with *OrE* being more effective (Figure 9).

The fibrotic septa caused a total loss of the normal architecture in the liver lobules at week 5 of administration of TAA (Figure 7D). At this time, histologically, *OrP* decreased necrosis and fibrosis (Figure 9) induced by TAA (Figure 7H). Treatment with *OrE* considerably decreased the thickness of the fibrosis septa (Figures 7L, 8L and 9). *Or*, although to a lesser extent, also exerts a cytoprotective effect at advanced stages of liver fibrosis, delaying the formation of fibrotic septa.

Treatment with *OrP* and *OrE* mitigated histopathological changes in the liver of rats receiving TAA and this can be attributed to their antioxidant properties, reduction of MDA levels and improvement of reduced glutathione levels.

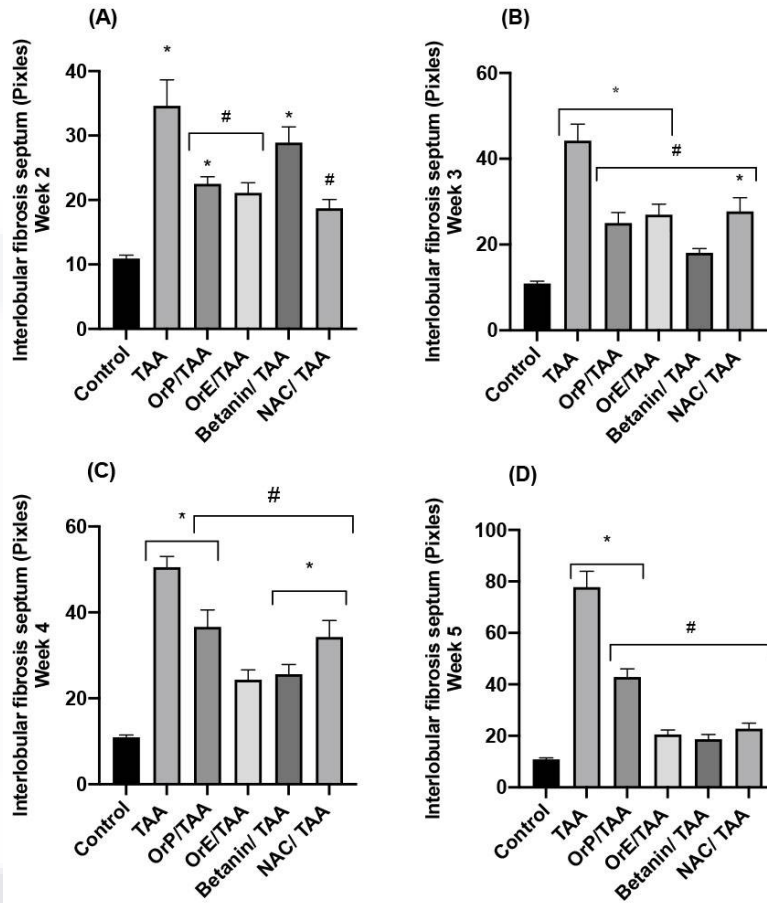


Figure 9. Measurements of interlobular fibrotic septa for the different treatments at different time points. (A–D) In all the evaluated weeks of treatment, *OrP* and *OrE* significantly decrease the thickness of the fibrosis septa. One-way ANOVA with Tukey’s post hoc test. * $p < 0.05$ compared to control group, # $p < 0.05$ compared to TAA group.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals and Reagents

Thioacetamide, betanin, N-acetylcysteine, GSH/GSSG kit, sodium chloride, procaine, heparin, paraformaldehyde, sodium hydroxide, gallic acid, Folin–Ciocalteu reagent, catechin, ascorbic acid, dithiothreitol (DTT), DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate), Trolox™ ((±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), sodium acetate, TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine), ABTS*+ (2,2’-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), potassium persulfate, AAPH (2,2’-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride), sodium nitroprusside, sulphanic acid, N-1-naphthyl ethylenediamine were all obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile (nanograde) was from Mallinckrodt. Formaldehyde, absolute methanol and glacial acetic acid were from J.T. Baker (Madrid, Spain). Hydrochloric acid and ferric chloride were from Fermont (Monterrey, México) and sodium pentobarbital was from Pisabental, Pisa Agropecuaria, México.

3.2. Nutraceutical Characterization of *Opuntia Robusta* Fruit

3.2.1. Fruit Material

The *Or* fruits were collected in the summer of 2019–2020 at the community Soledad de Abajo, Aguascalientes, México (21°47′04.7″ N 102°06′40.1″ W). The selection was based on the ripeness and integrity of the fruit, considering 7 to 11 cm purple-colored fruits as mature ones.

After harvest, the fruits were washed, disinfected and the glochids were removed. After hand-peeling, the seeds were separated; thus, obtaining *OrP*; the prickly pears destined to obtain *OrE* were centrifuged at 5000× rpm for 20 min and filtered. *OrP* and *OrE* were lyophilized and stored at −80 °C until analyses and treatments.

3.2.2. Determination of Moisture Content of *OrP*

The moisture content was analyzed according to standard protocols [21].

3.2.3. Bromatological Analysis of *OrP*

The bromatological analysis of *OrP* was performed at the Zootechnical Station of Universidad Autónoma de Aguascalientes following the recommended protocols of the AOAC [70].

3.2.4. Betacyanins

The evaluation of the betacyanin content was performed according to González Ponce et al. (2020) [18] with modifications. Dilutions of 1:30 and 1:40 of *OrP* were monitored at 538 nm. The following equation was applied for each value:

$$BT \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] = \frac{A * FD * MW * 1000}{\epsilon * l} \quad (1)$$

where, “A” is the sample absorbance, “FD” the dilution factor, “MW” the molecular weight (550 g/mol), “ ϵ ” the molar extinction coefficient [60,000 L/mol·cm in water], and “l” the cell read length.

3.2.5. Total Soluble Phenols

Based on the methodology described by Takoudjou Miafo et al. (2022) [71], 25 mL of the sample methanolic extract was mixed with 125 μ L of 2 N Folin–Ciocalteu phenol reagent and, after 6 min, 7% sodium carbonate was added. The reaction volume was brought to 3 mL with distilled water and incubated for 90 min at room temperature. Samples were centrifuged (Micro 2000 Clay Adams™ Becton Dickinson microcentrifuge) at 12,000× rpm for 3 min and read at 757 nm in a Biomate 3 Thermo Scientific spectrophotometer. The content of total soluble phenols of the sample was calculated as gallic acid equivalents using the equation shown below. The results were extrapolated from a gallic acid calibration curve.

$$GAE = \left[\frac{A - b}{m} \right] \times \left(\frac{V_t}{V_a} \right) \times \left[\frac{1}{Mh \times 10} \right] \times \left[\frac{1}{100 - H} \right] \quad (2)$$

where, “GAE” is the milligrams of gallic acid equivalents/gram of dry sample, “A” the absorbance of the sample tube, “b” the intercept (absorbance), “m” the slope (absorbance/microgram gallic acid), “Vt” the total volume of the extract (microliters), “Va” the volume of aliquot used in the test tube (microliters), “Mh” the weight of the extracted wet sample (grams) and “H” the moisture content of the wet sample (percent).

3.2.6. Total Soluble Flavonoids

According to Ilyas et al. (2022) [72], a volume of 500 μ L of methanolic *OrP* extract was mixed with 5% (w/v) sodium nitrite, 10% (w/v) aluminum chloride and 1 M sodium hydroxide. A final reaction volume of 2.5 mL with distilled water was incubated for 30 min, protected from light. The samples were read at 510 nm. A calibration curve was made with

catechin at different concentrations. The content of total soluble flavonoids of the sample was calculated as catechin equivalents using Equation (2).

3.2.7. Antioxidant Capacity

Methanolic Extract

The antioxidant capacity of *OrP* was evaluated with a methanolic extract obtained according to the method described by Lasano et al. (2019) [73], except in the AAPH method, in which we use PBS.

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

According to the method used by Ruslan et al. (2018) [74], 75 μL of the methanolic *OrP* extract was mixed with acidic (pH 2) absolute methanol-70% aqueous acetone 1:1 (*v/v*) (MAA) to 100 μL . Then, 600 μL of DPPH 0.13 mM was added and, after incubating the samples for 20 min, protected from light, they were read at 515 nm, having calibrated to zero absorbance with an absolute methanol blank. The result of the test samples was calculated by simple linear regression analysis and expressed as antioxidant activity equivalent to TroloxTM per unit weight of the wet or dry sample, using Equation (2) and extrapolating from a TroloxTM calibration curve.

ABTS^{•+} (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) Diammonium Salt)

In accordance with Xu et al. (2022) [75], 50 μL of *OrP* was used in triplicate and MAA was added to a final volume of 150 μL . Subsequently, 2850 μL of ABTS^{•+} solution (ABTS + potassium persulfate) was added. After incubation for 2 h in the dark, the absorbance of the samples was measured at 734 nm having zero absorbance calibrated with an absolute methanol blank. The result of the test sample was calculated by simple linear regression analysis and expressed as antioxidant activity equivalent to TroloxTM per unit weight of the wet or dry sample, using Equation (2) and extrapolating from the TroloxTM calibration curve.

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

According to Khudyakov et al. (2022) [76], the calibration curve was made using 0.666 mM TroloxTM. Fifty microliters of the biological sample were used, and MAA was added to a final volume of 150 μL , followed by the addition of 2850 μL of FRAP solution. The tubes were protected from light for 30 min at room temperature and the samples were read at 593 nm. The spectrophotometer was calibrated to zero absorbance with a blank tube without TroloxTM. The result of the test sample was calculated with Equation (2) by simple linear regression analysis and expressed as antioxidant activity equivalent to TroloxTM per unit weight of the wet or dry sample.

AAPH (2,2-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride)

Four milliliters of human blood were centrifuged at 3500 \times rpm for 5 min to remove the plasma and the buffy coat. Five washes were carried out with PBS pH 7.4, discarding the supernatant each time. A 5% (*v/v*) suspension of erythrocytes was prepared in PBS pH 7.4.

After confirming the lack of lytic capacity of the *OrP* extract on erythrocytes, using the methodology described by Vinjamuri et al. (2015) [77], the analysis of its cytoprotective capacity based on the method described by Chisté et al. (2014) [47] was performed using AAPH as a membrane oxidizing agent. The determinations were made on a 1:10 *OrP* dilution (or PBS pH 7.4), a 5% (*v/v*) erythrocyte suspension and a 150 mM AAPH solution (except for the blanks). The tubes were incubated at 37 ± 0.5 °C with orbital shaking at 200 rpm for 5 h in darkness, then centrifuged at 685 \times g for 5 min at 25 °C and their

supernatants were read at 535 nm. The following equation was applied to determine the hemolysis inhibition percentage of *OrP*:

$$\% \text{ of inhibition hemolysis} = 100 - \left[\frac{(\text{Amp} - \text{Acn})}{\text{Acp} - \text{Acn}} \right] \quad (3)$$

where, "Amp" is the absorbance of the sample, "Acn" is the absorbance of the negative control and "Acp" is the absorbance of the positive control.

A standard curve with known quantities of TroloxTM was made and the following polynomial equation was solved using the Wolfram Alpha[®] software:

$$y = ax^3 \cdot bx^2 + cx + d \quad (4)$$

Using Equation (5), the sample values expressed in Trolox equivalents were obtained.

$$\text{Eq. Trolox} = \left(\frac{\text{Abs} - b}{m} \right) \left(\frac{\text{Vt}}{\text{Va}} \right) \left(\frac{1}{\text{Mh} \times 10} \right) \left(\frac{1}{100 - H} \right) \quad (5)$$

where, "Eq. Trolox" is the micromoles of Trolox equivalents/gram of dry sample, "A" is the average absorbance of the replicates of the test sample, "b" is the intercept (absorbance), "m" is the slope (absorbance/nanomole of Trolox), "Vt" the total volume of the extract (microliters), "Va" the volume of aliquot used in the test tube (microliters), "Mh" the weight of the extracted wet sample (grams) and "H" the moisture content of the wet sample (percent).

Capacity to Scavenge Hydrogen Peroxide (H₂O₂)

According to the method adopted by Khan et al. (2022) [78], different concentrations of *OrP* were added to 40 mM hydrogen peroxide solution (0.6 mL). After 10 min, the absorbance of the hydrogen peroxide at 230 nm was read against the blank solution containing the phosphate buffer without the hydrogen peroxide. Subsequently, the hydrogen peroxide removal percentage was calculated from the following equation.

$$\% \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ scavenged} = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100 \quad (6)$$

where, A_c is the absorbance of the control and A_s is the absorbance in the presence of the sample of *Opuntia robusta* extracts or standards.

Determination of Vitamins C and E by High Performance Liquid Chromatography-UV (HPLC-UV)

Vitamin C

The determination of ascorbic acid (vitamin C) was performed using the technique established by Singh et al. (2016) [79] in a Thermo Scientific ACCELA PDA Detector ACCELA 600 pump. The preparation of the ascorbic acid standard was achieved by stirring it for 5 h at room temperature in ethanol with activated charcoal and air was continuously bubbled through the solution. Both standards and *OrE* samples were diluted to optimal levels with a mobile phase containing tyrosine (50 mg/100 mL). Dithiothreitol (DTT) was subsequently added to a final concentration of 100 mg/100 mL. The weak anion exchange mode was the method by which the optimal separations were observed. Waters μBondapak NH₂ 10 mm 3.9 × 300 mm columns with acetonitrile mobile phase: 0.05 M KH₂PO₄ (75:25 w/w) at a flow rate of 1.0 mL/min were used and the volume of injection was 10 μL. The KH₂PO₄ solution was heated and kept at 40 °C during the acetonitrile addition, to avoid KH₂PO₄ precipitates when acetonitrile was mixed with aqueous solutions. Ascorbic acid was detected by UV at 268 nm (detection limit 25 ng).

Vitamin E

The determination of vitamin E in *OrE* was carried out according to Limbach et al. (2021) [80] using a diode array detector Agilent 1260 and with the following specifications:

analytical column (Microsorb 100-3 C18 100 × 4.6 mm) at an elution flow rate of 1.0 mL/min. Twenty microliters of the sample were injected. Sample cycle: 30 min. The mobile phase was isocratic [methanol: water (98:2, *v/v*)] and readings were made at a wavelength of 290 nm. Alpha-tocopherol was used as standard.

3.3. Experimental Groups

3.3.1. Animals and Treatments

Male Wistar rats of 120–150 g were divided into 11 experimental groups: Control, Sham, TAA, *OrP*, *OrE*, Betanin, N-acetylcysteine (NAC), *OrP*/TAA, *OrE*/TAA, Betanin/TAA, NAC/TAA. TAA was dissolved in 0.9% physiological saline solution and administered intraperitoneally twice a week; the first week 250 mg/kg and the following ones 200 mg/kg [81]. The test substances were dissolved in distilled water and administered daily. NAC was dissolved in 0.9% physiological saline solution and administered intraperitoneally at 50 mg/kg. *OrP* and *OrE* orally at 800 mg/kg (12,18) and betanin orally at 25 mg/kg [82] using a stainless steel curved oesophageal cannula (18 × 3" Cadence Science). The treatments were administered for 5 weeks, and samples of blood and liver tissue were taken for analysis at the end of the 2nd, 3rd, 4th and 5th weeks. All animals had free access to food and water during the experiment and their body weights were monitored every week.

At the end of the 2nd, 3rd, 4th and 5th week, eight rats from each group were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg), then a thoracotomy was performed, and blood samples were taken by cardiac puncture, centrifuged at 3500 × rpm for 15 min to obtain serum and then stored at −80 °C until the evaluation of biomarkers of liver damage. The livers of 4 rats were perfused with lavage solution and a total hepatectomy was performed. Liver samples were preserved at −80 °C until the evaluation of markers of oxidative stress. The livers of the remaining four individuals in each experimental group were fixed with neutral formalin (*v/v* reagent grade formalin/phosphate buffer) after perfusion with lavage solution and total hepatectomy to perform the histopathological study. Liver tissue samples were placed in neutral formalin until processing.

Our research protocols were approved by the ethics committee of Universidad Autónoma de Aguascalientes for the *in vivo* experiments and were performed following the guidelines of Mexican government NOM-062-ZOO-1999 and the guidelines of the National Institutes of Health for the care and use of laboratory animals (NIH publications no. 8023).

3.3.2. Biomarkers of Liver Damage

The concentrations of the enzymes aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in blood serum were determined via dry chemistry in the VITROS® System Integrated 5600 Ortho Clinical Diagnostics Johnson & Johnson Company equipment, Neptune Township, NJ, USA.

3.3.3. Oxidative Stress Biomarkers

GSH (Reduced Glutathione)

GSH levels were determined in liver tissue after homogenization in the TissueLyser II QIAGEN® equipment, Hilden, Germany. The ratio of oxidized glutathione, glutathione disulfide (GSSG), to GSH was determined using a commercial kit (Quantification kit for oxidized and reduced glutathione, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Determinations were performed on a 96-well plate in an iMark™ Microplate Absorbance Reader BIO-RAD, Hercules, CA, USA at 415 nm.

MDA (Malondialdehyde)

MDA concentrations were determined in liver tissue after homogenization using the TissueLyser II QIAGEN® equipment. The methodology described by González-Ponce et al. (2020) [18] was used and the samples were read on a HACH DR/4000U spectrophotometer at 530 nm.

3.3.4. Histopathological Study

Tissue fragments were embedded in paraffin. Sections were cut at 5 μm and processed as previously described [83] to assess hepatic morphology. Liver fibrosis was assessed using Masson's trichrome staining. Three slides per individual were evaluated under a microscope from Primo Star, Zeiss.

3.3.5. Measurements of Interlobular Fibrotic Septa

We performed the measurements of the fibrotic septa in the interlobular space on 3 different fields per slide of 3 individual rats per time for each of the treatments. A photomicroscope Leica DM750, camera ICC50W. Heerbrugg, Switzerland and the LAS EZ version 3.4.0 software Leica Microsystems, Switzerland were used to take the pictures and the Axio Vision Rel. 4.6 software. Oberkochen, Germany to make the measurements. We determined the areas of collagen in the interlobular zone as pixels at a total magnification of 100 \times . Parts that did not show the blue staining pattern characteristic of collagen of Masson's trichrome staining were excluded. The results were expressed as the total number of positive pixels for collagen.

3.3.6. Statistical Analysis

For the determination of the moisture percentage, results were expressed as mean \pm standard deviation; $n = 3$. The bromatological analysis was carried out from a pool of 5 fruits and the results correspond to this analyzed sample. Betacyanin results were expressed as mean \pm standard deviation; $n = 3$. For phenolic compounds and flavonoids, different aliquots of the extract were used (250 μL). Results of the antioxidant capacity determination were expressed as mean \pm standard deviation; $n = 3$.

For the determination of biochemical markers of liver damage, the results were analyzed using two-way ANOVA with Tukey's post hoc test using GraphPad Prism 9.0.1 software. San Diego, CA, USA with a significance of $p < 0.05$. Results represent the mean of each group ($n = 4$) \pm standard error of the mean (S.E.M.).

For oxidative stress markers (GSH $n = 4$; MDA $n = 6$) and for the measurement of interlobular fibrotic septa ($n = 9$) the results were analyzed using one-way ANOVA with Tukey's post hoc test using GraphPad Prism 9 software. San Diego, CA, USA with a significance of $p < 0.05$. Results represent the mean of each group \pm standard error of the mean (S.E.M.).

4. Conclusions

Our results showed that *Or* contains biocomponents with nutraceutical and antioxidant capacity that prevent hepatocyte damage and death, attenuates the exacerbated deposition of extracellular matrix components in the space of Disse and modulates the sustained inflammation in the pathogenesis of liver fibrosis. The donation of electrons by the betanin molecule, the presence of vitamins E and C, the restoration of GSH levels, in addition to the donation of hydrogen atoms, are some of the possible mechanisms by which *Or* exerts its beneficial effect. The antioxidant mechanisms involved are mediated by the components contained in the fruit, being more effective in the extract than in the pulp.

Or delays GSH depletion, decreased MDA levels and protects cell integrity, which is reflected in the reduction of serum ALT and AST levels and the significant reduction of tissue inflammation, necrosis, vacuolation, and fibrotic septa.

This study demonstrates that the treatment with the extract and pulp of *Opuntia robusta* ameliorates the characteristics of liver fibrosis. Its concomitant consumption with TAA can attenuate the fibrosis process, in a similar way as NAC, a drug used clinically in the treatment of fibrosis. We propose the intake of the fruit to reduce the risk of developing liver fibrosis/cirrhosis. However, detailed molecular studies are pertinent to determine the exact mechanism by which *Opuntia robusta* exerts its beneficial effect.

Author Contributions: N.A.P.-H.: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, and writing—original draft. J.V.-J.: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, writing—review and editing, resources, supervision, project administration, and funding acquisition. F.G.-L.: conceptualization, formal analysis, methodology, and writing—review. H.A.G.-P.: conceptualization, methodology, formal analysis, and writing—review and editing. E.S.-A.: methodology. H.M.: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, writing—review and editing, resources, supervision, project administration, and funding acquisition. M.B.-H.: methodology. M.C.M.-S.: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, writing—review and editing, resources, supervision, project administration, and funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Nayeli Amalinalli Pulido-Hornedo was supported through a doctoral grant from CONA-CyT with code number 713673 and through internal support from the Universidad Autónoma de Aguascalientes with code number PIT22-4.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of Universidad Autónoma de Aguascalientes: Comité de Ética para el uso de Animales en la Docencia e Investigación (CEADI), protocol code: PIT22-4, 18 August 2021.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: To Sonia Sofía Muñoz Cruz and Gloria Stephanie Villa Jaimes from the Morphology Department of the Basic Sciences Center of the Autonomous University of Aguascalientes for their valuable technical and academic support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Xu, J.; Wang, X.; Su, G.; Yue, J.; Sun, Y.; Cao, J.; Zhao, Y. The antioxidant and anti-hepatic fibrosis activities of acorns (*Quercus liaotungensis*) and their natural galloyl triterpenes. *J. Funct. Foods* **2018**, *46*, 567–578. [[CrossRef](#)]
- Berumen, J.; Baglieri, J.; Kisseleva, T.; Mekeel, K. Liver fibrosis: Pathophysiology and clinical implications. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2020**, *13*, e1499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Shi, L.; Zhang, X.; Liu, X.; Jiang, Y.; Deng, Y.; Liu, J. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) phytochemicals inhibit hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Food Biosci.* **2021**, *42*, 101176. [[CrossRef](#)]
- Yuan, L.; Kaplowitz, N. Mechanisms of Drug-induced Liver Injury. *Clin. Liver Dis.* **2013**, *17*, 507–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Novo, E.; Busletta, C.; Bonzo, L.; Povero, D.; Paternostro, C.; Mareschi, K.; Ferrero, I.; David, E.; Bertolani, C.; Caligiuri, A.; et al. Intracellular reactive oxygen species are required for directional migration of resident and bone marrow-derived hepatic pro-fibrogenic cells. *J. Hepatol.* **2010**, *54*, 964–974. [[CrossRef](#)]
- Reyes-Agüero, J.A.; Rivera, J.R.; Flores, J. Variación morfológica de “Opuntia” (“Cactaceae”) en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. *Intercien. Rev. Cienc. Tecnol. Am.* **2005**, *30*, 476–484.
- Castellanos-Santiago, E.; Yahia, E.M. Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5758–5764. [[CrossRef](#)]
- Patel, S. Reviewing the prospect of Opuntia pears as low cost functional foods. *Rev. Environ. Sci. Bio Technol.* **2012**, *12*, 223–234. [[CrossRef](#)]
- Patil, K.; Dagadkhair, A. Physicochemical characteristics and antioxidant potential of Opuntia fruit: A review Kartika V Patil and Amol C Dagadkhair. *Seeds* **2019**, *2*, 10.
- Ali, R. Antioxidant and Anticancer Activities of Different Constituents Extracted from Egyptian Prickly Pear Cactus (*Opuntia Ficus-Indica*) Peel Faten, M. Abou-Ellella and Rehab Farouk Mohammed Ali* Department of. *Biochem. Anal. Biochem.* **2014**, *3*, 1–8. [[CrossRef](#)]
- De Wit, M.; du Toit, A.; Osthoff, G.; Hugo, A. Antioxidant Content, Capacity and Retention in Fresh and Processed Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica* and *O. robusta*) Fruit Peels from Different Fruit-Colored Cultivars. *Front. Sustain. Food Syst.* **2020**, *4*, 133. [[CrossRef](#)]
- González-Ponce, H.A.; Martínez-Saldaña, M.C.; Rincón-Sánchez, A.R.; Sumaya-Martínez, M.T.; Buist-Homan, M.; Faber, K.N.; Moshage, H.; Jaramillo-Juárez, F. Hepatoprotective Effect of *Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha* Fruits against Acetaminophen-Induced Acute Liver Damage. *Nutrients* **2016**, *8*, 607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 114–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Jiménez-Aguilar, D.M.; López-Martínez, J.M.; Hernández-Brenes, C.; Gutiérrez-Uribe, J.A.; Welti-Chanes, J. Dietary fiber, phytochemical composition and antioxidant activity of Mexican commercial varieties of cactus pear. *J. Food Compos. Anal.* **2015**, *41*, 66–73. [[CrossRef](#)]
15. Chavez-Santoscoy, A.; Gutiérrez-Uribe, J.; Serna-Saldivar, S. Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and In Vitro Cancer Cell Cytotoxicity of Nine Prickly Pear (*Opuntia* spp.) Juices. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2009**, *64*, 146–152. [[CrossRef](#)]
16. Chang, S.F.; Hsieh, C.L.; Yen, G.C. The protective effect of *Opuntia dillenii* Haw fruit against low-density lipoprotein peroxidation and its active compounds. *Food Chem.* **2008**, *106*, 569–575. [[CrossRef](#)]
17. Budinsky, A.; Wolfram, R.; Oguogho, A.; Efthimiou, Y.; Stamatopoulos, Y.; Sinzinger, H. Regular ingestion of opuntia robusta lowers oxidation injury. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids (PLEFA)* **2001**, *65*, 45–50. [[CrossRef](#)]
18. González-Ponce, H.A.; Martínez-Saldaña, M.C.; Tepper, P.G.; Quax, W.J.; Buist-Homan, M.; Faber, K.N.; Moshage, H. Betacyanins, major components in *Opuntia* red-purple fruits, protect against acetaminophen-induced acute liver failure. *Food Res. Int.* **2020**, *137*, 109461. [[CrossRef](#)]
19. Villa-Jaimes, G.S.; Aguilar-Mora, F.A.; González-Ponce, H.A.; Avelar-González, F.J.; Martínez Saldaña, M.C.M.; Buist-Homan, M.; Moshage, H. Biocomponents from *Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha* fruits protect against diclofenac-induced acute liver damage in vivo and in vitro. *J. Funct. Foods* **2022**, *89*, 104960. [[CrossRef](#)]
20. Piga, A. Cactus Pear: A Fruit of nutraceutical and functional importance. *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.* **2004**, *6*, 9–22.
21. AOAC. AOAC International. *Official Method 920.151 Solids (Total) in Fruits and Fruit Products*, 17th ed.; AOAC: Gaithersburg MD, USA, 2000.
22. Torres-Bojórquez, A.E.; García, O.; Miranda-Lopez, R.; Anaberta, C.M. Evaluation of antioxidant capacity, physicochemical characteristics and sensory profile of *Opuntia robusta* and *O. ficus-indica*. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2017**, *67*, 291–299.
23. Chaouch, M.; Hafsia, J.; Rihouey, C.; le Cerf, D.; Majdoub, H. Effect of extraction conditions on the antioxidant and antiglycation capacity of carbohydrates from *Opuntia robusta* cladodes. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2016**, *51*, 929–937. [[CrossRef](#)]
24. Van Soest, P.J. *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd ed.; Cornell University: Ithaca, NY, USA, 1994.
25. González Ponce, H.; Rincón-Sánchez, A.; Jaramillo-Juárez, F.; Moshage, H. Natural Dietary Pigments: Potential Mediators against Hepatic Damage Induced by Over-The-Counter Non-Steroidal Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs. *Nutrients* **2018**, *10*, 117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Buettner, G. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *300*, 535–543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Livrea, M.A.; Tesoriere, L. Lipoperoxyl Radical Scavenging and Antioxidative Effects of Red Beet Pigments BT—Red Beet Biotechnology. In *Food and Pharmaceutical Applications*; Neelwarne, B., Ed.; Springer: Boston, MA, USA, 2012; pp. 105–124. [[CrossRef](#)]
28. Krajka-Kuźniak, V.; Paluszczak, J.; Szaefer, H.; Baer-Dubowska, W. Betanin, a beetroot component, induces nuclear factor erythroid-2-related factor 2-mediated expression of detoxifying/antioxidant enzymes in human liver cell lines. *Br. J. Nutr.* **2013**, *110*, 2138–2149. [[CrossRef](#)]
29. Marañón-Ruiz, V.F.; Rizo de la Torre L del, C.; Chiu-Zarate, R. Caracterización de las propiedades ópticas de Betacianinas y Betaxantinas por espectroscopía Úv-Vis y barrido en Z. *Superf. Vacío* **2011**, *24*, 113–120.
30. Fernández-López, J.A.; Almela, L.; Obón, J.M.; Castellar, R. Determination of Antioxidant Constituents in Cactus Pear Fruits. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2010**, *65*, 253–259. [[CrossRef](#)]
31. Macheix, J.J.; Fleuriot, A.; Billot, J. *Fruit Phenolics*, 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1990; p. 390.
32. Galati, E.M.; Tripodo, M.M.; Trovato, A.; Miceli, N.; Monforte, M.T. Biological effect of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae) waste matter: Note I: Diuretic activity. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *79*, 17–21. [[CrossRef](#)]
33. Cazzola, R.; Cestaro, B. Red wine polyphenols protect n–3 more than n–6 polyunsaturated fatty acid from lipid peroxidation. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 3065–3071. [[CrossRef](#)]
34. Hwang, Y.P.; Choi, J.H.; Han, E.H.; Kim, H.G.; Wee, J.-H.; Jung, K.O.; Jung, K.H.; Kwon, K.-I.; Jeong, T.C.; Chung, Y.C.; et al. Purple sweet potato anthocyanins attenuate hepatic lipid accumulation through activating adenosine monophosphate-activated protein kinase in human HepG2 cells and obese mice. *Nutr. Res.* **2011**, *31*, 896–906. [[CrossRef](#)]
35. Toufektsian, M.C.; Salen, P.; Laporte, F.; Tonelli, C.; de Lorgeril, M. Dietary Flavonoids Increase Plasma Very Long-Chain (n-3) Fatty Acids in Rats. *J. Nutr.* **2011**, *141*, 37–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Villasante, A.; Patro, B.; Chew, B.; Becerra, M.; Wacyk, J.; Overturf, K.; Powell, M.S.; Hardy, R.W. Dietary Intake of Purple Corn Extract Reduces Fat Body Content and Improves Antioxidant Capacity and n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Profile in Plasma of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. World Aquac. Soc.* **2015**, *46*, 381–394. [[CrossRef](#)]
37. Pérez-Torres, I.; Zúñiga Muñoz, A.; Beltrán-Rodríguez, U.; Díaz-Díaz, E.; Martínez-Memije, R.; Guarner Lans, V. Modification of the liver fatty acids by *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus (Malvaceae) infusion, its possible effect on vascular reactivity in a metabolic syndrome model. *Clin. Exp. Hypertens.* **2014**, *36*, 123–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Miler, M.; Živanović, J.; Ajdžanović, V.; Oreščanin-Dušić, Z.; Milenković, D.; Konić-Ristić, A.; Blagojević, D.; Milošević, V.; Šošić-Jurjević, B. Citrus flavanones naringenin and hesperetin improve antioxidant status and membrane lipid compositions in the liver of old-aged Wistar rats. *Exp. Gerontol.* **2016**, *84*, 49–60. [[CrossRef](#)]

39. Vargas Mendoza, N. Efecto Hepatoprotector y Antioxidante del Extracto y los Principios Activos de *Geranium shiedeanum*. Ph.D. Thesis, San Agustín Tlaxiaca, Hgo, Mexico, 2012. Available online: <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/biblioteca/digital/handle/231104/1803> (accessed on 5 July 2022).
40. Esatbeyoglu, T.; Wagner, A.E.; Motafakkerzad, R.; Nakajima, Y.; Matsugo, S.; Rimbach, G. Free radical scavenging and antioxidant activity of betanin: Electron spin resonance spectroscopy studies and studies in cultured cells. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *73*, 119–126. [[CrossRef](#)]
41. Sumaya-Martínez, M.T.; Cruz-Jaime, S.; Madrigal-Santillán, E.; García-Paredes, J.D.; Cariño-Cortés, R.; Cruz-Cansino, N.; Valadez-Vega, C.; Martínez-Cardenas, L.; Alanís-García, E. Betalain, Acid ascorbic, phenolic contents and antioxidant properties of purple, red, yellow and white cactus pears. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *2*, 6452–6468. [[CrossRef](#)]
42. Butera, D.; Tesoriere, L.; Di Gaudio, F.; Bongiorno, A.; Allegra, M.; Pintaudi, A.M.; Kohen, R.; Livrea, M.A. Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of Its Betalains: Betanin and Indicaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6895–6901. [[CrossRef](#)]
43. Amjadi, S.; Mesgari Abbasi, M.; Shokouhi, B.; Ghorbani, M.; Hamishehkar, H. Enhancement of therapeutic efficacy of betanin for diabetes treatment by liposomal nanocarriers. *J. Funct. Foods* **2019**, *59*, 119–128. [[CrossRef](#)]
44. Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290–4302. [[CrossRef](#)]
45. Roginsky, V.; Lissi, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* **2005**, *92*, 235–254. [[CrossRef](#)]
46. Ou, B.; Huang, D.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.A.; Deemer, E.K. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3122–3128. [[CrossRef](#)]
47. Chisté, R.; Freitas, M.; Mercadante, A.; Fernandes, E. Carotenoids are Effective Inhibitors of in vitro Hemolysis of Human Erythrocytes, as Determined by a Practical and Optimized Cellular Antioxidant Assay. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, H1841–H1847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kanner, J.; Harel, S.; Granit, R. Betalains A New Class of Dietary Cationized Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5178–5185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Sakihama, Y.; Maeda, M.; Hashimoto, M.; Tahara, S.; Hashidoko, Y. Beetroot betalain inhibits peroxynitrite-mediated tyrosine nitration and DNA strand damage. *Free. Radic. Res.* **2011**, *46*, 93–99. [[CrossRef](#)]
50. Keser, S.; Celik, S.; Türkoglu, S.; Yilmaz, O.; Turkoglu, I. Hydrogen Peroxide Radical Scavenging and Total Antioxidant Activity of Hawthorn. *Chem. J.* **2012**, *2*, 9–12.
51. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44–84. [[CrossRef](#)]
52. Musyarofah, N.; Susanto, S.; Aziz, S.A.; Suketi, K.; Dadang, D. The diversity of 'kristal' guava (*Psidium guajava*) fruit quality in response to different altitudes and cultural practices. *Biodiversitas* **2020**, *21*, 3310–3316. [[CrossRef](#)]
53. Alkaladi, A. Vitamins E and C ameliorate the oxidative stresses induced by Zinc oxide nanoparticles on liver and gills of *Oreochromis niloticus*. *Saudi J. Biol. Sci.* **2018**, *26*, 357–362. [[CrossRef](#)]
54. El-Aal, A.A.; El-Ghffar, E.A.A.; Ghali, A.A.; Zughbur, M.R.; Sirdah, M.M. The effect of vitamin C and/or E supplementations on type 2 diabetic adult males under metformin treatment: A single-blinded randomized controlled clinical trial. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2018**, *12*, 483–489. [[CrossRef](#)]
55. Sumida, Y.; Niki, E.; Naito, Y.; Yoshikawa, T. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. *Free Radic. Res.* **2013**, *47*, 869–880. [[CrossRef](#)]
56. Al-Mehdar, A.A.; El-Denshary, E.S.; Addel-wahhab, M.A. Alpha Lipoic Acid and Alpha-Tocopherol Counteract the Oxidative Stress and Liver Damage in Rats Sub-Chronically Treated with Khat (*Catha edulis*) Extract. *Glob. J. Pharmacol.* **2012**, *6*, 94–105.
57. Abhilash, P.A.; Harikrishnan, R.; Indira, M. Ascorbic acid suppresses endotoxemia and NF- κ B signaling cascade in alcoholic liver fibrosis in guinea pigs: A mechanistic approach. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, *274*, 215–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Gliszczynska-Swiglo, A.; Szynusiak, H.; Malinowska, P. Betanin, the main pigment of red beet: Molecular origin of its exceptionally high free radical-scavenging activity. *Food Addit. Contam.* **2006**, *23*, 1079–1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Tada, M.; Kohno, M.; Niwano, Y. Scavenging or Quenching Effect of Melanin on Superoxide Anion and Singlet Oxygen. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2010**, *46*, 224–228. [[CrossRef](#)]
60. Brahma, D.; Bouaziz, C.; Ayed, Y.; ben Mansour, H.; Zougui, L.; Bacha, H. Chemopreventive effect of cactus *Opuntia ficus indica* on oxidative stress and genotoxicity of aflatoxin B1. *Nutr. Metab.* **2011**, *8*, 73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Xie, Y.; Wang, G.; Wang, H.; Yao, X.; Jiang, S.; Kang, A.; Zhou, F.; Xie, T.; Hao, H. Cytochrome P450 Dysregulations in Thioacetamide-Induced Liver Cirrhosis in Rats and the Counteracting Effects of Hepatoprotective Agents. *Drug Metab. Dispos.* **2012**, *40*, 796–802. [[CrossRef](#)]
62. Ramos-Tovar, E.; Casas-Grajales, S.; Hernández-Aquino, E.; Flores-Beltrán, R.E.; Galindo-Gómez, S.; Vera-Aguilar, E.; Diaz-Ruiz, A.; Montes, S.; Camacho, J.; Tsutsumi, V.; et al. Cirrhosis induced by thioacetamide is prevented by stevia. *Molecular mechanisms. J. Funct. Foods* **2019**, *52*, 552–564. [[CrossRef](#)]
63. El-Latif El-Ghazaly, M.A.; Rashed, E.R.; Shafey, G.M.; Zaki, H.F.; Attia, A.S. Amelioration of thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rats by low-dose gamma irradiation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 334–343. [[CrossRef](#)]

64. Gulbahar, O.; Karasu, Z.; Ersoz, G.; Akarca, U.; Musoglu, A. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with N-acetylcysteine (Abstract). *Gastroenterology* **2000**, *118*, A1444. [[CrossRef](#)]
65. Bashandy, S.A.E.; el Awdan, S.A.; Mohamed, S.M.; Omara, E.A.A. Allium porrum and Bauhinia Variegata Mitigate Acute Liver Failure and Nephrotoxicity Induced by Thioacetamide in Male Rats. *Indian J. Clin. Biochem.* **2020**, *35*, 147–157. [[CrossRef](#)]
66. Abul, H.; Mathew, T.C.; Dashti, H.M.; Al-Bader, A. Level of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Uric Acid in Thioacetamide-Induced Cirrhotic Rats. *Anat. Histol. Embryol.* **2002**, *31*, 66–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Tesoriere, L.; Allegra, M.; Gentile, C.; Livrea, M. Betacyanins as phenol antioxidants. Chemistry and mechanistic aspects of the lipoperoxyl radical-scavenging activity in solution and liposomes. *Free Radic. Res.* **2009**, *43*, 706–717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Dwivedi, D.; Jena, G. Glibenclamide protects against thioacetamide-induced hepatic damage in Wistar rat: Investigation on NLRP3, MMP-2, and stellate cell activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2018**, *391*, 1257–1274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Yormaz, S.; Bulbuloglu, E.; Kurutas, E.B.; Ciralik, H.; Yuzbasioglu, M.F.; Yildiz, H.; Coskuner, I.; Silay, E.; Kantarceken, B.; Goksu, M.; et al. The comparison of the effects of hepatic regeneration after partial hepatectomy, silybum marinaum, propofol, N-acetylcysteine and vitamin E on liver. *Bratisl. Lekárske Listy* **2012**, *113*, 145–151. [[CrossRef](#)]
70. AOAC. AOAC International. *Official Method 954.02, Fat Crude or Ether Extract in Pet Food*; AOAC: Gaithersburg MD, USA, 1977.
71. Takoudjou Miaofo, A.P.; Koubala, B.B.; Muralikrishna, G.; Kansci, G.; Fokou, E. Non-starch polysaccharides derived from sorghum grains, bran, spent grain and evaluation of their antioxidant properties with respect to their bound phenolic acids. *Bioact. Carbohydr. Dietary Fibre* **2022**, *28*, 100314. [[CrossRef](#)]
72. Ilyas, M.; Khan, W.A.; Ali, T.; Ahmad, N.; Khan, Z.; Fazal, H.; Zaman, N.; Ualiyeva, D.; Ali, M.; Amissah, O.B.; et al. Cold Stress-induced Seed Germination and Biosynthesis of Polyphenolics Content in Medicinally Important Brassica rapa. *Phytomedicine Plus* **2022**, *2*, 100185. [[CrossRef](#)]
73. Lasano, N.F.; Hamid, A.H.; Karim, R.; Dek, M.S.P.; Shukri, R.; Shazini Ramli, N. Nutritional Composition, Anti-Diabetic Properties and Identification of Active Compounds Using UHPLC-ESI-Orbitrap-MS/MS in *Mangifera odorata* L. Peel Seed Kernel. *Mol.* **2019**, *24*, 320. [[CrossRef](#)]
74. Ruslan, K.; Happyriani, S.; Fidrianny, I. Antioxidant potential of two varieties of *Sesamum indicum* L. collected from Indonesia. *J. Taibah Univ. Med. Sci.* **2018**, *13*, 211–218. [[CrossRef](#)]
75. Xu, P.; Qian, Y.; Wang, R.; Chen, Z.; Wang, T. Entrapping curcumin in the hydrophobic reservoir of rice proteins toward stable antioxidant nanoparticles. *Food Chem.* **2022**, *387*, 132906. [[CrossRef](#)]
76. Khudyakov, D.; Sosnin, M.; Shorstkii, I.; Okpala, C.O.R. Cold filamentary microplasma pretreatment combined with infrared dryer: Effects on drying efficiency and quality attributes of apple slices. *J. Food Eng.* **2022**, *329*, 111049. [[CrossRef](#)]
77. Vinjamuri, S.; Shanker, D.; Ramesh, R.S.; Nagarajan, S. In vitro evaluation of hemolytic activity and cell viability assay of hexanoic extracts of *Bridelia ferruginea* Benth. *World J. Pharm. Pharm. Sci. (WJPPS)* **2015**, *4*, 1263–1268.
78. Khan, S.; Rehman, M.; Muhammed, K.; Khan, M.; Haq, I.; Khan, M. In vitro and in vivo antioxidant therapeutic evaluation of *Dodonaea viscosa*. *Biorxiv* **2022**. [[CrossRef](#)]
79. Singh, G.; Mohanty, B.P.; Saini, G.S.S. Structure, spectra and antioxidant action of ascorbic acid studied by density functional theory, Raman spectroscopic and nuclear magnetic resonance techniques. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2016**, *155*, 61–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Limbach, J.R.; Espinosa, C.D.; Perez-Calvo, E.; Stein, H.H. Effect of dietary crude protein level on growth performance, blood characteristics, and indicators of intestinal health in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* **2021**, *99*, skab166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. El-Baz, F.K.; Salama, A.A.A.; Hussein, R.A. Dunaliella salina microalgae oppose thioacetamide-induced hepatic fibrosis in rats. *Toxicol. Rep.* **2020**, *7*, 36–45. [[CrossRef](#)]
82. Han, J.; Ma, D.; Zhang, M.; Yang, X.; Tan, D. Natural Antioxidant Betanin Protects Rats from Paraquat-Induced Acute Lung Injury Interstitial Pneumonia. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 608174. [[CrossRef](#)]
83. Prophet, E.B. *Methods in Histotechnology*, 1st ed.; Prophet Edna, Ed.; The Libraries: Washington, DC, USA, 1992; Volume I, pp. 123–132.